



**TESINA DE GRADO DE LICENCIATURA EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS OPCIÓN MICROBIOLOGÍA**

**Sistemas de adquisición de hierro  
mediados por citrato férrico en  
*Herbaspirillum seropedicae* Z67**

María Fernanda Trovero Martínez

Tutor: Lic. Federico Rosconi

Departamento de Bioquímica y Genómica Microbianas  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Julio 2012

# ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	1
ÍNDICE DE FIGURAS.....	4
RESUMEN.....	7
INTRODUCCIÓN	
I.Los endófitos.....	8
II.Las gramíneas.....	8
III.El hierro y la regulación de su homeostasis.....	9
IV.Sistemas de adquisición y almacenamiento de hierro en bacterias.....	10
V.Sistemas de captación mediados por citrato.....	12
VI.Sistemas de captación de hierro en las interacciones microorganismo-hospedero.....	15
VII. <i>Herbaspirillum seropedicae</i> .....	16
VIII.Antecedentes.....	18
VIII.Hipótesis.....	19
IX.Objetivos.....	19
MATERIALES Y MÉTODOS	
Análisis <i>in silico</i> .....	20
Bacterias y medios de cultivo.....	20
Extracción de ADN genómico de <i>H. seropedicae</i> Z67.....	20
Extracción de ADN plasmídico.....	21
Reacciones de amplificación por PCR.....	22
Visualización y cuantificación del ADN.....	23
Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.....	23
Reacciones de digestión con enzimas de restricción.....	24
Reacciones de ligación de ADN.....	24
Preparación de células competentes.....	24

Transformación de células competentes.....	25
Construcción de las mutantes <i>fecA</i> <sup>-</sup> .....	25
<u>I.Clonado de <i>fecA</i> en pBSK</u> .....	26
<u>II.Interrupción de <i>fecA</i> con el cassette <i>lacZaacC1</i></u> .....	27
<u>III.Subclonado en pWS233 y pasaje a <i>E. coli</i> TOP10</u> .....	28
<u>IV.Conjugación triparental para obtener pWS-<i>fecA</i>::<i>lacZaacC1</i> en <i>H. seropedicae</i></u> <u>Z67</u> .....	29
<u>V.Inducción del doble evento de recombinación homóloga</u> .....	30
Verificación de las mutaciones mediante PCR de colonia.....	30
Verificación de las mutaciones mediante <i>Southern Blot</i> .....	31
Bioensayos.....	33
Ensayos de crecimiento	
<u>I.Evaluación de crecimiento en medio sólido por tamaño de colonia</u> .....	33
<u>II.Evaluación de crecimiento mediante curvas en medio líquido</u> .....	34
Ensayos de expresión de <i>fecA</i> .....	34
Ensayos de colonización de arroz	
<u>I.Preparación e inoculación de semillas</u> .....	35
<u>II.Esterilización superficial de plantas y conteo de bacterias</u> .....	35
Estadística.....	36
<b>RESULTADOS</b>	
<i>Análisis in silico</i> .....	37
<i>Herbaspirillum seropedicae</i> Z67 es capaz de utilizar citrato férrico como fuente de hierro nutricional	
<u>Bioensayos</u> .....	38
<u>Evaluación del crecimiento</u> .....	38
<u>Crecimiento en medio sólido</u> .....	39
<u>Crecimiento en medio líquido</u> .....	39

Construcción de las mutantes <i>fecA</i> <sup>-</sup> .....	40
Caracterización de las mutantes construidas.....	47
Estudio del crecimiento de las mutantes.....	47
Ensayos de expresión del gen <i>fecA</i> .....	52
Ensayos de colonización de arroz.....	53
DISCUSIÓN.....	55
PERSPECTIVAS.....	59
ANEXO	
Composición de los medios	
<u>NFb-Malato</u> .....	60
<u>TY</u> .....	60
<u>LB</u> .....	60
<u>Hoagland</u> .....	61
Composición de las soluciones utilizadas	
<u>Buffer TE</u> .....	61
<u>CTAB/NaCl</u> .....	62
<u>Solución I para extracción de ADN plasmídico</u> .....	62
<u>Solución II para extracción de ADN plasmídico</u> .....	62
<u>Solución III para extracción de ADN plasmídico</u> .....	62
<u>Buffer TAE 25X</u> .....	62
<u>Buffer de transferencia SSC 10X</u> .....	62
<u>Solución depurinizante</u> .....	62
<u>Solución desnaturizante</u> .....	63
<u>Solución neutralizante</u> .....	63
<u>Solución de prehibridación</u> .....	63
<u>Solución de detección A y B</u> .....	63
<u>Solución de detección C</u> .....	63

<u>Buffer Z</u> .....	63
Abreviaturas.....	63
Datos de los recuentos de microcolonias de los ensayos de colonización de arroz.....	64
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	70

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Esquema de los sistemas de captación de hierro mediados por sideróforos en <i>E. coli</i> K12.....	11
Fig. 2: Esquema del mecanismo de adquisición de hierro, bajo la forma citrato férrico, mediado por la proteína FecA.....	14
Fig. 3: Gel bidimensional de fracciones de membrana externa de <i>H. seropedicae</i> Z67 crecida en medio NFb-malato sin agregado de hierro, con el spot correspondiente a FecA.....	18
Fig. 4: Clonado de <i>fecA</i> en pBSK.....	26
Fig. 5: Interrupción con el <i>cassette lacZaacC1</i> .....	28
Fig. 6: Subclonado en pWS233.....	29
Fig. 7: Conjugación triparental e inducción del doble evento de recombinación.....	30
Fig. 8: (a) Contexto génico de <i>fecA</i> en el genoma de <i>H. seropedicae</i> SmR1; (b) Esquema de los dominios Pfam del gen <i>fecA</i> en <i>E. coli</i> y del homólogo en <i>H. seropedicae</i> .....	37
Fig. 9: Bioensayo de la cepa Z67 en medio NFb-Malato EDDHA 500µM.....	38
Fig. 10: Crecimiento de la cepa Z67.....	39
Fig. 11: Curvas de crecimiento construidas con la cepa Z67, partiendo de un inóculo primario sin hierro.....	40
Fig. 12: Esquema de la construcción pBSK- <i>fecA</i> .....	41
Fig. 13: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las digestiones con las enzimas PstI y NotI para comprobar el sentido de inserción del gen <i>fecA</i> en el pBSK.....	41
Fig. 14: Esquema de la construcción pBSK- <i>fecA::lacZaacC1</i> .....	42

Fig. 15: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las extracciones de los plásmidos pBSK- <i>fecA::lacZaacC1</i> y las digestiones con la enzima HindIII para comprobar el sentido de inserción del <i>cassette lacZaacC1</i> en el pBSK- <i>fecA</i> .....	43
Fig. 16: Esquema de la construcción pWS- <i>fecA::lacZaacC1</i> .....	43
Fig. 17: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las digestiones de los plásmidos recombinantes pWS- <i>fecA::lacZaacC1</i> con la enzima BglII para verificar la presencia del inserto <i>fecA::lacZaacC1</i> .....	44
Fig. 18: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las PCR de cuatro colonias de las mutantes del gen <i>fecA</i> en Z67.....	45
Fig. 19: Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de la PCR de colonia de la mutante del gen <i>fecA</i> en 4.3.....	45
Fig. 20: (a) Autorradiografía de la membrana correspondiente al <i>Southern Blot</i> que verifica la mutación del gen <i>fecA</i> con el <i>cassette lacZaacC1</i> en la cepa Z67; (b) Esquema de la autorradiografía.....	46
Fig. 21: (a) Esquema de interrupción del gen <i>fecA</i> en el genoma de Z67 y 4.3, (b) Esquema del gen <i>fecA</i> en la cepa salvaje.....	46
Fig. 22: Curvas de crecimiento construidas con las cepas Z67 y su mutante en el gen <i>fecA</i> , a partir de un inóculo primario sin hierro.....	48
Fig. 23: Curvas de crecimiento construidas con las cepas 4.3 y su mutante en el gen <i>fecA</i> , a partir de un cultivo primario sin hierro.....	49
Fig. 24: Densidades ópticas alcanzadas a las 16 horas de crecimiento, para las cuatro cepas, partiendo de inóculos sin hierro.....	50
Fig. 25: Curvas construidas con las cepas Z67 y su mutante en <i>fecA</i> , a partir de un inóculo primario sin hierro, pasando por un segundo inóculo primario con EDDHA 50 $\mu$ M.....	51
Fig. 26: Densidades ópticas alcanzadas a las 16 horas de crecimiento, para la cepa Z67 y su mutante derivada <i>fecA<sup>-</sup></i> , partiendo de inóculos con EDDHA 50 $\mu$ M.....	52

Fig. 27: Ensayo de expresión del gen <i>fecA</i> para las distintas condiciones de disponibilidad de hierro en las cuatro cepas estudiadas.....	53
Fig. 28: Persistencia de las distintas cepas en las plantas a los 8 días de transferidas las semillas inoculadas a los tubos.....	54

## RESUMEN

Los endófitos son microorganismos mutualistas que pueden ser aislados de plantas esterilizadas superficialmente, y colonizan su interior sin causarles daños aparentes. El endófito *Herbaspirillum seropedicae* Z67 posee gran potencial como promotor de crecimiento vegetal de gramíneas como el arroz. Al igual que para la mayoría de los organismos, el hierro es un nutriente esencial cuya disponibilidad está limitada a pH neutro y ambientes aerobios. Los microorganismos desarrollaron entonces sistemas eficientes para su captación. Uno de dichos sistemas consiste en el transporte de alta afinidad del citrato férrico. En *Escherichia coli*, el complejo citrato-ión férrico es reconocido e internalizado específicamente por la proteína de membrana externa FecA. Nos propusimos evaluar el uso de citrato férrico como fuente de hierro nutricional en la cepa *H. seropedicae* Z67, y el papel de un gen homólogo al *fecA* de *E. coli* en la internalización. Con tal finalidad, construimos una mutante dirigida a dicho gen en *H. seropedicae*, tanto en la cepa salvaje Z67 como en una mutante derivada 4.3 no productora de sideróforos. El fenotipo de las mutantes obtenidas se caracterizó por bioensayos, crecimiento en medio sólido y en medio líquido bajo distintas condiciones de disponibilidad de hierro, por ensayos de expresión mediante un gen reportero, y ensayos de colonización de la planta de arroz. Los resultados indican que en las condiciones estudiadas la mutante tiene levemente afectado su crecimiento a concentraciones nanomolares de citrato férrico y a las 16 horas de incubación. Los ensayos *in planta* demostraron que la ausencia de FecA no afecta significativamente la colonización de arroz. Proponemos entonces que *H. seropedicae* posee otros sistemas de transporte de citrato férrico alternativos, independientes o cooperativos del transporte mediado por FecA.

# INTRODUCCIÓN

## *I. Los endófitos*

Las bacterias endófitas son microorganismos mutualistas que pueden ser aislados de una planta esterilizada superficialmente o de un tejido interno infectado sin causar síntomas visibles de daño a la misma [1, 2]. Otros autores proponen que la capacidad de reinfectar plántulas hospederas y la evidencia microscópica de colonización interna de la planta son características esenciales para definir una bacteria como endófito [2].

Una clasificación de endófitos los divide en pasajeros, cuya colonización casual está restringida a tejidos fuera del córtex; endófitos oportunistas, donde una respuesta quimiotáctica les permite colonizar el rizoplasma y ciertos tejidos vegetales internos; y endófitos competentes. Se consideran endófitos competentes aquellos que tienen la maquinaria genética necesaria para la colonización y la persistencia dentro de la planta [3, 4].

Estas asociaciones entre la planta y el endófito han demostrado ser de gran importancia, ya que los endófitos pueden promover el crecimiento vegetal mediante la fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas, participación en el ciclo de nutrientes, control de fitopatógenos mediante producción de antifúngicos o producción de sideróforos (moléculas de bajo peso molecular secretadas para captar hierro del ambiente, que impedirían la captación del mismo por patógenos); producir metabolitos secundarios de interés y potenciar la fitorremediación [2, 5].

## *II. Las gramíneas*

Las gramíneas son plantas herbáceas monocotiledóneas de gran importancia a nivel económico, ya que gran parte de la alimentación de los humanos está basada en las mismas, y por la posibilidad de obtener biocombustible, entre otras [6]. Especies como maíz, arroz y trigo se consumen directamente como alimento; mientras que otras gramíneas como raigrás, festuca o cebadilla, se utilizan como forrajes para el ganado.

Las gramíneas son capaces de formar asociaciones con distintos microorganismos fijadores de nitrógeno, tanto rizosféricos (por ejemplo, género *Azospirillum*) como endófitos (géneros *Acetobacter* y *Herbaspirillum*) [7]. La búsqueda de éstos y otros microorganismos para la producción y desarrollo de biofertilizantes que promuevan el crecimiento de los cultivos mencionados, es una intensa línea de investigación de varios laboratorios a nivel mundial.

### *III.El hierro y la regulación de su homeostasis*

El hierro es un metal de transición cuyos principales estados de oxidación son  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{3+}$ , aunque los mismos varían entre -2 y +4. Es un elemento vital para la gran mayoría de los procesos celulares de los organismos, como ser biosíntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos, transporte de oxígeno, respiración, fotosíntesis, fijación de nitrógeno [8]. La funcionalidad biológica del hierro depende principalmente de su incorporación a proteínas, ya sea como especies mono o binucleares, o como cluster Fe-S y grupos hemo [9].

Pese a ser además el cuarto elemento más abundante de la corteza terrestre, en presencia de agua y oxígeno, a pH neutro a básicos, el hierro se encuentra bajo formas férricas que se polimerizan y forman complejos insolubles. Por este motivo su disponibilidad para las bacterias está limitada, y obtener las concentraciones micromolares del elemento necesarias se torna un problema [10]. El ión ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) puede reaccionar con oxígeno durante el metabolismo celular y dar lugar a radicales reactivos altamente dañinos. Por esta razón los organismos deben regular finamente el balance entre la captación de hierro del ambiente y su acumulación en el interior celular, la cual es potencialmente tóxica.

Las estrategias utilizadas por las bacterias para mantener la homeostasis de hierro en condiciones limitantes del metal incluyen: a) captación de hierro mediante transportadores de alta afinidad; y b) control del consumo de hierro, disminuyendo la expresión de proteínas que lo contienen. En condiciones de alta disponibilidad del metal las estrategias descritas incluyen: a) almacenamiento de hierro en depósitos intracelulares para posterior uso cuando las fuentes exteriores son limitantes; y b) producción de sistemas de resistencia a estrés oxidativo, como los

que degradan especies reactivas del oxígeno inducidas por hierro. Para lograr un equilibrio balanceado de estas estrategias, las bacterias utilizan un sistema de regulación que coordina la expresión de la maquinaria homeostática de acuerdo a la disponibilidad de hierro [9, 10].

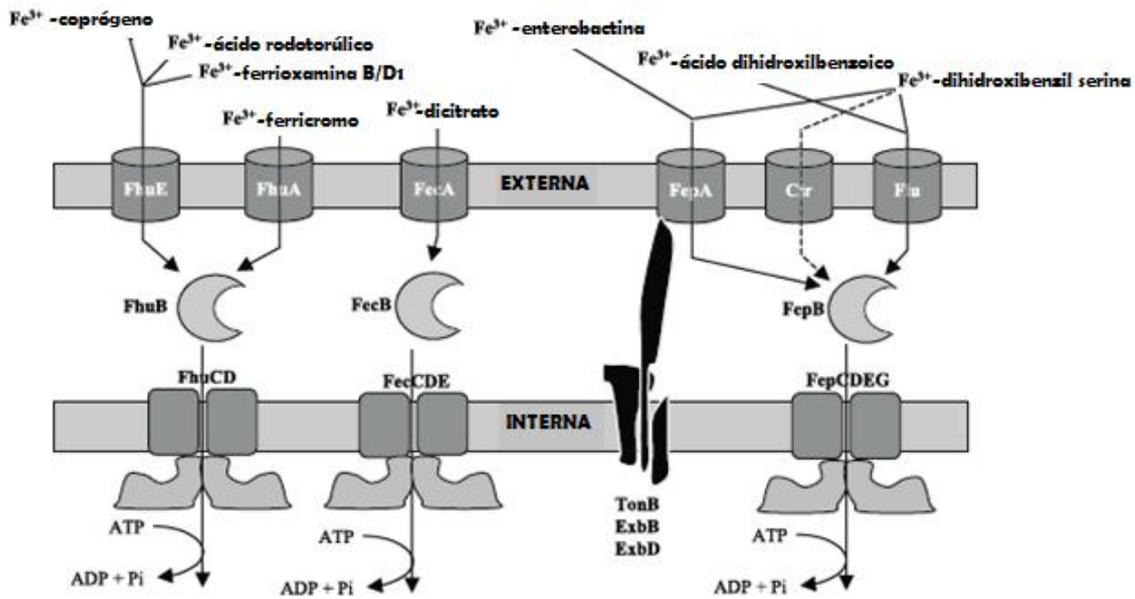
El principal regulador transcripcional dependiente de hierro es la proteína homodimérica Fur en *E. coli*, que reprime bajo condiciones de hierro suficientes más de 90 genes que poseen la secuencia palindrómica consenso de aproximadamente 19 pb conocida como “caja Fur” [11]. Dicha proteína forma entonces un complejo con el hierro en forma ferrosa que actúa como co-represor, y este complejo interactúa con la caja Fur presente en la región promotora de los genes de adquisición del hierro. Sin embargo, en condiciones limitantes de hierro, la proteína Fur no forma complejo con el mismo, y no se une a la caja Fur con suficiente afinidad permitiendo la expresión de los genes de captación [9].

En *Sinorhizobium meliloti* sin embargo, la proteína Fur no está involucrada en la regulación del metabolismo del hierro, sino en el metabolismo del manganeso regulando la expresión por ejemplo del gen *mntA*, codificante de una proteína de captación del metal [12]. En el caso de las  $\alpha$ -Proteobacterias de la familia Rhizobiaceae, como *S. meliloti* y *Rhizobium leguminosarum*, el regulador de los genes del metabolismo de hierro es la proteína RirA [13, 14]. El mecanismo de acción de RirA sería similar al de Fur, reprimiendo los genes de adquisición de hierro en altas concentraciones del metal [15].

#### *IV. Sistemas de adquisición y almacenamiento de hierro en bacterias*

Para satisfacer sus requerimientos de hierro del orden  $\mu\text{M}$  [8] las bacterias desarrollaron tres mecanismos para obtener hierro: (a) bajar el pH externo a la célula para hacer al ión férrico más soluble; (b) reducir el ión férrico a formas ferrosas más solubles; y (c) emplear quelantes de ión férrico como agentes solubilizadores [9].

Los procariotas pueden adquirir hierro mediante la síntesis y liberación al medio de sideróforos, compuestos quelantes de bajo peso molecular y alta afinidad por el ión férrico, acompañados de la expresión de sistemas de transporte específicos que, en el caso de Gram negativas, incluyen proteínas de membrana externa TonB-dependientes (Fig.1).



**Figura 1.** Esquema de los sistemas de captación de hierro mediados por sideróforos en *E. coli* K12 (Extraído y modificado de Andrews et al., 2003).

A la vez, son capaces de internalizar sideróforos exógenos, es decir, producidos por otros organismos para beneficio propio. Muchas bacterias también utilizan grupos hemo, complejos con hemo y hemoproteínas como fuente de hierro. Esto puede darse mediante proteasas y hemolisinas que liberan los grupos, o bien a través de su captación por hemóforos. Estos últimos son moléculas que unen hemoglobinas y hemopexinas extracelulares, y son internalizados a través de receptores de membrana específicos. Estos sistemas de captación de hemo mediante hemóforos, requieren de un receptor de membrana externa, una proteína que oficie de hemóforo y se ligue al grupo hemo, y una proteína de membrana interna para su secreción [16]. Es posible también para los procariotas la captación directa de hemina, mediante receptores específicos de membrana. En el rizobio *S. meliloti* 1021 existe un receptor de membrana externa ShmR

expresado bajo condiciones limitantes de hierro, que se une a hemina formando parte de un sistema de captación de dicho compuesto [17]. Tanto los receptores de hemina como los de hemóforos son dependientes de TonB, al igual que los transportadores de sideróforos. Finalmente, existen receptores de citrato, lactoferrina y transferrina (éstas dos últimas son glicoproteínas capaces de unir hierro, presentes en diversas secreciones animales), situados en la membrana externa de bacterias Gram-negativas e inducidos bajo condiciones limitantes de hierro, que proveen otra ruta de entrada de ión férrico [9].

Tres tipos de proteínas de almacenamiento de hierro se reconocen en bacterias: ferritinas, bacterioferritinas y Dps. La característica principal de las mismas es su arquitectura molecular con una cavidad central que actúa como un reservorio de hierro, que les confiere su capacidad de almacenar el metal. Dichas proteínas captan hierro en su forma ferrosa, pero lo depositan en su cavidad central bajo la forma férrica oxidada [9].

Las proteínas Dps están presentes únicamente en procariotas, y son inducidas en la fase estacionaria de crecimiento. Tienen un rol en la protección de ADN contra el estrés oxidativo, ya que se unen al ADN de forma inespecífica [9]. La función de las proteínas ferritinas, también encontradas en eucariotas, consiste en la acumulación de hierro durante la fase post-exponencial de crecimiento en presencia de hierro, para ser usado luego como fuente intracelular de hierro en condiciones de hierro deficientes. Finalmente, las bacterioferritinas que contienen grupos hemo y sólo se encuentran en eubacterias, si bien son más comunes su rol fisiológico es menos claro.

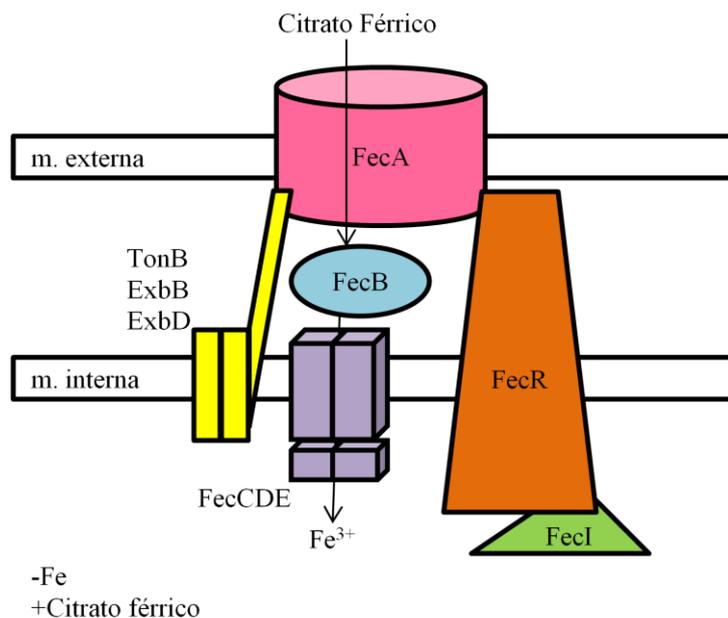
#### *V.Sistemas de captación mediados por citrato*

El citrato es un ácido orgánico que participa como intermediario del ciclo del ácido cítrico o de Krebs. Muchos microorganismos pueden obtener hierro directamente de este compuesto, así como también de piruvato, malato e isocitrato [18]. Aunque considerada relativamente baja, el citrato tiene afinidad por el hierro, debido a su composición química que

presenta tres grupos carboxilos, los cuales pueden perder un protón y formar sales con iones metálicos [19].

Uno de los sistemas de transporte de hierro mediado por citrato es el sistema *fecABCDE*, muy bien conocido y estudiado en *E. coli* (Fig. 1). Otras bacterias como *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Pseudomonas aeruginosa* son también capaces de transportar hierro mediante citrato [18]. A su vez, se ha visto que *Bradyrhizobium japonicum*, una  $\alpha$ -Proteobacteria diazótrofa que establece simbiosis con leguminosas, emplea el citrato como sideróforo para captar hierro, y es capaz de utilizar citrato férrico como fuente del metal [20].

El complejo citrato-ión férrico se liga a FecA que es el receptor de membrana externa TonB-dependiente, y activa una señalización transmembrana que finalmente lleva a la inducción del sistema de transporte de citrato férrico, donde participan las proteínas codificadas por los genes del operón *fecABCDE* [21]. FecA interacciona con TonB del lado periplásmico, a través de la caja-TonB, que en conjunto con ExbB y ExbD suministran la energía necesaria para que el complejo se trasloque al periplasma [22, 23]. ExbB y ExbD usan el gradiente electroquímico de la membrana citoplasmática para energizar a TonB, que produce un cambio conformacional en FecA. Así se mueve el dominio globular que cierra FecA, permitiendo el pasaje del citrato férrico a través del  $\beta$ -barril de FecA hacia el periplasma [24]. Una vez en el periplasma, el citrato férrico se une a FecB, que lo dirige hacia FecD y FecC presentes en la membrana citoplasmática, y que junto con FecE forman un transportador de tipo ABC para internalizar el complejo al citosol (Fig. 2) [21].



**Figura 2.** Esquema del mecanismo de adquisición de hierro, bajo la forma citrato férrico, mediado por la proteína FecA.

Tanto la limitación de hierro como la presencia de citrato férrico son necesarias para iniciar la transcripción del operón *fecABCDE*. Cuando el hierro intracelular está en exceso, el ión ferroso se une a la proteína Fur, que actúa como represor transcripcional de los genes *fecIR* y *fecABCDE* [21]. Los genes *fecIR* forman una unidad transcripcional distinta a *fecABCDE*, corriente abajo (o 3') de dicho operón [21, 22]. En condiciones limitantes de hierro, ambos operones no son más reprimidos por Fur. Por otra parte, la unión de citrato férrico a FecA regula la expresión desde el promotor de *fecA* de los genes *fecABCDE* pero no afecta la transcripción de *fecIR* [22]. Dicha unión, genera una señal que se trasmite a través de la membrana externa, y es transferida a lo largo del periplasma por la porción N-terminal de la proteína, que se contacta con la porción C-terminal de FecR. Es así como FecR censa si FecA se encuentra unido al citrato férrico para ser transportado. El segmento transmembrana de la proteína FecR lleva la señal a través de la membrana citoplasmática, llegando al citosol. Allí FecR, libera y activa al factor sigma extracelular (*Extra-Cellular sigma Factor ECF*) FecI, que se une a la subunidad  $\beta'$  de la ARN polimerasa y actúa como regulador directo del operón *fecABCDE*, y sólo así se transcribe el mismo.

ECFs de acción similar son encontrados en otras bacterias. Un ejemplo de esto es la proteína PvdS de *P. aeruginosa*, que induce los genes requeridos para la biosíntesis del

sideróforo pioverdina. Tanto PvdS como FecI son miembros de la subfamilia de factores sigma ECF involucrados en el metabolismo del hierro [25]. Bajo condiciones de hierro limitantes, el gen del factor sigma PvdS regulado por Fur se expresa, y actúa como activador de los genes de la biosíntesis del sideróforo pioverdina (*pvdADE*), y de los genes *regAB* y *ptxR*, involucrados en el control positivo del gen de la exotoxina A (*toxA*) [26].

#### VI. Sistemas de captación de hierro en las interacciones microorganismo-hospedero

La relevancia de los sistemas de captación de hierro mediante sideróforos está bien dilucidada en bacterias patógenas de animales [10, 27]. El sideróforo yersiniabactina es requerido para la virulencia de *Yersinia pestis* y *Klebsiella pneumoniae*, así como la pioverdina es necesaria para la patogenicidad de *P. aeruginosa* [28]. *P. aeruginosa*, además de producir los sideróforos pioverdina y pioquelina y utilizar sideróforos exógenos, tiene la capacidad de utilizar citrato férrico como fuente de hierro nutricional. En este sentido, también se identificaron en esta bacteria genes homólogos a *fecA*, *fecI* y *fecR* de *E. coli*, pero no así homólogos a *fecBCDE*. Sin embargo, se ha encontrado en *P. aeruginosa* un homólogo al gen *feoB* de *E. coli*, que codifica para un transportador de  $Fe^{2+}$  de membrana interna. Se presume que un mecanismo reductivo liberaría el hierro del citrato, y el ión ferroso resultante se transportaría a través de FeoB; o bien se oxidaría a  $Fe^{3+}$  para internalizarse por un transportador de membrana interna del ión férrico [29].

Para fitopatógenos por el contrario, la importancia es menos clara, y depende del sistema patógeno-hospedero en cuestión. En el caso de *Erwynia chrysanthemi*, causante de enfermedad en varias plantas, los sideróforos crisobactina y acromobactina son requeridos para una óptima virulencia en violetas africanas [28]. Sin embargo en *Pseudomonas syringae* pv *tomato* DC3000, una bacteria patógena del tomate que posee los sideróforos pioverdina, yersiniabactina y citrato para captar hierro bajo condiciones limitantes, los mutantes en transportadores de estos sideróforos no muestran alteraciones en la virulencia [30].

En el caso de las interacciones de los microorganismos endófitos con sus hospederos, la importancia de los sistemas de captación de hierro es aún mayormente desconocida.

#### *VII. Herbaspirillum seropedicae*

Entre los diferentes aislamientos de endófitos, las Gram-negativa  $\beta$ -Proteobacterias del género *Herbaspirillum* han demostrado un gran potencial como promotores de crecimiento vegetal [31]. Casi todas las bacterias dentro del género son endófitas fijadoras de nitrógeno, aunque también bacterias obtenidas de aislamientos ambientales y clínicos pertenecen al género. Están incluidas dentro del mismo las especies *H. chlorophenolicum*, *H. lusitanum*, *H. frisingense* y *H. rubrisulbanbicans*. Asociadas a plantas, tanto especies endófitas como aquellas patógenas, las bacterias de *Herbaspirillum* han sido halladas en gramíneas, en dicotiledóneas y en nódulos en raíces de leguminosas [32]. La fuente de carbono preferida son los ácidos orgánicos como malato, piruvato, succinato o fumarato, aunque también son capaces de catabolizar glicerol, D-glucosa, manitol y sorbitol. Los diazótrofos de *Herbaspirillum* forman una película característica debajo de la superficie en medio semisólido sin nitrógeno agregado, ya que pueden fijar el atmosférico bajo condiciones microaerófilas [32].

La primer especie definida dentro del género fue precisamente *H. seropedicae*, en Seropedica, Brasil. Se trata de un diazótrofo que coloniza y sobrevive dentro de plantas de gramíneas como el arroz, el maíz y la caña de azúcar, y tiene baja supervivencia en el suelo rizosférico [33]. Se ha visto que *H. seropedicae* es capaz de colonizar la superficie radicular y los tejidos internos de toda la planta, y también de expresar genes *nif* (codificantes del complejo nitrogenasa y otras enzimas participantes en la fijación de nitrógeno) en raíces y partes aéreas de maíz, sorgo, trigo y arroz [34].

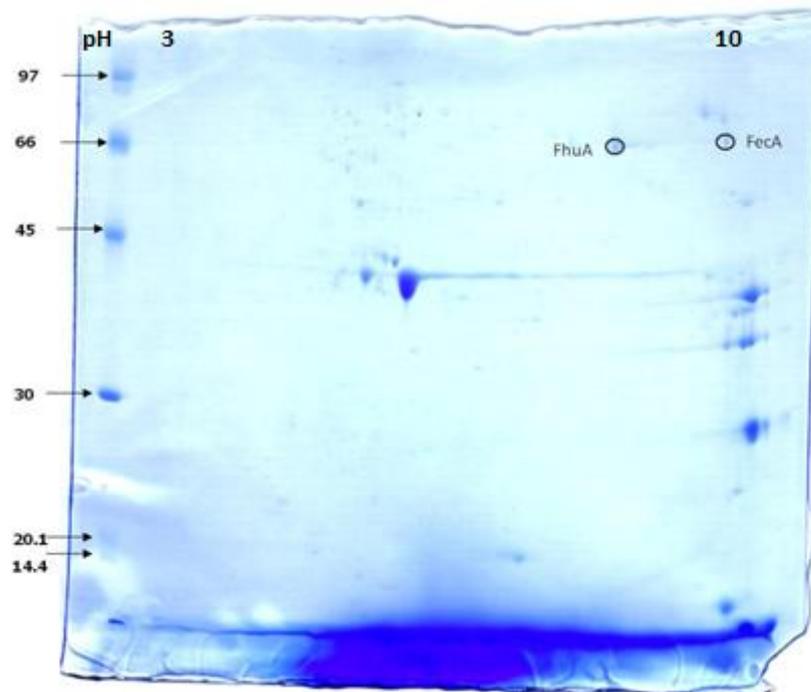
Algunos autores plantean que la vía de colonización de la planta hospedera por el endófito *Herbaspirillum*, comienza por la adhesión a la superficie radicular de la misma. Es por este motivo que su genoma porta genes que codifican para pili, polisacáridos de superficie, sistemas de secreción de proteínas, flagelos, proteínas quimiotácticas, sistemas de captación de

sideróforos férricos, etcétera [5]. De acuerdo a Balsanelli *et al.* [35] los lipopolisacáridos (LPS) intactos son indispensables para la adhesión inicial, al mismo tiempo que hacen a la bacteria menos sensible a los metabolitos de defensa de la planta. Mutantes carentes en *rfbB* y *rfbC*, dos genes de síntesis de ramnosa, un componente de los LPS, muestran defectos en la colonización de maíz y mayor sensibilidad a las defensas vegetales. A continuación se da la penetración de la raíz por los puntos de emergencia de las raíces laterales. No fueron encontrados genes que codifiquen para enzimas que degraden la pared celular de la planta, por lo que su penetración dependería únicamente de las discontinuidades naturales en la epidermis vegetal [36]. Posteriormente el endófito coloniza el espacio intercelular de la raíz, el aerénquima y las células corticales; así como también vasos de xilema en tallo y hojas [34, 35, 37].

El genoma de *H. seropedicae* SmR1 consiste en un único cromosoma circular con un contenido G+C del 63%, codificando 3108 proteínas con función asignada, 497 con funciones generales predichas y 1130 de función desconocida. En él encontramos al menos 27 genes involucrados en el transporte y metabolismo de hierro, incluyendo 17 receptores de sideróforos TonB-dependientes y un sistema tipo ABC de captación de sideróforos [36]. Entre estos receptores dependientes de TonB, se encuentran proteínas transportadoras de hemina, receptores para sideróforos, receptores de hemoglobina, transferrina y lactoferrina. El genoma de *H. seropedicae* SmR1 posee dos genes homólogos al regulador Fur (Hsero\_0608 y Hsero\_4298), y ninguno homólogo a RirA, por lo que probablemente la regulación de los genes de adquisición de hierro sea a través de Fur. Es probable que la captación de hierro sea vía transporte activo con sistemas tipo ABC y complejos TonB-ExbB-ExbD; y que la gran cantidad de receptores de hierro le confieran a estos endófitos alta competitividad en ambientes limitados en hierro para con otras bacterias [36].

### VIII. Antecedentes

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio demostraron que los mecanismos de adquisición de hierro son esenciales para una efectiva fijación de nitrógeno en *H. seropedicae* Z67 [38]. Mediante análisis de MALDI -TOF de proteínas de membrana externa expresadas en cultivos de *H. seropedicae* Z67 crecidos en medios con baja disponibilidad de hierro (Fig. 3), identificamos al producto del gen *fecA* (GeneID: 9401878) homólogo al de *E. coli*.



**Figura 3.** Gel bidimensional de fracciones de membrana externa de *H. seropedicae* Z67 crecida en medio NFb-malato sin agregado de hierro. A la izquierda de la imagen se observa el marcador de peso molecular LMW (GE Health Care), y en cada banda se indica su correspondiente peso molecular (en KDa). Se muestra el spot de la proteína codificada por el gen *fecA* (FecA), identificada por MALDI-TOF con un 26% de cobertura. Puede observarse también el spot correspondiente al producto de *fhuA* (Hsero\_0948), receptor específico del sideróforo producido por *H. seropedicae*.

### *IX. Hipótesis*

Como hipótesis nos planteamos que la cepa *H. seropedicae* Z67 puede utilizar citrato férrico como fuente de hierro, y que lo internaliza a través del transportador de membrana externa codificado por el gen *fecA*.

### *X. Objetivos*

El objetivo central de este trabajo es estudiar el mecanismo de adquisición de hierro mediado por citrato férrico internalizado a través de FecA en *H. seropedicae* Z67.

Como objetivos específicos nos proponemos:

- a) construir y caracterizar un mutante para el gen *fecA* tanto en *H. seropedicae* Z67 [33] como en *H. seropedicae* 4.3, una mutante derivada de Z67 no productora de sideróforos construida en nuestro laboratorio;
- b) estudiar las diferencias de crecimiento entre la cepa salvaje Z67, la cepa 4.3 y las mutantes construidas, bajo diferentes condiciones de disponibilidad de hierro y citrato férrico;
- c) realizar estudios de expresión del gen *fecA* mediante el gen reportero *lacZ* utilizado en la construcción de las mutantes;
- d) estudiar la persistencia de las cepas salvaje Z67, la mutante 4.3 y la mutante *fecA*<sup>-</sup> derivada de 4.3 en plantas de arroz de la variedad Tacuarí.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **Análisis *in silico***

Se buscaron posibles homólogos al gen *fecA* de *E. coli* K12 (GeneID: 946427), en el genoma de la cepa secuenciada de *H. seropedicae* SmR1, utilizando la herramienta BLAST-x presente en el sitio web del NCBI (*National Center of Biotechnology Information* - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Se realizó también un estudio de los dominios Pfam del producto del gen *fecA* homólogo al de *E. coli* utilizando la herramienta disponible en la web (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>).

### **Bacterias y medios de cultivo**

Las cepas utilizadas para este proyecto fueron *H. seropedicae* Z67 [33] y la cepa *H. seropedicae* 4.3, una mutante isogénica no productora de sideróforos, que se cultivaron en medio rico TY o medio mínimo NFb-Malato (Ver Anexo), a 30°C y con agitación a 190 rpm. Cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$  y TOP10 se cultivaron en medio LB (Ver Anexo), y fueron incubadas a 37°C.

Los antibióticos utilizados fueron ácido nalidíxico 5  $\mu$ g/ml (Nal<sup>5</sup>), kanamicina 50  $\mu$ g/ml (Km<sup>50</sup>), ampicilina 50  $\mu$ g/ml (Amp<sup>50</sup>), gentamicina 5  $\mu$ g/ml (Gm<sup>5</sup>), y tetraciclina 5  $\mu$ g/ml (Tc<sup>5</sup>).

### **Extracción de ADN genómico de *H. seropedicae* Z67**

El protocolo utilizado para la extracción de ADN genómico fue el propuesto por William & Feil (*DNA Isolation Bacterial CTAB Protocol* – [my.jgi.doe.gov/general/protocols.html](http://my.jgi.doe.gov/general/protocols.html)), con algunas modificaciones. A partir de un cultivo puro de *H. seropedicae* Z67 en medio sólido TY Nal<sup>5</sup>, se repicó una colonia a 5 ml de TY Nal<sup>5</sup> e incubó a 30°C con agitación durante 24 horas. Para concentrar las células 1,5 ml del cultivo se centrifugó por 10 minutos a 10800 g. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* celular con la ayuda de un vortex en 1 ml de TE (Ver Anexo). De dicha suspensión se tomó 740  $\mu$ l, que se colocaron en un tubo eppendorf

limpio. Se agregaron 20 µl de lisozima 100 mg/ml para la lisis celular, incubando 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 40 µl de SDS 10% y 8 µl de proteinasa K 10 mg/ml, y se incubó a 37°C durante 1 hora. Seguidamente se agregaron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de CTAB/NaCl (Ver Anexo), incubando a 65°C por 10 minutos. Se llevaron a cabo luego dos extracciones orgánicas: la primera con 500 µl de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) centrifugando a 13000 g por 10 minutos. Se transfirió la fase acuosa a un eppendorf nuevo, y se realizó la segunda extracción con 500 µl de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) centrifugando durante 10 minutos a 13000 g. Nuevamente se transfirió la fase acuosa a otro eppendorf, se adicionaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos para precipitar el ADN, seguido de una centrifugación a 13000 g por 15 minutos. Se lavó el *pellet* con etanol 70% (v/v) frío y se eliminó el etanol remanente secando el *pellet* a temperatura ambiente durante 20 minutos. Por último se resuspendió el mismo en 20 µl de TE y ARNasa 0,2 mg/ml y se incubó 20 minutos a 37°C. El ADN se almacenó a -20°C.

### **Extracción de ADN plasmídico**

Las extracciones de ADN plasmídico se realizaron por el método de lisis alcalina, según el protocolo propuesto por Sambrook *et al.* [39]. Se inoculó 5 ml de medio líquido con el antibiótico correspondiente, con una colonia aislada en el mismo medio sólido, y se dejó crecer 24 horas con agitación a 37 °C. Para cosechar las células se colocó 1,5 ml del cultivo en un eppendorf y se centrifugó a 13000 g durante 1 minuto a 4°C. Se descartó el sobrenadante y resuspendió el *pellet* en 200 µl de Solución I (Ver Anexo) con ayuda de un vortex. Posteriormente se agregó 200 µl de Solución II preparada en el momento (Ver Anexo), y 200 µl de Solución III (Ver Anexo) siempre mezclando por inversión. A continuación se adicionó 100 µl de cloroformo y se centrifugó a 13000 g a 4°C por 12 minutos. El ADN plasmídico contenido en la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, se precipitó con 0,6 volúmenes de isopropanol en hielo durante 15 minutos. Luego de una centrifugación a 13000 g y 4°C por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se realizó un lavado con etanol 70%. El *pellet* resultante

se secó al vacío en *speedvac* LABCONCO *Centrивap Concentrator*®, y se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada y ARNasa 0,2 mg/ml, incubándose a 37°C por 15 minutos. El ADN se mantuvo a -20°C.

### **Reacciones de amplificación por PCR**

Una región de aproximadamente 2460 pares de bases del genoma de *H. seropedicae* Z67 conteniendo el gen homólogo a *fecA* se amplificó con los primers FecAsense (5'-GAAGATCTAAGAAGCCGATGGACGCCGAG-3') y FecAantisense (5'-GAAGATCTCGGGCCGCGGATCAGAATG-3'). El programa utilizado para el diseño de los cebadores específicos fue el *Primer Select* del paquete Lasergene DNASTar® (<http://www.dnastar.com/t-sub-products-lasergene-primerselect.aspx>). A estos cebadores diseñados se les incluyó en sus extremos 5' sitios de corte para la enzima de restricción BglII (bases subrayadas).

Para la obtención de amplificadas con extremos terminales romos se utilizó la polimerasa Pfu, que tiene actividad correctora de pruebas 3'→5'. La mezcla de reacción de 50 µl se realizó con 5 µl de buffer 10X, 4 µl de la solución de MgSO<sub>4</sub> 25 mM, 2 µl de un mix de dNTPs 5 mM, 5 ng de ADN genómico, 1 µl de cada cebador 10 µM, 1,25 unidades de polimerasa, 2,5 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) y agua bidestilada hasta completar los 50 µl finales. El ciclo de reacción, llevado a cabo en un termociclador Thermo Px2®, comenzó con un ciclo de 5 minutos de desnaturalización inicial a 95°C; seguido de 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de hibridación a 57°C y 3 minutos de elongación a 72°C; y por último un ciclo de 5 minutos de elongación final a 72°C.

Para confirmar las mutaciones se empleó el mix de polimerasas High Fidelity Enzyme (Fermentas), que no tiene actividad correctora de prueba pero sí posee actividad nucleotidil transferasa terminal, y permite amplificar fragmentos más grandes, de hasta 10 kilobases (Kb). Las mezclas de reacción para un volumen final de 50 µl consistieron en 2,5 µl de buffer 10X con MgCl<sub>2</sub>, 1 µl de un mix de dNTPs 5 mM, como molde de ADN se picó una colonia aislada

de medio sólido, 0,5 µl de cada cebador 10 µM, 1,25 unidades de polimerasa y agua bidestilada hasta completar los 50 µl finales. El programa de ciclado, realizado en el termociclador Thermo P<sub>x</sub>2®, inició con 3 minutos de desnaturalización inicial a 94°C; siguió con 10 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos de hibridación a 57°C y 7 minutos de elongación a 68°C; a continuación 20 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de hibridación a 57°C y 8 minutos de elongación a 68°C; finalizando con un ciclo de elongación final a 68°C durante 10 minutos.

En el caso de las reacciones PCR a partir de colonias, se colocó en el tubo de PCR la mezcla de reacción sin la polimerasa y se calentó en el termociclador 20 minutos a 95°C. Luego se agregó la enzima y se amplificó en el termociclador con el programa adecuado.

### **Visualización y cuantificación del ADN**

Para la visualización de las muestras de ADN se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa 0,8% (p/v) en buffer TAE (Ver Anexo). Las corridas se realizaron durante 60 minutos a 100 mV. Para la detección se empleó el agente intercalante GoodView® (Beijing SBS Greentech Co., Ltd.) a una concentración de 0,5 g/ml y la detección del ADN se realizó bajo luz U.V.

La cuantificación y estimación de los tamaños de las muestras fueron llevadas a cabo mediante comparación con un estándar comercial de concentración conocida correspondiente a 1kb DNA ladder® (Fermentas).

### **Extracción de ADN a partir de geles de agarosa**

Para la extracción de ADN de una banda de gel de agarosa se utilizó el *kit* comercial QIAquick (QIAGEN), siguiendo el protocolo sugerido por los fabricantes. Una vez cortada y pesada la banda de gel conteniendo el fragmento de ADN de interés, se colocó en un eppendorf y se agregaron 3 volúmenes de buffer QG, incubándose a 50°C por 10 minutos, vortexeando cada 2 a 3 minutos para ayudar a disolver el gel. Seguidamente, se adicionó 1 volumen de

isopropanol y se colocó la mezcla sobre una columna incluida en el *kit*, y se centrifugó a 14000 g durante 1 minuto. Se descartó el flujo que atravesó la columna, y se agregaron 750 µl de buffer PE para lavar la columna, centrifugándose a las mismas condiciones de velocidad y tiempo que en el paso anterior. Se descartó el flujo que atravesó la columna, y nuevamente se realizó otra centrifugación igual. A continuación, se colocó la columna en un eppendorf limpio y se agregaron 50 µl de buffer EB para eluir el ADN retenido en la columna, mediante una centrifugación a 14000 g por 1 minuto. El ADN extraído luego se guardó a -20°C.

### **Reacciones de digestión con enzimas de restricción**

Las digestiones con enzimas de restricción fueron realizadas de acuerdo a las sugerencias del fabricante Promega. En todos los casos se utilizó una concentración enzimática de 0,3 a 0,5 U/µl y el buffer de reacción suministrado con la enzima. Dependiendo de los requerimientos se utilizaron distintas concentraciones de ADN en las diferentes digestiones.

### **Reacciones de ligación de ADN**

Las reacciones de ligación se realizaron según las especificaciones del fabricante, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) a una concentración de 400 U/µl y el buffer de reacción suministrado. Esta enzima cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5' y 3' del ADN, pudiendo unir tanto extremos cohesivos como romos. Se utilizó una relación vector:inserto de 1:5 (v:v) empleando la concentración óptima de vector de ADN sugerida. Se incubó la reacción durante toda la noche a 4°C.

### **Preparación de células competentes**

Las células competentes se prepararon de acuerdo al protocolo de Sambrook et al. [39]. Partiendo de un cultivo de *E. coli* DH5α o TOP10, crecido 24 horas a 37°C en placa de medio LB, se repicó una colonia aislada a 5ml de LB líquido incubándose 24 horas a 37°C con agitación. Se preparó una dilución de 1/100 del cultivo anterior en 150 ml de LB, y se incubó a

37°C con agitación durante 2 horas aproximadamente, hasta unas  $10^7$  células/ml (DO a 620 nm entre 0,2 y 0,3). Para continuar se concentraron las células en tubos estériles y enfriados previamente, mediante centrifugación a 2600 g y 4°C durante 5 minutos. El *pellet* se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M frío por cada 50 ml de cultivo original, y se mantuvo en hielo durante 40 minutos. Se concentraron las células igual que en el paso anterior, y se resuspendió el *pellet* con golpes suaves alternando con períodos de hielo, en 500 µl de CaCl<sub>2</sub> 0,1 M Glicerol 15% frío por cada 50 ml de cultivo original. Finalmente se alicuotaron las células competentes de a 100 µl y se almacenaron a -80°C.

### **Transformación de células competentes**

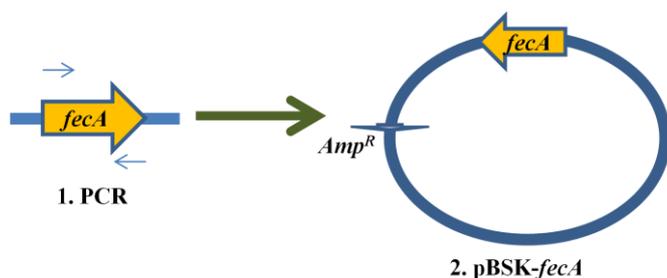
Las transformaciones de células con ADN foráneo se llevaron a cabo por el método del shock térmico según el protocolo de Sambrook *et al.* [39]. A una alícuota de 100 µl de células competentes previamente preparadas, se le agregaron 10 µl del plásmido de interés a una concentración de 50 ng/ml. Se dejó 10 minutos en hielo, luego 90 segundos a 42°C y nuevamente 2 minutos en hielo. A continuación se agregó 1 ml de LB y se dejó crecer 1 hora a 30°C con agitación. Culminado este período, se procedió a plaquear 100 µl de las células transformadas en placas de LB, antibiótico para seleccionar transformantes y marcador para la selección de recombinantes. En el caso de que el ADN foráneo a introducir proviniera de una ligación previa, se plaquearon también 100 µl de una solución de las células transformadas concentrada mediante centrifugación a 2700 g por 5 minutos. Las placas se incubaron toda la noche a 37°C.

### **Construcción de las mutantes *fecA*<sup>-</sup>**

La estrategia diseñada para la construcción de la mutación del gen *fecA* es la que se detalla a continuación.

### I. Clonado de *fecA* en pBSK

En primer lugar se extrajo el ADN genómico de la cepa Z67 según el protocolo descrito previamente, y el ADN extraído se visualizó mediante una electroforesis. Utilizando como molde dicho ADN extraído, se amplificó por PCR la región de 2463 pb que contiene al gen homólogo a *fecA* y su promotor, empleando los cebadores específicos diseñados, la enzima Pfu polimerasa y el programa de ciclado correspondiente. Luego de una nueva corrida electroforética que separó el fragmento de interés de otros posibles productos de amplificación no específicos, se procedió a extraer el ADN del gel de agarosa con el *kit* QIAquick. Paralelamente se digirió el plásmido pBluescript SK (pBSK *Stratagene*) con la enzima de restricción EcoRV, que deja extremos romos. Seguidamente se ligaron mediante el uso de la T4 ADN ligasa, el fragmento amplificado por PCR al plásmido pBSK, con el fin de obtener el plásmido recombinante pBSK-*fecA* (Fig. 4).



**Figura 4.** Clonado de *fecA* en pBSK.

El producto de la ligación se utilizó para transformar *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes. Las transformantes fueron seleccionadas en placas con medio LB Amp<sup>50</sup> y X-Gal<sup>20</sup>. X-Gal es un sustrato cromogénico que al ser hidrolizado por la enzima  $\beta$ -galactosidasa genera un producto de color azul. La enzima  $\beta$ -galactosidasa se hace funcional por un mecanismo de selección de recombinantes conocido como complementación en  $\alpha$ . Su porción carboxi-terminal es expresada por la célula portadora, y la región amino-terminal de la enzima es aportada por el plásmido. El gen que codifica para esta última porción a su vez contiene un sitio de policlonado en su interior, donde se clona el inserto y lo hace no funcional. Así, sólo cuando la célula es transformada con el plásmido puede sintetizar la enzima de forma completa. Aquellas células

que recibieron un plásmido recircularizado sin inserto, se verán azules; en cambio aquellas que se hayan transformado con un plásmido recombinante con inserto, tendrán su porción amino-terminal de la enzima interrumpida por el inserto, y se visualizarán blancas.

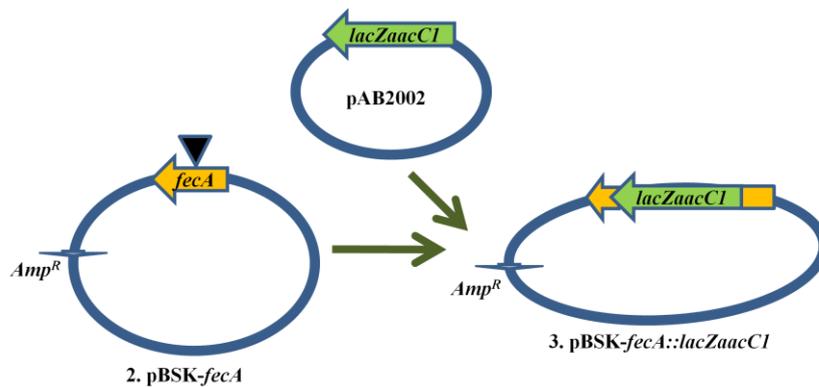
Luego de incubadas a 37°C durante 16 horas, se seleccionaron aquellas colonias blancas que presentaban resistencia a Amp<sup>50</sup>. Entonces se repicaron a 5 ml de LB Amp<sup>50</sup>, se incubaron 24 horas a 37°C, y se guardó una alícuota en Glicerol 25% a -80°C. Se realizó una extracción de ADN plasmídico siguiendo la técnica explicada anteriormente. Se comprobó la presencia del inserto corriendo una electroforesis, comparando la banda resultante con la correspondiente al vector sin inserto.

Para conocer la orientación del inserto en el plásmido, se realizó un perfil de restricción por medio de dos digestiones con las enzimas PstI y NotI, y se analizaron los productos mediante una corrida electroforética.

## II. Interrupción de *fecA* con el *cassette lacZaacCI*

Para comenzar se extrajo el plásmido pAB2002 [40] de un cultivo puro de *E. coli* DH5 $\alpha$  aislado en medio sólido LB Amp<sup>50</sup>Gm<sup>5</sup>. Para extraer el fragmento correspondiente al *cassette lacZaacCI* de aproximadamente 4,2 Kb, que contiene la subunidad  $\beta'$  del gen de la proteína  $\beta$ -galactosidasa y el gen *aacCI* que confiere resistencia a Gm se empleó la enzima SmaI. Al mismo tiempo se digirió el plásmido recombinante pBSK-*fecA* con la enzima EcoRV. Para continuar, se ligaron ambos productos de restricción con la enzima T4 ADN ligasa, con el objetivo de obtener el plásmido pBSK-*fecA::lacZaacCI* (Fig. 5). Con dicho producto de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ , que se incubaron toda la noche a 37°C, y la selección se hizo en medio LB Amp<sup>50</sup> Gm<sup>5</sup> X-Gal<sup>20</sup>.

Se seleccionaron entonces las colonias azules resistentes a Amp<sup>50</sup> y Gm<sup>5</sup>, las cuales se repicaron en 5 ml de LB Amp<sup>50</sup> Gm<sup>5</sup>, crecieron 24 horas a 37°C. Se extrajo el ADN plasmídico de las células de dicho cultivo, y se realizó una electroforesis para comprobar la presencia del inserto. Con el fin de conocer la orientación del *cassette* dentro del gen, se realizó un perfil de restricción con la enzima HindIII, y los productos se analizaron por medio de una electroforesis.



**Figura 5.** Interrupción de *fecA* con el cassette *lacZaacC1*.

### III. Subclonado en pWS233 y pasaje a *E. coli* TOP10

El plásmido pWS233 [41] es un vector suicida en *H. seropedicae*, que posee resistencia a Tc, y los genes *sacRB* que le confieren sensibilidad a la sacarosa. Un vector suicida es aquel que puede ser movilizado a una cepa, pero no puede mantenerse en ella, por lo cual se perderá, a menos que sus genes sufran de recombinación homóloga con genes en el cromosoma bacteriano y se integren al mismo. Primeramente se escindió el inserto *fecA::lacZaacC1* del pBSK-*fecA::lacZaacC1* mediante una digestión parcial con la enzima de restricción BglII, y simultáneamente se digirió el pWS233 con la misma enzima. La digestión del pBSK-*fecA::lacZaacC1* con BglII fue parcial ya que existe un sitio de corte de la enzima en el gen *aacC1* del cassette, que no debía ser digerido, para así obtener el inserto completo de 6,6 Kb (Fig. 14). Se ligaron los dos productos de digestión con la T4 ADN ligasa, para obtener el plásmido pWS-*fecA::lacZaacC1* (Fig. 6) y se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10. La selección se realizó en medio LB Tc<sup>5</sup> X-Gal<sup>20</sup>, las placas se incubaron 24 horas a 37°C, y se seleccionaron las colonias azules resistentes a Tc<sup>5</sup>. Se repicaron a 5 ml de LB Tc<sup>5</sup>, crecieron 24 horas a 37°C. Luego se extrajo el ADN plasmídico de las células de dicho cultivo, y se realizó una digestión con la enzima BglII para comprobar la presencia del inserto, comparando las bandas resultantes con la correspondiente al vector sin inserto.

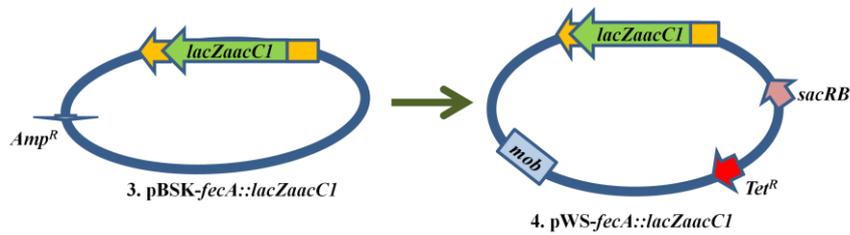


Figura 6. Subclonado en pWS233.

#### IV. Conjugación triparental para obtener pWS-fecA::lacZaacC1 en *H. seropedicae* Z67

La conjugación triparental entre las cepas *E. coli* TOP10 pWS-fecA::lacZaacC1, *H. seropedicae* Z67 y *E. coli* TOP10 pRK2013 se realizó con el fin de movilizar la construcción pWS-fecA::lacZaacC1 a la cepa Z67. El plásmido pRK2013 contiene una resistencia a Km, y genes de transferencia, motivo por el cual es utilizado para movilizar plásmidos.

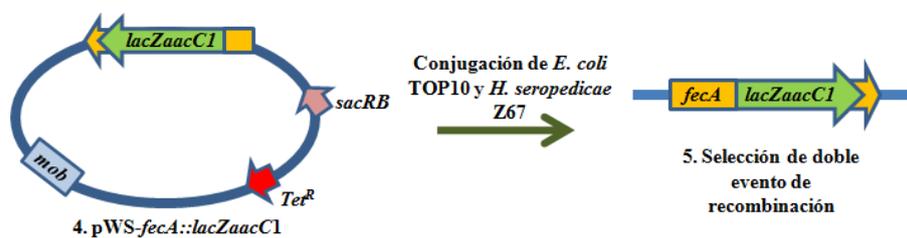
En primer lugar se sembró una placa de LB Tc<sup>5</sup> con *E. coli* TOP10 pWS-fecA::lacZaacC1, otra de LB Km<sup>50</sup> con *E. coli* TOP10 pRK2013, y una de TY Nal<sup>5</sup> con *H. seropedicae* Z67. Pasadas 24 horas a 37°C en el caso de las *E. coli* y a 30°C para *H. seropedicae*, se repicó una colonia de cada placa a los mismos medios líquidos con los correspondientes antibióticos (Tc<sup>5</sup>, Km<sup>50</sup> y Nal<sup>5</sup>, respectivamente), incubados a 37 y 30°C durante toda la noche con agitación. Al día siguiente, se inoculó 5 ml de TY con 100 µl del cultivo de Z67 y se incubó a 30°C con agitación, 5 ml de LB con 5 µl del de la TOP10 pRK2013 y 5 ml de LB con 5 µl del de la TOP10 pWS-fecA::lacZaacC1, ambos incubados a 37°C con agitación. Al cabo de 4 horas se procedió a realizar la conjugación triparental. Ésta consistió en colocar en el centro de una placa con medio TY sin antibióticos una gota conformada por 30 µl de cada una de las 3 cepas. Se realizaron dos controles negativos: uno de las *E. coli*, donde se colocó una gota central en una placa de TY con 30 µl de cada una de las TOP10; y otro de *H. seropedicae*, donde se colocó una gota central con 30 µl de la Z67 en una placa de TY. Las tres placas se dejaron crecer 24 horas a 30°C.

Continuando con la conjugación, se colectó el crecimiento en placa con ayuda de un ansa estéril y se resuspendió con ayuda de un vortex cada uno de los tres crecimientos por separado, en 1 ml de TY. Luego se plaquearon 100 µl de cada uno en TY Tc<sup>5</sup> Nal<sup>5</sup>, y se dejaron crecer 30 horas a 30°C. Cumplido ese tiempo, se obtuvieron colonias aisladas que correspondieron a los

simples eventos de recombinación en la placa correspondiente a la conjugación, pero no así en las placas control.

#### V.Inducción del doble evento de recombinación homóloga

Para obtener el mutante esperado por un doble evento de recombinación, se repicaron varias colonias al azar por separado a 5 ml de TY Nal<sup>5</sup>. Luego de una incubación de 24 horas a 30°C, cada cultivo se diluyó 50 veces. De cada dilución se sembraron 100 µl en dos placas: una de NFb con hierro y sacarosa 8% para comprobar que las células pueden crecer y que la mutación no es letal; y una de NFb sin hierro, sacarosa 8% y X-Gal<sup>20</sup>. La sacarosa se le agrega al medio para seleccionar las colonias que hayan sufrido del doble evento de recombinación, ya que aquellas que posean aún integrado el pWS233, con el gen *sacRB* (por simple evento), serán sensibles al compuesto. Se dejaron creciendo 30 horas a 30°C. Las colonias azules en las placas con X-Gal se seleccionaron como posibles dobles eventos de recombinación (Fig. 7).



**Figura 7.** Conjugación triparental e inducción del doble evento de recombinación.

Este mismo protocolo de conjugación triparental y posterior inducción del doble evento de recombinación se siguió para construir la mutante *fecA* en la cepa *H. seropedicae* 4.3.

#### **Verificación de las mutaciones mediante PCR de colonia**

Varias colonias azules escogidas al azar fueron utilizadas para realizar una reacción de PCR para confirmar si se trataba del mutante buscado. Para estas reacciones se empleó el mix de polimerasas High Fidelity Enzyme, que permitió amplificar el fragmento de aproximadamente 6,6 Kb (4,2 Kb del *cassette lacZaacC1* y 2,4 Kb del gen *fecA*). Los productos se visualizaron mediante una corrida electroforética, y aquellas colonias que dieron como

resultado un fragmento amplificado de 6,6 Kb fueron sujetas a una segunda verificación por *Southern Blot*.

### **Verificación de las mutaciones mediante *Southern Blot***

El ensayo se realizó utilizando el *kit* NEBlot®Phototope® (*New England Biolabs*). En este *kit* el marcado de la sonda de hibridación se realiza por incorporación de biotina mediante una reacción de amplificación con cebadores aleatorios. Brevemente, se extrajo el ADN plasmídico de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  pBSK-*fecA* guardada en glicerol, se digirió con la enzima BglII para obtener el gen *fecA* inserto, y se corrió una electroforesis para separar los fragmentos amplificados. Se extrajo el ADN del gel correspondiente a la banda del gen (de 2,4 Kb) que fue luego utilizado como ADN molde para el marcado de la sonda, siguiendo el protocolo incluido en el *kit*. Comenzó por una desnaturalización de 80 ng de ADN molde a 100°C durante 5 minutos, y dejándose luego 5 minutos en hielo. Se centrifugó 1 minuto a 6000 g y a 4°C. Se agregaron 10  $\mu$ l de un mix de marcado 5X, 5  $\mu$ l de un mix de dNTPs y 1  $\mu$ l de Klenow, incubándose a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, se frenó la reacción con 5  $\mu$ l de EDTA 0,2M pH 8, y se precipitó la sonda marcada con 5  $\mu$ l de LiCl 4M y 150  $\mu$ l de etanol absoluto, incubando por 30 minutos a -80°C. Se lavó con etanol 70%, se resuspendió en 20  $\mu$ l de TE 1X y se almacenó a -20°C.

A continuación tuvo lugar la transferencia del ADN del gel de agarosa a una membrana de nitrocelulosa. El ADN genómico extraído de las colonias de *H. seropedicae* Z67 que presentaron el posible doble evento de recombinación se digirió con la enzima SacI, y se realizó una electroforesis con los productos de la misma. Se cortó una membrana de tamaño un poco mayor al gel, se humedeció con agua desionizada y se sumergió en 100 ml de buffer de transferencia SSC 10X (Ver Anexo) durante 5 minutos. Luego se montó un aparato de vacío para la transferencia del ADN, colocándose primero la membrana y sobre ella el gel. Se cubrió el gel con solución depurinizante (Ver Anexo) y se conectó a una bomba de vacío a 30 mbar durante 3 minutos. Luego se quitó la solución, y se cubrió el gel con solución desnaturalizante

(Ver Anexo), conectado a 30 mbar durante 7 minutos. Se descartó la solución anterior, y se neutralizó a 30 mbar con solución neutralizante (Ver Anexo), dejándola actuar por 7 minutos. La transferencia se llevó a cabo durante una hora en buffer SSC 10X a 50 mbar. Se colocó después la membrana entre dos hojas de papel whatman, y se calentó en horno a 68°C durante 20 minutos para secarla. Se expuso la membrana a luz ultravioleta durante 2 minutos para entrecruzar el ADN transferido a la membrana, en un transiluminador FOTODYNE Incorporated®.

Posteriormente se procedió a la hibridación con la sonda, siguiendo el protocolo propuesto por los fabricantes del *kit*. Se humedeció la membrana con buffer SSC 6X y se prehibridó durante 1 hora a 68°C con solución de prehibridación (Ver Anexo). Se desnaturalizó la sonda biotilada por 5 minutos a 100°C y 5 minutos más en hielo. Se puso a hibridar luego la membrana a 68°C durante toda la noche con 20 µl de la sonda agregada a la solución de prehibridación. Transcurrido dicho tiempo, se lavó la membrana dos veces con SSC 2X SDS 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente; luego otro lavado con SSC 0,1X SDS 0,1% durante 15 minutos a 68°C.

La detección del ADN blanco se realizó utilizando el *kit* Phototope®-StarDetection (New England Biolabs), mediante una reacción catalizada con la enzima fosfatasa alcalina, en la que el agente quimioluminiscente es desestabilizado al desfosforilarse. El protocolo inició con un lavado de la membrana con solución de detección A (Ver Anexo), a temperatura ambiente con agitación. Se descartó la solución, y se incubó con una solución de estreptavidina 0,1% a temperatura ambiente por 5 minutos con agitación. Se drenó dicha solución, y a continuación se hicieron dos lavados con solución de detección B (Ver Anexo), con agitación a temperatura ambiente, durante 5 minutos. Luego de descartar la solución anterior, se incubó con una solución de fosfatasa alcalina biotilada 0,1% durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se drenó la solución anterior, y posteriormente se realizaron 3 lavados a temperatura ambiente durante 5 minutos; el primero con solución de detección A, y los siguientes dos con solución de detección C (Ver Anexo), drenando el líquido entre cada lavado. La detección del

ADN se realizó con un buffer CDP 1X y un reactivo CDP 1% incluidos en el *kit*, incubando la membrana durante 5 minutos a temperatura ambiente con agitación.

Finalmente se reveló por autorradiografía. Se drenó la membrana cuanto fue posible, y se expuso a una placa fotográfica en una cámara de exposición en completa oscuridad, durante 30 minutos. Seguidamente se sumergió la placa en líquido revelador durante algunos segundos, luego en agua para lavar, y por último en líquido fijador durante un minuto. Se enjuagó la placa y se puso a secar.

### **Bioensayos**

Para caracterizar a la cepa salvaje Z67 y a las mutantes construidas se realizaron bioensayos en medio mínimo NFb-Malato con diferentes fuentes de hierro según técnica previamente descrita [17]. Se partió de un inóculo primario de cada cepa en NFb-Malato sin hierro incubado a 30°C por 24 horas. Luego se inoculó 10 ml de un inóculo secundario con agente quelante EDDHA 50 µM con 10<sup>6</sup> células del primario en fase exponencial, el cual se dejó crecer la misma cantidad de tiempo y a la misma temperatura, para que las bacteria provinieran de un medio estresado y tuvieran la menor cantidad de hierro disponible y almacenada. Se sembró mediante cultivo incorporado 1 ml de cada cepa en 50 ml de medio NFb-Malato sólido con EDDHA 500 µM. Una vez solidificada la placa, se le perforaron agujeros al agar, y en cada uno se colocó 10 µl de una fuente distinta de hierro, entre ellas citrato de sodio 340 mM, citrato férrico 10 mM, hemina 1mM y FeCl<sub>3</sub> 37 mM como control positivo. Se dejaron crecer 24 horas a 30°C.

### **Ensayos de crecimiento**

#### I.Evaluación de crecimiento en medio sólido por tamaño de colonia

Se partió de un inóculo primario en NFb-Malato sin hierro, pasando 10<sup>6</sup> células del mismo en fase exponencial tardía a 10 ml de inóculo secundario con quelante EDDHA 50 µM. Ambos se dejaron crecer 24 horas a 30 °C.

Para el ensayo se utilizaron placas de Petri con medio mínimo NFb-Malato y diferentes condiciones de hierro:  $\text{FeCl}_3$  37  $\mu\text{M}$ ; agente quelante EDDHA 300  $\mu\text{M}$ ; EDDHA 300  $\mu\text{M}$  y citrato de sodio 100  $\mu\text{M}$ ; y EDDHA 300  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 100  $\mu\text{M}$ . Diluciones seriadas al décimo desde  $10^8$  hasta  $10^3$  ufc/ml se sembraron en dichas placas con multiansa, para las cepas por separado. Las placas se dejaron crecer 48 horas a  $30^\circ\text{C}$ .

## II. Evaluación de crecimiento mediante curvas en medio líquido

En el caso del crecimiento en medio líquido, para poner a punto el procedimiento se ensayaron diversas condiciones de disponibilidad de hierro en medio mínimo NFb-Malato, utilizando como agente quelante EDDHA 50  $\mu\text{M}$ . Al igual que para los ensayos anteriores, se partió de un inóculo primario en NFb-Malato sin hierro. Se midió el crecimiento por densidad óptica a 620 nm, probando diferentes condiciones de suficiencia e insuficiencia de hierro:  $\text{FeCl}_3$  37  $\mu\text{M}$ , EDDHA 50  $\mu\text{M}$ , EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 0,1  $\mu\text{M}$ , EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 1  $\mu\text{M}$  y EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 100  $\mu\text{M}$ . Cada tubo conteniendo 10 ml de medio se inoculó con  $10^6$  células provenientes del inóculo primario en fase exponencial tardía, y se dejó crecer a  $30^\circ\text{C}$  con agitación a 190 rpm. La primera medición se realizó a las 12 horas, y las siguientes cada dos horas a lo largo de 8 a 10 horas.

### **Ensayos de expresión de *fecA***

Utilizando el mismo *cassette lacZ* sin promotor empleado en la construcción de las mutantes, se realizaron ensayos de expresión transcripcional del gen *fecA* midiendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa en cultivos líquidos de medio mínimo NFb-Malato con diferentes condiciones de disponibilidad de hierro. Las condiciones ensayadas fueron las siguientes:  $\text{FeCl}_3$  37  $\mu\text{M}$  como control, EDDHA 50  $\mu\text{M}$ , EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 0,1  $\mu\text{M}$ ; EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 1  $\mu\text{M}$ , EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 10  $\mu\text{M}$  y por último con EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 100  $\mu\text{M}$ .

Luego de 15 horas de incubados con agitación a  $30^\circ\text{C}$ , se midió la densidad óptica de los cultivos a 620 nm para normalizar los datos en los cálculos, ya que no todos los inóculos

crecieron por igual. En tubos eppendorfs se tomaron 200 µl de cada cultivo por separado y se diluyeron en 800 µl de buffer Z (Ver Anexo) con 25 µl de SDS 1%. Seguidamente se agregaron 25 µl de cloroformo a cada eppendorf, y se incubaron 10 minutos a 30°C. Pasado dicho tiempo, se agregaron 100 µl de sustrato orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) 4 mg/ml preparado en el momento con buffer Z, y se incubó a 30°C durante los minutos necesarios para que el contenido de los tubos virara a color amarillo. Rápidamente se detuvo la reacción con 400 µl de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M, se centrifugaron los eppendorfs a 15000g por 15 minutos y se midió la absorbancia a 420 nm. La expresión se midió mediante Unidades Miller [39].

## **Ensayo de colonización de arroz**

### I.Preparación e inoculación de semillas

El primer día se descascararon semillas de arroz de la variedad Tacuarí. A continuación se procedió a esterilizarlas dejándolas 5 minutos en Etanol 70%, y 30 minutos en hipoclorito de sodio 6% con detergente Tritón 0,1%. Luego de 20 lavados con agua destilada estéril, se secaron las semillas en papel absorbente esterilizado y se crecieron 3 días en placas de agar-agua 1% a 30 °C. Transcurrido dicho tiempo, se colocaron las semillas 30 minutos con una suspensión de la cepa a ensayar, a una concentración de 10<sup>5</sup> células/ml en un volumen de 1 ml por semilla. Se lavaron una vez con agua destilada estéril y se transfirieron a tubos conteniendo medio Hoagland (Ver Anexo) (3 semillas por tubo). Se pusieron a crecer durante 8 días a 26°C con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad.

### II.Esterilización superficial de plantas y conteo de bacterias

Las plantas crecidas se esterilizaron superficialmente incubándolas 1 minuto en Etanol 70%, y luego 1 minuto en hipoclorito de sodio 6%. Se lavaron 3 veces en agua destilada estéril, se secaron en papel absorbente esterilizado, se cortó la parte aérea (tallo y hojas) de las tres plantas de cada tubo, y se pesó en placas de Petri estériles previamente pesadas. Seguidamente se maceraron en un homogeneizador con 1 ml de medio NFb. Se plaquearon 5 diluciones seriadas al décimo de cada solución obtenida en el macerado por triplicado en NFb-Malato Na<sup>5</sup>,

y se dejaron crecer 2 días a 30°C. Por último se contó el número de microcolonias de cada placa.

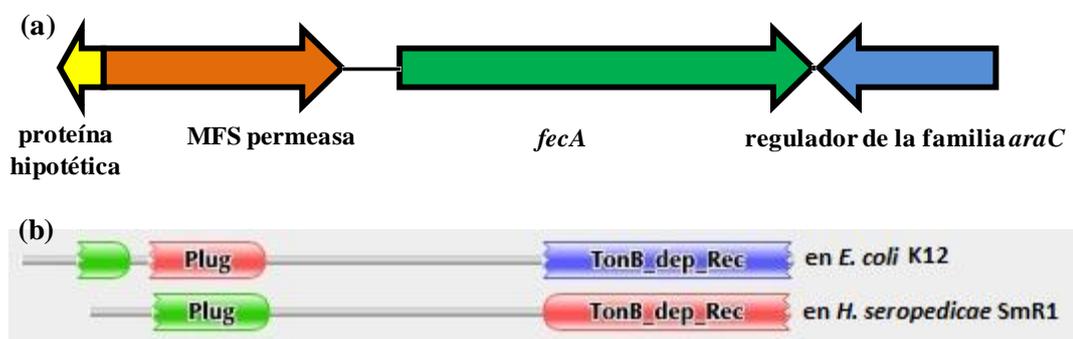
### **Estadística**

Todos los ensayos se repitieron al menos dos veces y las posibles diferencias se analizaron con herramientas estadísticas correspondientes para comprobar diferencias significativas en los ensayos. En el caso de los ensayos de colonización se realizó un análisis de varianza con un p-valor de 0,05 y posteriormente se aplicó el test estadístico de Tukey [42] con un p-valor de 0,05.

## RESULTADOS

### Análisis *in silico*

Mediante el análisis *in silico* del genoma de la cepa secuenciada de *H. seropedicae* SmR1 se logró identificar dos genes anotados como posibles *fecA* para la cepa SmR1 (GeneID: 9401878 y GeneID: 9403212). Al realizar un análisis de las secuencias disponibles, se observó que sólo uno de ellos (GeneID: 9401878) es homólogo al gen *fecA* de *E. coli* (GeneID: 946427), presentando un 42% de identidad. La figura 3 muestra un gel bidimensional de una fracción enriquecida en proteínas de membrana externa de cultivos de *H. seropedicae* Z67 crecidos en condiciones limitantes de hierro. El producto de dicho gen fue identificado mediante MALDI-TOF en dicha fracción. El otro gen anotado como *fecA* tiene solamente un 22% de identidad con el gen de *E. coli*, y un 50% de identidad con el gen homólogo a *fecA* (GeneID: 9401878). El contexto genómico en el cual se encuentra el gen homólogo a *fecA* en *H. seropedicae* SmR1 es el que se muestra en la figura 8a. El gen *fecA* abarca desde la posición 1446854 hasta la 1448965 de la hebra (+). No se han encontrado genes homólogos a *fecBCD* en dicho genoma, así como tampoco genes *fecIR* asociados. Un estudio de los dominios Pfam [43] del producto del gen muestra que FecA no posee el dominio de interacción con FecR característico de los transportadores dependientes de TonB transductores de señales (Fig. 8b) (pFAM PF07660, en *E. coli*), [44].

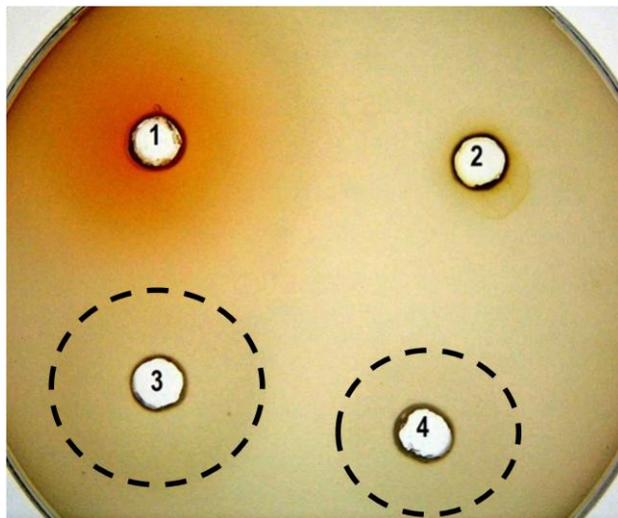


**Figura 8.** (a) Contexto génico de *fecA* en el genoma de *H. seropedicae* SmR1, a un lado el gen de una permeasa de la Superfamilia Mayor de Facilitadores (MFS), al otro el gen de un regulador del metabolismo de la arabinosa (*araC*); (b) Esquema de los dominios Pfam del gen *fecA* en *E. coli* y del homólogo en *H. seropedicae*; en este último caso falta el dominio N-terminal (PF07660).

***Herbaspirillum seropedicae* Z67 es capaz de utilizar citrato férrico como fuente de hierro nutricional**

Bioensayos

Luego de sucesivos bioensayos en medio mínimo NFb-Malato donde se probaron distintas concentraciones de agente quelante EDDHA (100, 300, 500 y 700  $\mu\text{M}$ ), se eligió trabajar a 500  $\mu\text{M}$ , ya que esta concentración permitía el crecimiento de los microorganismos alrededor de los pocillos con las fuentes de hierro, inhibiéndolo en el resto de la placa. En el resultado de los mismos para la cepa salvaje Z67 puede observarse un claro halo de crecimiento alrededor del pocillo de citrato férrico (Fig. 9, pocillo 3). En el pocillo provisto de citrato de sodio (Fig. 9, pocillo 4), aparece un halo de crecimiento más pequeño y menos denso que en el caso anterior. Podemos decir entonces que la cepa Z67 utiliza citrato férrico como fuente de hierro. Como control positivo se ensayó con  $\text{FeCl}_3$  (Fig. 9, pocillo 1). El pocillo conteniendo hemina no mostró ningún halo de crecimiento alrededor (Fig. 9, pocillo 2).



**Figura 9.** Bioensayo de la cepa Z67 en medio NFb-Malato EDDHA 500 $\mu\text{M}$ . Cada pocillo contiene una fuente de hierro distinta: (1)  $\text{FeCl}_3$  37 mM, (2) hemina 1 mM, (3) citrato férrico 10 mM, (4) citrato de sodio 340 mM.

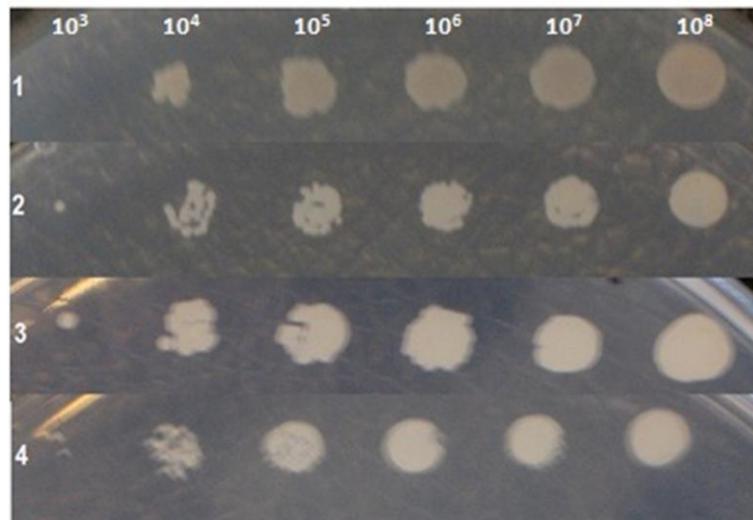
Evaluación del crecimiento

Los ensayos de crecimiento se desarrollaron con el fin de evaluar las diferencias en el crecimiento de la cepa salvaje y las mutantes construidas. Se realizaron dos tipos de ensayo: crecimiento en medio sólido donde se observó el tamaño de colonia de cada cepa, y crecimiento

en medio líquido donde se estimó por densidad óptica, cada cierto intervalo de tiempo, el número de células alcanzado en el cultivo de cada cepa.

#### Crecimiento en medio sólido

Los ensayos muestran que el tamaño de colonia en condiciones limitantes de hierro para la cepa salvaje Z67 (Fig. 10, fila 2) es más pequeño que en presencia de hierro (Fig. 10, fila 1). Al mismo tiempo, el tamaño de colonia en presencia de citrato férrico es similar al tamaño en condiciones de hierro suficientes (Fig. 10, fila 3), lo que revertiría el efecto del quelante. Por el contrario, el agregado de citrato de sodio al medio no logra revertir el efecto del quelante, observándose colonias de tamaño similar al medio con quelante (Fig. 10, fila 4).

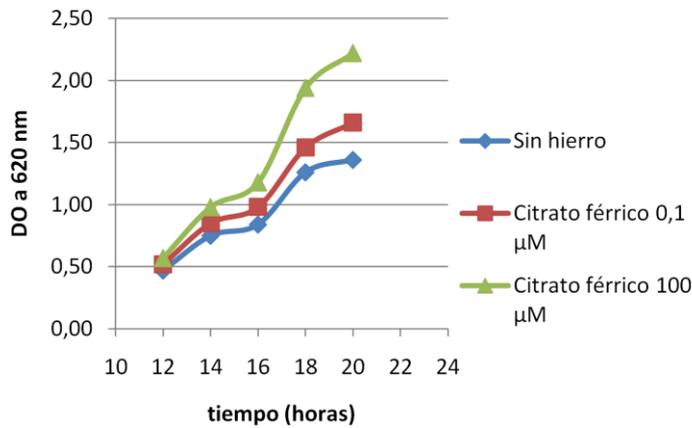


**Figura 10.** Crecimiento de la cepa Z67. Las distintas filas corresponden a medio NFb-Malato con diferentes condiciones de hierro: (1)  $\text{FeCl}_3$   $37\mu\text{M}$ , (2) EDDHA  $300\mu\text{M}$ , (3) EDDHA  $300\mu\text{M}$  citrato férrico  $100\mu\text{M}$ , (4) EDDHA  $300\mu\text{M}$  citrato de sodio  $100\mu\text{M}$ . En cada columna se indica el título de la dilución en ufc/ml.

#### Crecimiento en medio líquido

Para las primeras curvas de crecimiento construidas se partió de un inóculo sin hierro de la cepa Z67. Las condiciones estudiadas fueron: sin hierro, con citrato férrico  $0,1\mu\text{M}$  y citrato férrico  $100\mu\text{M}$ . Los resultados muestran que con el agregado de citrato férrico al medio, tanto

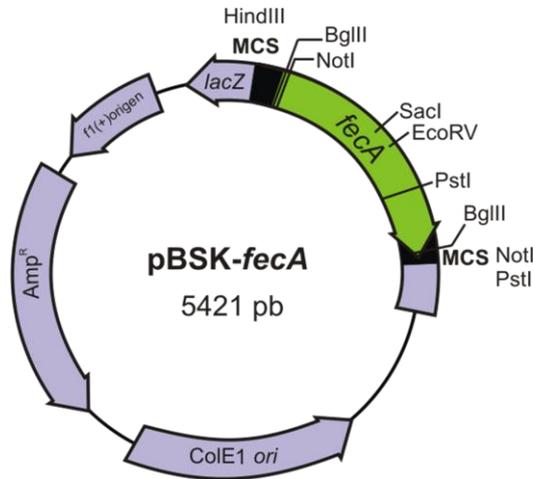
0,1 como 100  $\mu\text{M}$ , la densidad óptica alcanzada por los cultivos es mayor que en ausencia de hierro (Fig. 11).



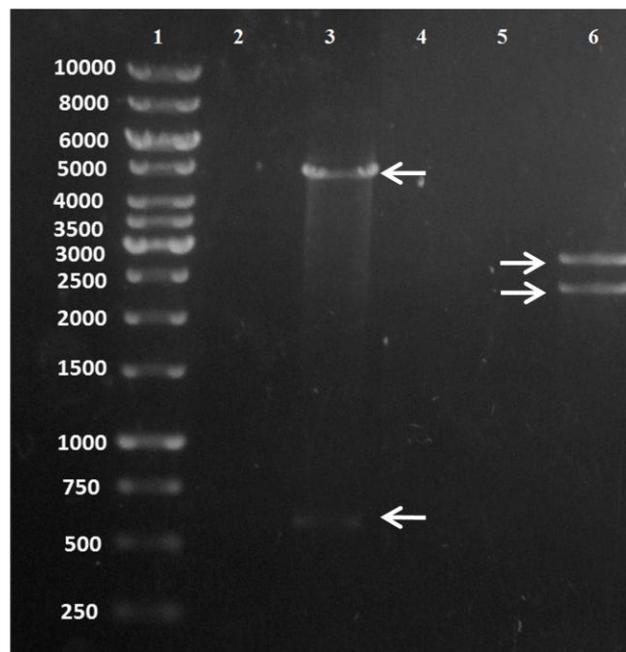
**Figura 11.** Curvas de crecimiento construidas con la cepa Z67, partiendo de un inóculo primario sin hierro. El experimento se repitió dos veces obteniendo resultados similares.

### Construcción de las mutantes *fecA*<sup>-</sup>

El primer paso para la construcción de la mutante fue el clonado del gen *fecA* en el plásmido pBSK (Fig. 12). Se repicó una colonia blanca y se aisló el ADN plasmídico. Para verificar la presencia del inserto se realizaron dos digestiones independientes con las enzimas PstI y NotI (Fig. 13). En el caso del clonado en el mismo sentido al *lacZ* presente en el vector, se esperaban fragmentos de unos 70 y 5350 pb con la enzima NotI y de 1900 y 3520 pb con la PstI. Para el clonado en sentido opuesto al *lacZ*, se esperaban fragmentos de unos 2470 y 2950 pb con NotI y de 580 y 4840 pb con PstI. El patrón de digestión obtenido para el plásmido aislado corresponde al sentido KS opuesto al gen *lacZ*, debido a la presencia de fragmentos de aproximadamente 2470 y 2950 pb en la digestión con NotI y fragmentos de 580 y 4840 pb en la digestión con PstI (Fig. 13).



**Figura 12.** Esquema de la construcción pBSK-*fecA*, donde se muestran los sitios de corte de algunas enzimas utilizadas.

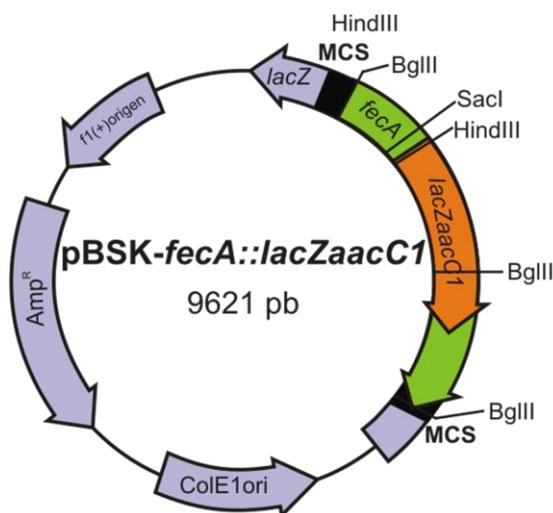


**Figura 13.** Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las digestiones con las enzimas PstI y NotI para comprobar el sentido de inserción del gen *fecA* en el pBSK. En el primer carril se sembró el marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas); en cada banda se indican los pares de bases estimados para la misma. El carril 3 se corresponde con la digestión del posible plásmido pBSK-*fecA* aislado de un clon con la enzima PstI. En el carril 6 se sembró la digestión del pBSK-*fecA* con la enzima NotI.

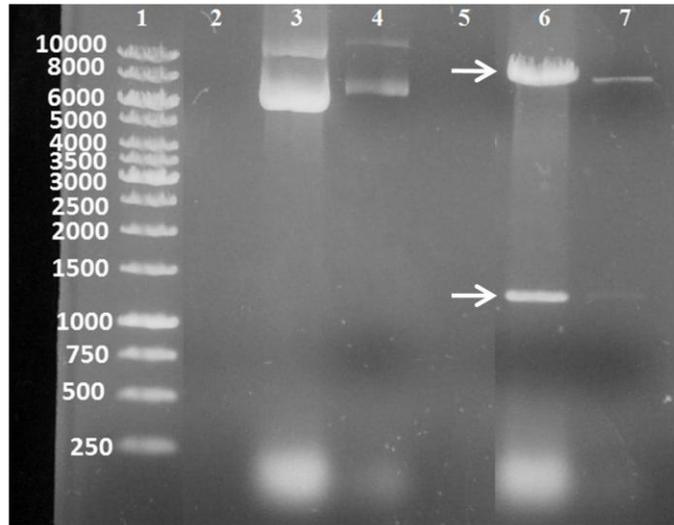
El siguiente paso de la estrategia consistió en la interrupción del gen *fecA* con el *cassette lacZaacCI* obtenido del plásmido pAB2002 (Fig. 14). Se aisló el ADN plasmídico de dos colonias diferentes, se verificó la presencia del inserto mediante una corrida electroforética y se

comprobó la orientación del mismo mediante la digestión con la enzima HindIII (Fig. 15). Si el *cassette* se insertaba en el mismo sentido que *fecA*, en la digestión con la enzima HindIII se esperaban fragmentos de aprox. 1280 y 8340 pb. En cambio, si lo hacía en sentido opuesto a *fecA*, se esperaban fragmentos de unos 4140 y 5480 pb. De acuerdo a los resultados, en ambos plásmidos aislados, el *cassette* se insertó en el mismo sentido que el gen *fecA*, sentido que se buscaba para poder llevar a cabo los ensayos de expresión posteriores (Fig. 15).

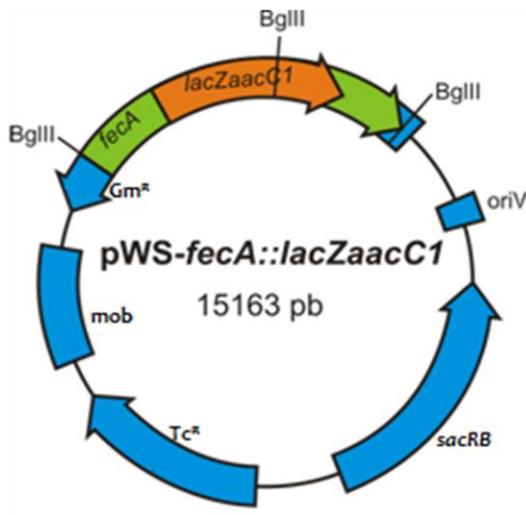
A continuación se escindió el gen interrumpido con el *cassette* del plásmido pBSK-*fecA::lacZaacC1* para subclonarlo en el plásmido pWS233 (Fig. 16), para lo cual se utilizó la enzima de restricción BglII. Sitios de restricción para dicha enzima fueron agregados en los extremos de los cebadores FecAsense y FecAantisense, ya que existía en el pWS233 un sitio único de corte para la enzima, donde se podría clonar el inserto. Se extrajo el ADN plasmídico de cuatro colonias aisladas y la presencia del inserto fue verificada mediante una digestión con la misma enzima (Fig. 17), en la cual se esperaban fragmentos de 1480, 5180 y 8500 pb aprox.



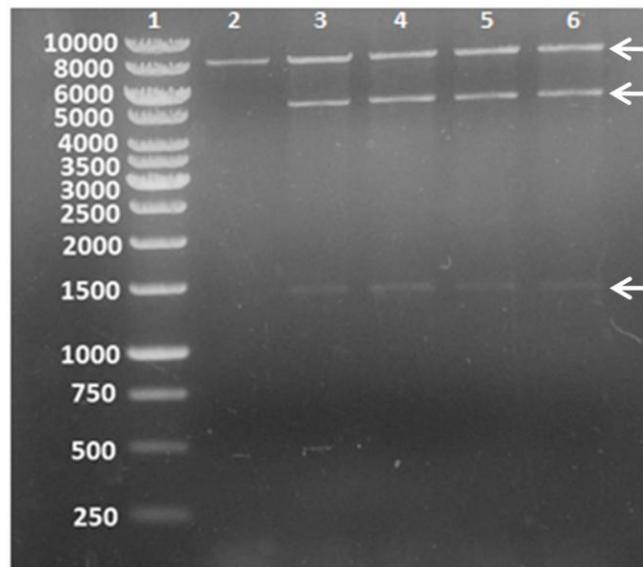
**Figura 14.** Esquema de la construcción pBSK-*fecA::lacZaacC1*, donde se muestran los sitios de corte de algunas enzimas utilizadas.



**Figura 15.** Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las extracciones de los plásmidos pBSK-*fecA::lacZaacC1* y las digestiones con la enzima HindIII para comprobar el sentido de inserción del *cassette lacZaacC1* en el pBSK-*fecA*. En el primer carril se sembró el marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas), en cada banda se indican los pares de bases estimados para la misma, en los carriles 3 y 4 dos plásmidos recombinantes pBSK-*fecA::lacZaacC1* sin digerir. Luego en los carriles 6 y 7 se sembraron las digestiones con HindIII de los dos plásmidos recombinantes.



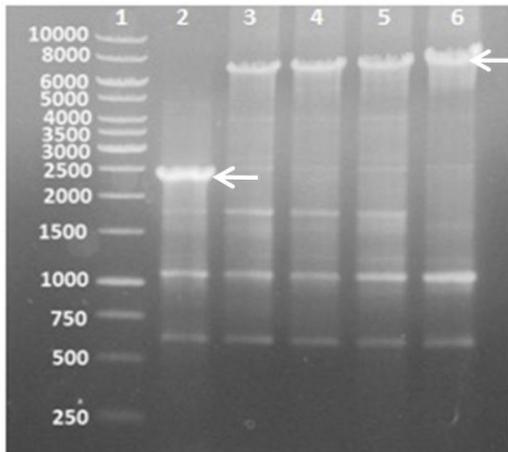
**Figura 16.** Esquema de la construcción pWS-*fecA::lacZaacC1*, que luego se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* TOP10.



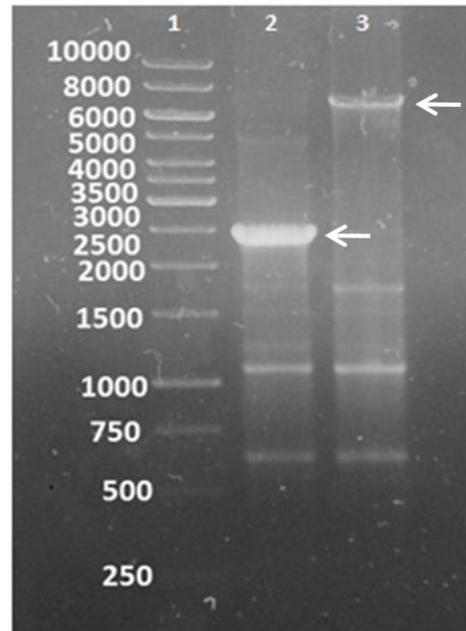
**Figura 17.** Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las digestiones de los plásmidos recombinantes pWS-*fecA::lacZaacC1* con la enzima BglII para verificar la presencia del inserto *fecA::lacZaacC1*. En el primer carril se sembró el marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas), en cada banda se indican los pares de bases estimados para la misma; el carril 2 muestra el plásmido pWS233 digerido con BglII. Los carriles 3, 4, 5 y 6 se corresponden con plásmidos digeridos con la enzima.

Se llevó adelante luego la conjugación triparental y la posterior inducción del doble evento de recombinación homóloga para obtener al fin las mutantes esperadas, Z67 y 4.3 con su gen *fecA* no funcional. Las mutaciones fueron verificadas mediante dos procedimientos. Primeramente se realizó una PCR de colonia con el mix de enzimas High Fidelity Enzyme y los cebadores diseñados FecAsense y FecAantisense (Figs. 18 y 19). En los geles de las corridas electroforéticas de estas PCR para ambas cepas, además de visualizarse la banda de unas 6,6 Kb esperada para las mutaciones, pueden observarse también otras bandas producto de amplificaciones inespecíficas. En segunda instancia se confirmaron tres de las mutantes derivadas de Z67 por *Southern Blot* (Figs. 20 y 21), digiriendo con la enzima SacI a dos concentraciones distintas de ADN: 1,5 ng/μl de reacción (Fig. 20, carriles 3, 5 y 7) y 3,0 ng/μl de reacción (Fig. 20, carriles 4, 6 y 8). Los carriles donde se corrieron estas últimas digestiones

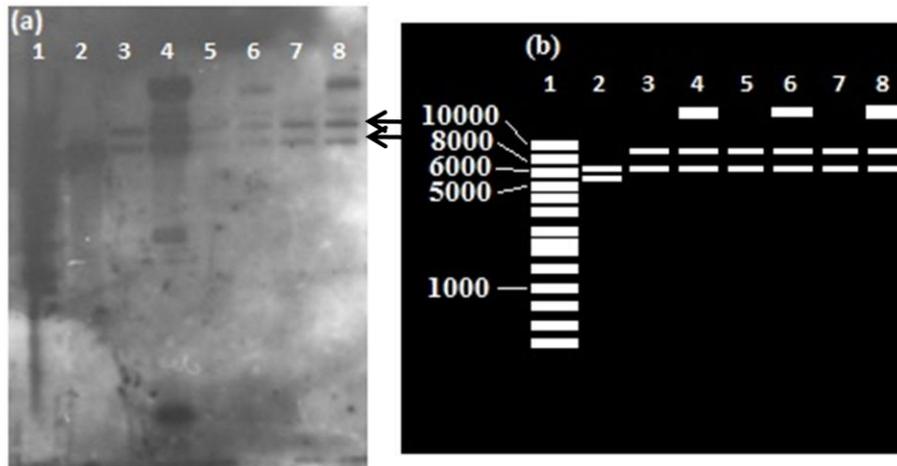
con mayor concentración de ADN, muestran una banda gruesa en la parte superior (por encima de los 10 Kb). Esta banda correspondería a ADN genómico no digerido.



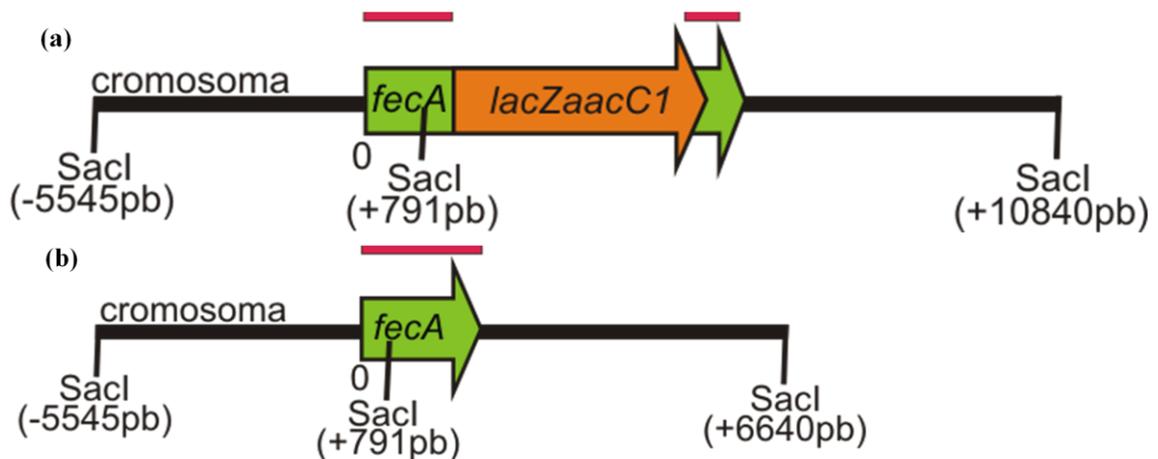
**Figura 18.** Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de las PCR de cuatro colonias de las mutantes del gen *fecA* en Z67. En el primer carril se sembró el marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas), en cada banda se indican los pares de bases estimados para la misma; el carril 2 muestra el ADN genómico de la cepa salvaje, los carriles 3, 4, 5 y 6 se corresponden con los ADN genómicos de 4 colonias con su *fecA* interrumpidos por el *cassette lacZaacC1*.



**Figura 19.** Gel de agarosa 0,8% (p/v) en TAE 1X de la PCR de colonia de la mutante del gen *fecA* en 4.3. En el primer carril se sembró el marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas), en cada banda se indican los pares de bases estimados para la misma. Los carriles 2 y 3 se corresponden con el ADN genómico de la cepa 4.3 y el ADN genómico de una colonia con el *fecA* interrumpido por el *cassette lacZaacC1*, respectivamente.



**Figura 20.** (a) Autorradiografía de la membrana correspondiente al *Southern Blot* que verifica la mutación del gen *fecA* con el *cassette lacZaacC1* en la cepa Z67. En el carril 1 se muestra el marcador de peso molecular 1 Kb DNA ladder (Fermentas), en el 2 el ADN genómico de la cepa salvaje como control. Carriles 3, 5 y 7 corresponden a ADN genómico de 3 colonias mutantes digerido con *SacI* a menor concentración de ADN; y los carriles 4, 6 y 8 a los mismos genómicos digeridos con *SacI* a mayor concentración de ADN. Para ayudar a la comprensión de la imagen, en (b) se muestra un esquema de la autorradiografía. La sonda se construyó por incorporación de biotina mediante una reacción de amplificación con cebadores aleatorios, utilizando como molde el gen *fecA* salvaje.



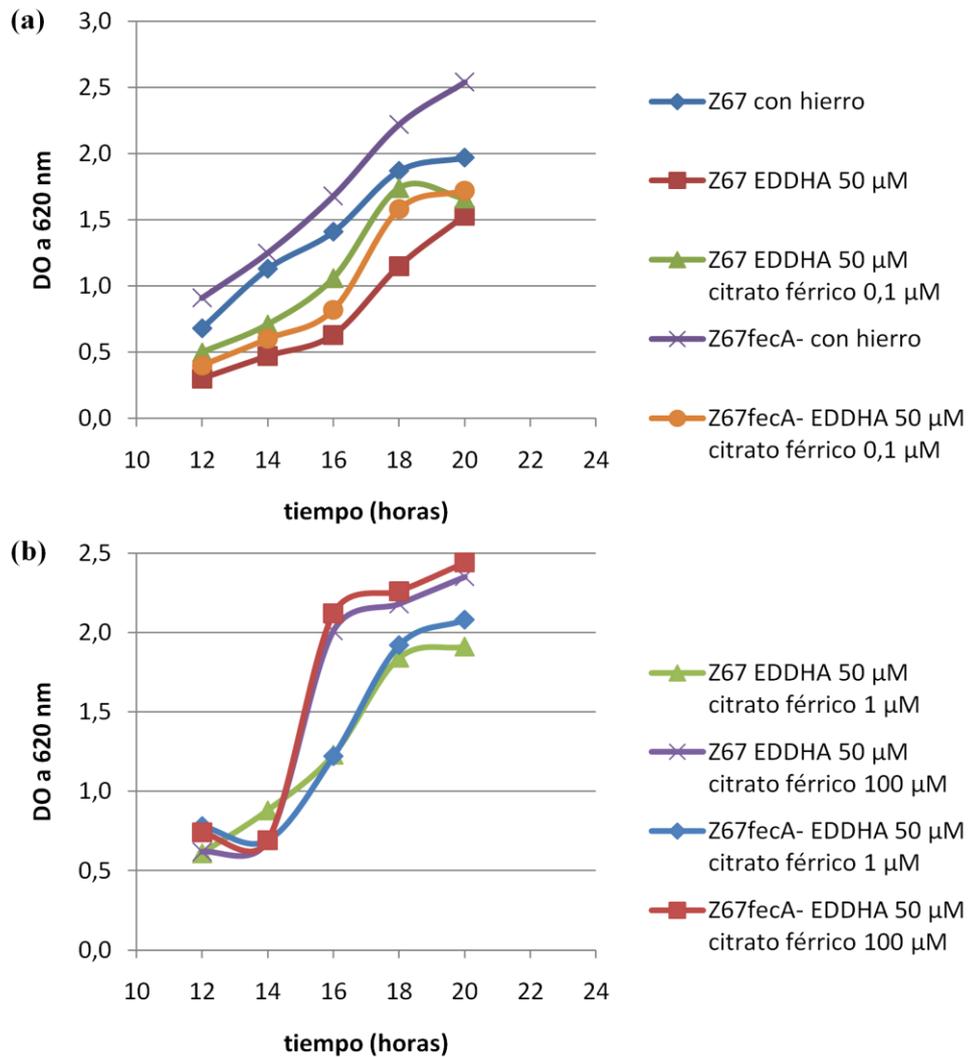
**Figura 21.** (a) Esquema de interrupción del gen *fecA* en el genoma de Z67 y 4.3. (b) Esquema del gen *fecA* en la cepa salvaje. Los segmentos en rojo indican donde hibrida la sonda, y están indicados también los sitios de restricción de *SacI* más cercanos al gen, y dentro del mismo. Se esperó observar en la autorradiografía del *Southern Blot* fragmentos de aproximadamente 6340 y 10050 pb en el caso de la mutante, y fragmentos de 6340 y 5850 pb para la cepa salvaje.

## **Caracterización de las mutantes construidas**

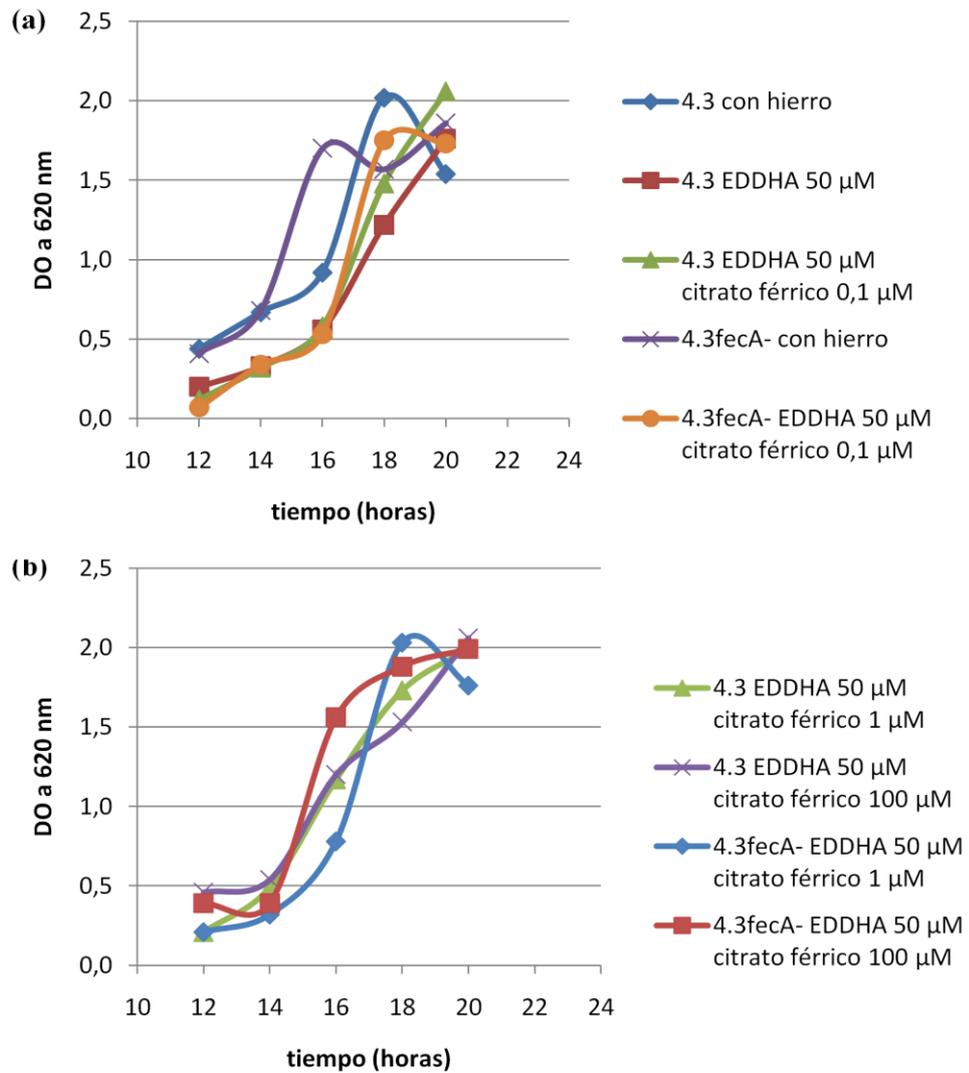
Los resultados de los bioensayos y del estudio de crecimiento en medio sólido realizados con las dos mutantes construidas en este trabajo mostraron que no existen diferencias en el fenotipo con las cepas parentales (datos no mostrados). En el caso de los bioensayos, se observó un halo de crecimiento alrededor del pocillo que contenía citrato férrico, y los tamaños de colonia obtenidos para ambas mutantes fueron similares a los de los parentales, repitiendo el mismo patrón: menor tamaño en presencia de quelante, aumento con el agregado de citrato férrico a la par del tamaño mostrado en el medio con hierro.

## **Estudio del crecimiento de las mutantes**

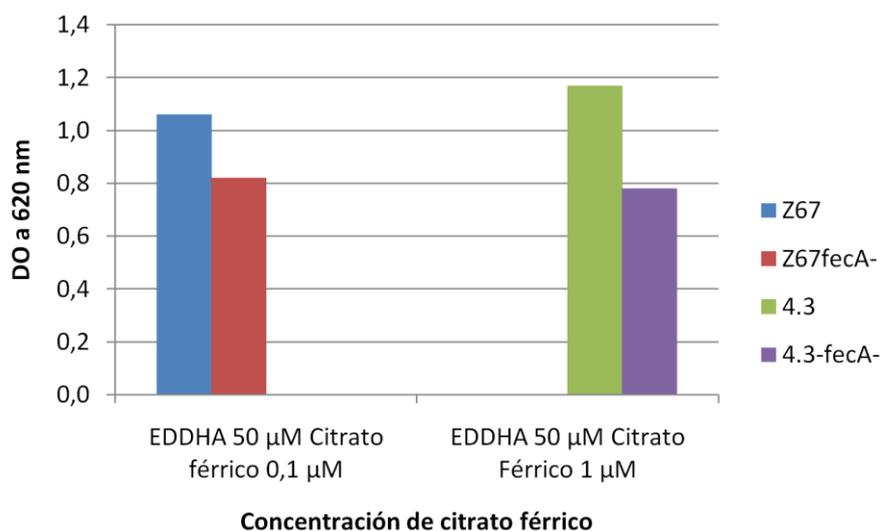
Para la construcción de las curvas de crecimiento en medio líquido se siguieron dos estrategias. En primer lugar se partió de un inóculo sin hierro de cada cepa, en medio NFb-Malato. Las condiciones de disponibilidad de hierro trabajadas en este caso fueron: con hierro  $\text{FeCl}_3$  37  $\mu\text{M}$ ; EDDHA 50  $\mu\text{M}$ ; EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 0,1 $\mu\text{M}$ ; EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 1  $\mu\text{M}$ ; y EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y citrato férrico 100  $\mu\text{M}$ . Los resultados para la cepa Z67 y su mutante derivada Z67-*fecA*<sup>-</sup> muestran que a las 16 horas de incubación y a concentraciones de citrato férrico de 0,1  $\mu\text{M}$  las densidades ópticas alcanzadas por la cepa salvaje son mayores a las de la mutante (DO a 620 nm de 1,06 y 0,82, respectivamente). A concentraciones mayores de citrato férrico los crecimientos de ambas cepas son similares (Figs. 22 y 24). Para la cepa 4.3 y su mutante derivada 4.3-*fecA*<sup>-</sup>, los resultados son similares, pero las diferencias de densidad óptica registradas se observan a concentraciones de citrato férrico de 1 $\mu\text{M}$  (DO a 620 nm de 1,17 y 0,78, respectivamente) (Figs. 23 y 24). Luego de las 16 horas de crecimiento, las densidades tienden a igualarse.



**Figura 22.** Curvas de crecimiento construidas con las cepas Z67 y su mutante en el gen *fecA*, a partir de un inóculo primario sin hierro. Condiciones de hierro: (a) con hierro; EDDHA 50 μM; EDDHA 50 μM citrato férrico 0,1 μM; y (b) EDDHA 50 μM citrato férrico 1 μM, EDDHA 50 μM citrato férrico 100 μM. Sólo se muestra la curva de la cepa parental para el cultivo con EDDHA 50 μM, dado que ambas cepas tuvieron igual crecimiento. El experimento se repitió dos veces, obteniéndose resultados similares.

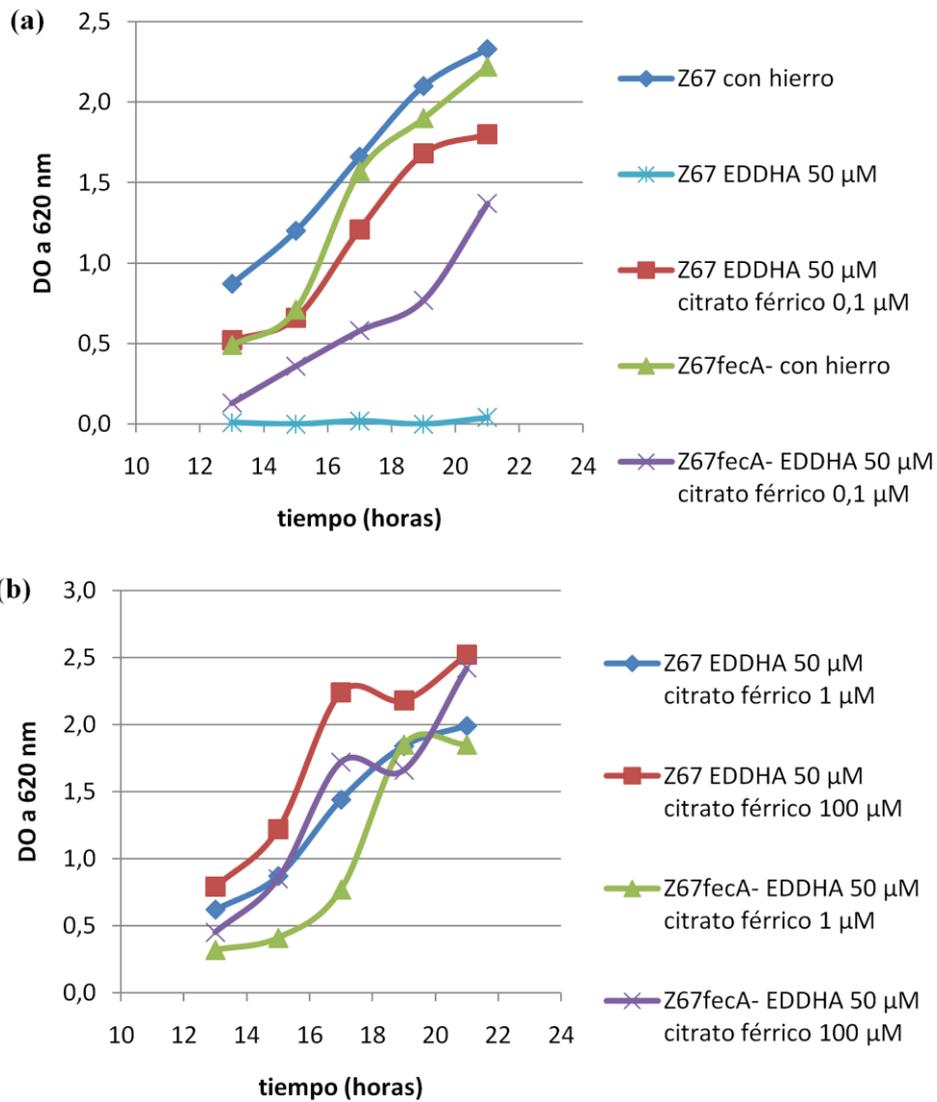


**Figura 23.** Curvas de crecimiento construidas con las cepas 4.3 y su mutante en el gen *fecA*, a partir de un cultivo primario sin hierro. Condiciones de hierro: (a) con hierro; EDDHA 50  $\mu\text{M}$ ; EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 0,1  $\mu\text{M}$ ; y (b) EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 1  $\mu\text{M}$ , EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 100  $\mu\text{M}$ . Sólo se muestra la curva de la cepa parental para el cultivo con EDDHA 50  $\mu\text{M}$ , dado que ambas cepas presentaron igual crecimiento. El experimento se repitió dos veces, obteniéndose resultados similares.

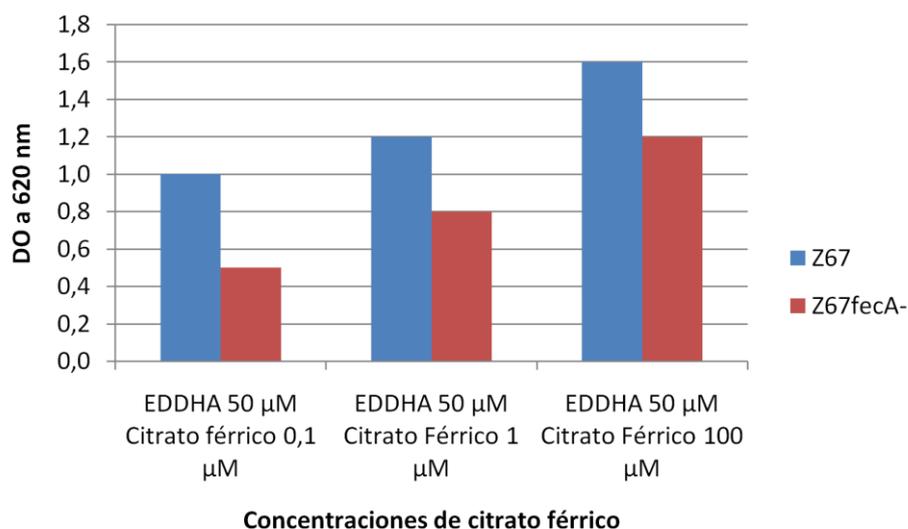


**Figura 24.** Densidades ópticas alcanzadas a las 16 horas de crecimiento, para las cuatro cepas, partiendo de inóculos sin hierro. Se muestran sólo a las concentraciones de citrato férrico donde se visualiza claramente la diferencia entre la cepa parental y su mutante derivada.

Con la hipótesis de que las bacterias podrían tener un suministro de hierro acumulado en sus proteínas de almacenamiento, se procedió a realizar una segunda estrategia. Es así que para las curvas a continuación se repicaron  $10^6$  células del inóculo primario sin hierro en fase exponencial tardía a 5 ml de un segundo inóculo con EDDHA 50  $\mu\text{M}$  y se dejó crecer otras 24 horas. Las condiciones de hierro ensayadas fueron las mismas que en las curvas anteriores. En estas curvas se observó que las densidades ópticas alcanzadas a las 16 horas por la cepa Z67 y su mutante difieren, siendo mayores las de la salvaje que la mutante, y ese fenotipo se mantiene a todas las concentraciones de citrato férrico (Fig. 25 y 26). Sin embargo, pasadas las 16 horas comienzan a igualarse las densidades nuevamente.



**Figura 25.** Curvas construidas con las cepas Z67 y su mutante en *fecA*, a partir de un inóculo primario sin hierro, pasando por un segundo inóculo con EDDHA 50  $\mu\text{M}$ . Condiciones ensayadas: (a) con hierro; EDDHA 50  $\mu\text{M}$ ; EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 0,1  $\mu\text{M}$ ; y (b) EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 1  $\mu\text{M}$ , EDDHA 50  $\mu\text{M}$  citrato férrico 100  $\mu\text{M}$ . Sólo se muestra la curva de la cepa salvaje para el cultivo con EDDHA 50  $\mu\text{M}$ , dado que ambas cepas presentaron igual crecimiento. El experimento se repitió dos veces, obteniéndose resultados similares.

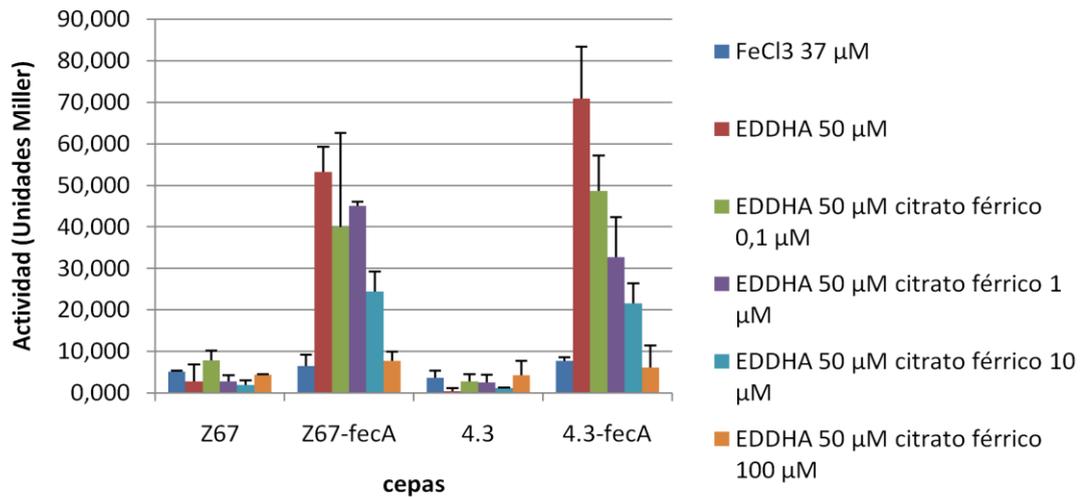


**Figura 26.** Densidades ópticas alcanzadas a las 16 horas de crecimiento, para la cepa Z67 y su mutante derivada *fecA*<sup>-</sup>, partiendo de inóculos con EDDHA 50 μM.

### Ensayos de expresión del gen *fecA*

Utilizando el *cassette lacZaacC1* sin promotor empleado en la construcción de las mutantes, y bajo el control del promotor de *fecA*, se realizaron ensayos de expresión bajo diferentes condiciones de hierro y citrato férrico; y los resultados de los mismos se muestran en la figura 27. Se utilizaron como control del ruido de fondo del método de medida las cepas Z67 y 4.3, que no poseen el *cassette lacZaacC1* y por lo tanto no expresan la enzima codificada por el gen reportero en ninguna de las condiciones. En condiciones de suficiencia de hierro, no hay expresión del gen para ninguna de las dos cepas estudiadas. Cuando al medio se le adicionó el quelante EDDHA 50 μM, dejando al cultivo en condiciones limitantes de hierro, se registró la mayor expresión del gen. A concentraciones bajas de citrato férrico (en el orden de 0,1 μM y 1 μM), la expresión del gen se mantuvo alta, si bien fue un poco menor en comparación con su expresión en medio con quelante únicamente. A medida que se aumentó la concentración de citrato férrico (a 10 y 100 μM) el gen se expresó menos, hasta prácticamente no registrarse actividad.

Estos resultados muestran que el gen *fecA* está regulado negativamente por la disponibilidad de hierro.



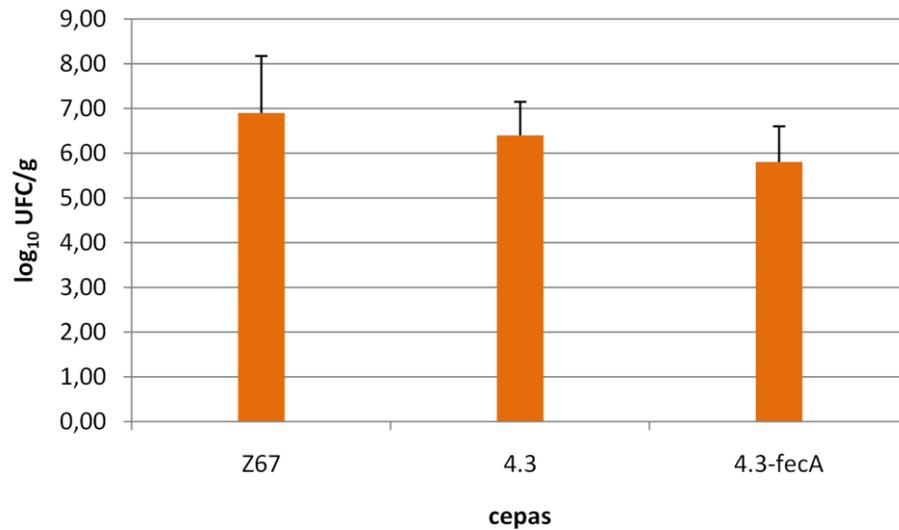
**Figura 27.** Ensayo de expresión del gen *fecA* para las distintas condiciones de disponibilidad de hierro en las cuatro cepas estudiadas. Cada columna muestra su correspondiente barra de error con el desvío estándar, considerando las tres mediciones realizadas.

### Ensayos de colonización de arroz

Los ensayos de colonización de arroz de la variedad Tacuarí, utilizada en plantíos del Uruguay, tuvieron como objetivo comparar la persistencia en la planta de las cepas Z67, 4.3 y la mutante *fecA*<sup>-</sup> construida en la cepa 4.3. El motivo de la elección de esta mutante para la realización del ensayo fue que dado que no es capaz de producir sideróforos ni tampoco el transportador FecA se encontraría más comprometida en su crecimiento sin hierro. El protocolo seguido para los mismos tuvo una duración de 11 días, y es el que se detalló previamente en la sección Materiales y métodos.

Con los datos de los recuentos de microcolonias obtenidos en los ensayos de colonización con las cepas Z67, 4.3 y 4.3-*fecA*<sup>-</sup> (Ver Anexo) se realizó un análisis de varianza con un p-valor de 0,05 y un test de Tukey con el mismo p-valor, y no se hallaron diferencias significativas. Esto significa que la colonización y persistencia de las tres cepas dentro de la planta de arroz, a

los 8 días de la transferencia a los tubos, son similares, con valores entre  $10^6$  y  $10^8$  UFC/g de parte aérea de la planta (Fig. 28). Podemos decir que la producción de sideróforos, y el transportador FecA no tienen efecto en la colonización de plantas de arroz por parte de esta bacteria.



**Figura 28.** Persistencia de las distintas cepas en las plantas a los 8 días de transferidas las semillas inoculadas a los tubos, medida como  $\log_{10}$  de las UFC/g de la parte aérea de la planta. Cada columna presenta su barra de error con el desvío estándar.

## DISCUSIÓN

Los microorganismos endófitos son aquellos que pueden ser aislados de una planta esterilizada superficialmente sin causar síntomas visibles de daño, que tienen la capacidad de reinfectar plantas hospederas, y de los que existe una evidencia microscópica de la colonización interna [2]. *H. seropedicae* es una cepa modelo de endófito, con un importante potencial como promotor de crecimiento vegetal de gramíneas como el arroz [31, 33]. Éstos organismos, como la mayoría de los seres vivos, necesitan del metal hierro que participa en procesos celulares vitales [8]. Uno de los sistemas de captación de hierro, muy estudiado en *E. coli*, es aquel mediado por citrato férrico, internalizado mediante el transportador dependiente de TonB FecA, y donde participan también los genes del operón *fecABCDE* y *fecIR* [21].

El genoma de la cepa *H. seropedicae* Z67 ha sido secuenciado utilizando la plataforma ABI-SOLID y presenta únicamente polimorfismos de simple nucleótido con el genoma publicado de la cepa SmR1 (comunicación personal Emanuel Maltempi de Souza), por lo cual nos basamos en dicho genoma para los análisis *in silico*. El mismo permitió identificar dos genes anotados como *fecA* para la cepa SmR1, aunque con el posterior análisis de dichas secuencias, sólo uno de ellos resultó homólogo al *fecA* de *E. coli* con un 42% de identidad. El contexto genómico de *fecA* en *E. coli* incluye al resto de los genes del operón *fecABCDE*, pero no así el contexto genómico para el gen en la cepa SmR1, donde no se encontraron homólogos a *fecBCD* ni tampoco a *fecIR* asociados. Incluso el gen *fecA* en la cepa SmR1 tampoco contiene el dominio de interacción con FecR que caracteriza a los transductores TonB-dependientes. El conjunto de las proteínas FecBCDE es responsables de internalizar el citrato férrico al citosol en *E. coli*. La ausencia de genes homólogos en *H. seropedicae* indica que existirían otros mecanismos actuando en el transporte de citrato férrico al citosol.

Para verificar que *H. seropedicae* Z67 es capaz de utilizar citrato férrico como fuente nutricional de hierro, se realizaron bioensayos en medio mínimo con quelante y probando distintas fuentes de hierro. Se evaluó el crecimiento de la cepa *H. seropedicae* Z67 en medio

sólido, observando el tamaño de colonia. La diferencia entre los bioensayos y el crecimiento en medio sólido puede deberse a que la concentración de citrato de sodio en los bioensayos fue de 340 mM, mientras en el otro experimento se utilizó una concentración de 100  $\mu$ M. El citrato de sodio puede contener trazas de hierro en sí mismo, y a una concentración tan elevada como lo es 340 mM podría haber aumentado el hierro en el medio, formando el complejo citrato férrico y por eso la aparición de halo de crecimiento. También esa concentración alta podría hacer que el citrato de sodio compita por el hierro que hubiera secuestrado el quelante, y formar citrato férrico, aunque en el medio mínimo utilizado este hierro sería escaso. Se realizaron, por último, ensayos de crecimiento en medio líquido a dos concentraciones de citrato férrico.

A partir de los tres ensayos antes mencionados se podía concluir que *H. seropedicae* Z67 es capaz de utilizar citrato férrico como fuente de hierro nutricional. Quedaba entonces por verificar si este complejo citrato férrico es internalizado a través del transportador de membrana externa FecA. Por este motivo se procedió a la construcción de una mutante dirigida al gen que codifica para el homólogo al *fecA* de *E. coli*, en *H. seropedicae* Z67 (que llamamos Z67-*fecA*<sup>-</sup>), y luego en 4.3 (que denominamos 4.3-*fecA*<sup>-</sup>).

Al momento de caracterizar las mutantes construidas, se aplicaron los mismos ensayos utilizados anteriormente con la cepa *H. seropedicae* Z67. Tanto los bioensayos para las cepas Z67-*fecA*<sup>-</sup> y 4.3-*fecA*<sup>-</sup> como los ensayos de crecimiento en medio sólido por tamaño de colonia, no mostraron diferencias con respecto a *H. seropedicae* Z67. Esto sugiere que no hay un fenotipo distinguible entre las mutantes y la cepa salvaje. Sin embargo, es necesario señalar que la concentración de citrato férrico utilizada en el ensayo de crecimiento en medio sólido fue de 100  $\mu$ M, concentración a la cual no hay expresión de *fecA*. La ausencia de diferencias entre mutantes y parentales podría deberse a este hecho.

Para el estudio del crecimiento de las mutantes se construyeron curvas en medio mínimo líquido con diferentes condiciones de disponibilidad de hierro y citrato férrico, partiendo de un inóculo primario sin hierro en primera instancia. La diferencia en el crecimiento entre las cepas parentales y sus mutantes derivadas estarían indicando la existencia de un leve fenotipo, que se

evidencia a las 16 horas de incubación. Para la mutante 4.3-*fecA*<sup>-</sup> este leve fenotipo se da a una concentración de citrato férrico mayor que para Z67-*fecA*<sup>-</sup>. Sin embargo a mayor tiempo de incubación el crecimiento de ambas cepas se iguala. Esta diferencia de concentraciones de citrato férrico en las que se manifiesta el fenotipo puede deberse a que la doble mutante (es decir, la mutante *fecA*<sup>-</sup> derivada de 4.3) está más comprometida en su crecimiento por no poder producir ni sideróforos ni FecA.

En la segunda estrategia empleada para la construcción de curvas se buscó que las bacterias provinieran de un medio más limitado en hierro, por lo que el preinóculo sin hierro se repicó a otro preinóculo con quelante a 50  $\mu$ M. El crecimiento de la cepa Z67-*fecA*<sup>-</sup> resultó ser menor al de Z67 a las 16 horas post-inoculación y a cualquier concentración de citrato férrico. Transcurrido ese tiempo, todos los cultivos tendieron a igualar su crecimiento. Esto sugiere que la mutación en el gen *fecA* en *H. seropedicae* le confiere un fenotipo leve, que se manifiesta por el menor crecimiento en medio con hierro limitante y con citrato férrico como única fuente. Dicho fenotipo se pierde a las 16 horas de incubación. Una posible explicación a esta pérdida de fenotipo luego de las 16 horas de crecimiento es la existencia de otro sistema de captación de citrato férrico que, ya sea comience a expresarse en alguna fase tardía de crecimiento posterior a las 16 horas, y por eso revierta el fenotipo en ese tiempo; o bien que tenga baja afinidad por el citrato férrico, y lo internalice lentamente, demorando en revertir el efecto del quelante. En *Mycobacterium smegmatis* por ejemplo, unas porinas son las responsables de la captación del mismo. Cepas deficientes en dichas porinas muestran signos de deficiencia de hierro, incluso en condiciones de suficiencia del metal, debido a la disminución de adquisición de hierro desde citrato férrico [45].

Cuando se analizó la expresión del gen *fecA*, se hizo indirectamente mediante el registro de la actividad de la enzima  $\beta$ -galactosidasa codificada en el gen *lacZ* del *cassette* utilizado en la construcción del mutante y regulado por el promotor del gen *fecA*. En el medio con hierro en cantidades suficientes, se registró actividad a niveles basales. En condiciones de insuficiencia de hierro, es decir, con el agregado de agente quelante al medio, se registró la máxima expresión

del gen, tanto para la mutante Z67-*fecA*<sup>-</sup> como para la 4.3-*fecA*<sup>-</sup>. A medida que la concentración de citrato férrico aumentó, la expresión del gen disminuyó hasta casi no registrarse actividad enzimática. Esto estaría indicando que el citrato férrico en condiciones de suficiencia de hierro hace innecesaria la expresión de sistemas de alta afinidad de captación del mismo. Queda por realizar la complementación *in trans* de las mutantes para confirmar el fenotipo observado.

Los ensayos de colonización fueron realizados inoculando las semillas crecidas con las cepas Z67, 4.3 y 4.3-*fecA*<sup>-</sup>. Para todas ellas, la presencia a los 8 días de la transferencia de las semillas a los tubos fue del orden de entre 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> UFC/g de parte aérea de la planta, sugiriendo que la colonización y persistencia de *H. seropedicae* en la planta de arroz es independiente de la producción de sideróforos y del transportador FecA. Es posible, al igual que sugieren otros resultados, que estén actuando otros sistemas de captación de citrato férrico alternativos.

Existen varios posibles mecanismos alternativos para el transporte de citrato férrico al citosol en *H. seropedicae*. El gen *citM* (Hsero\_2226), homólogo al *citH* de *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria, se encuentra en el genoma de la cepa secuenciada SmR1, cercano a un sistema ABC de transporte de Fe<sup>3+</sup>. Este gen, perteneciente a la familia citMHS, codifica para un transportador de citrato en *X. campestris* pv. vesicatoria, cuyo promotor se activa por citrato; y se ha visto que contribuye en la virulencia de dicho patógeno sobre el tomate y el pepino [46].

En *P. aeruginosa* la captación de hierro mediada por citrato involucra las proteínas FeoB y PcoA, además del transportador de membrana externa FecA. FeoB, un transportador de Fe<sup>2+</sup> presente en la membrana citoplásmica, internaliza al citosol el ión ferroso, lo que conlleva una previa reducción del ión férrico a su forma ferrosa por parte de una reductasa desconocida. PcoA es una multicobre'oxidasa que transforma Fe<sup>2+</sup> en Fe<sup>3+</sup>, que posteriormente es internalizado al citosol por un transportador de ión férrico del tipo ABC [29]. Otro organismo que posee el transportador FeoB es el patógeno *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Mutaciones en dicho gen llevan a una deficiencia en la virulencia de la bacteria sobre la planta de arroz [28].

Resulta interesante que *H. seropedicae* SmR1 porta un gen homólogo a *feoB* (Hsero\_0051), y un homólogo a *pcoA* (Hsero\_1601), acompañados de sistemas ABC de transporte de  $\text{Fe}^{3+}$ .

A modo de conclusión, *H. seropedicae* Z67 es capaz de utilizar citrato férrico como fuente nutricional de hierro. El transportador de membrana externa FecA, codificado por el gen homólogo a *fecA* de *E. coli* K-12, es responsable de internalizar el complejo a la célula, aunque no sería el único mecanismo actuando. Los resultados obtenidos en todos los ensayos sugieren la existencia de otro/s sistema/s de captación de citrato férrico que estaría/n participando, ya sea en etapas tardías del crecimiento y/o con baja afinidad por el complejo; y por eso el leve fenotipo observado en la mutante a las 16 horas de incubación, se revierte luego de dicho tiempo. Por último, la producción de sideróforos y del transportador de membrana externa FecA no tendría ningún efecto en la colonización de la planta de arroz, cómo se ha reportado para la infección de algunos fitopatógenos como *P. syringae* pv. tomato [30].

## PERSPECTIVAS

Dada la existencia de otros sistemas de captación de citrato férrico que no utilizan la vía de internalización por el transportador FecA, y que se expresan tardíamente y/o con menor afinidad, en futuros trabajos se podrían mutar los genes relacionados a dichos sistemas y repetir los ensayos de caracterización de las nuevas mutantes, así como los estudios de crecimiento de las cepas y expresión de los genes mutados. Cepas que porten mutaciones en los genes *citM* y *feoB*, o la doble mutante, podrían presentar deficiencias en el crecimiento a base de citrato férrico como única fuente de hierro.

Por otra parte, se sabe que en el xilema de las plantas los principales quelantes de iones metálicos son los ácidos orgánicos, como el citrato [47]. Sería interesante entonces, evaluar mediante microscopía si las nuevas mutaciones construidas tienen un efecto en la colonización del xilema de la planta de arroz por parte de *H. seropedicae* Z67.

## ANEXO

### Composición de los medios

#### NFb-Malato (pH 6,5)

MgSO <sub>4</sub> 4%	5 ml
NaCl 10%	1 ml
CaCl <sub>2</sub> 2,5% anhidro	0,8 ml
Biotina 0,1g/l	1 ml
Solución de microelementos	10 ml
Malato 20%	25 ml
NH <sub>4</sub> Cl	20 ml
Mezcla de fosfatos	50 ml
FeCl <sub>3</sub> 37 mM	1 ml
Agua desionizada	1000 ml csp

- Solución de microelementos: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 g/l; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 1,175 g/l; H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,4 g/l; CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,04 g/l; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,12 g/l
- Mezcla de fosfatos: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,8 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 159,5 g/l. pH 5,6.

#### TY (Tryptone Yeast extract medium) (pH 7)

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
CaCl <sub>2</sub> 2,5% anhidro	2 ml
Agua desionizada	1000 ml csp

#### LB (Luria-Bertani) (pH 7)

Triptona	10 g
----------	------

Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua desionizada	1000 ml csp

En el caso de los medios sólidos, se utilizó una concentración de Agar de 16 g/l.

#### Hoagland

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1M	1 ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1M	1 ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	2 ml
Solución de micronutrientes	1 ml
FeSO <sub>4</sub> 200 mM	1 ml
Agua desionizada	1000 ml csp
CaCl <sub>2</sub> 1% (luego de autoclavado)	30 ml

#### • Solución de micronutrientes:

KCl	3,728 g/l
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,546 g/l
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,338 g/l
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,575 g/l
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,125 g/l
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,081 g/l

#### **Composición de las soluciones utilizadas**

##### Buffer TE (Tris EDTA)

Tris 10 mM, EDTA 25 mM

pH 8

### CTAB/NaCl

4,1 g de NaCl en 80 ml de agua desionizada, 10 g de CTAB calentado a 65°C.

Ajustar volumen final a 100 ml.

### Solución I para extracción de ADN plasmídico

Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM

Esterilizado por autoclave.

### Solución II para extracción de ADN plasmídico

NaOH 0,2 N, SDS 1%

Preparada fresca en el momento.

### Solución III para extracción de ADN plasmídico

60 ml de acetato de potasio 5 M, 11,5 ml de ácido acético glacial, 28,5 ml de agua desionizada.

### Buffer TAE 25X

121 g de Tris base; 28,55 ml de ácido acético glacial 100%; 50 ml EDTA 0,5 M pH 8

### Buffer de transferencia SSC 10X

NaCl 1,5 M, Citrato de sodio 0,15 M

pH 7

### Solución depurinizante

HCl 0,25 M

#### Solución desnaturalizante

NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M

#### Solución neutralizante

NaCl 1,5 M, Tris-HCl 1 M

pH 7,5

#### Solución de prehibridación

SSC 20X; Denhardtts 40X; SDS 10%; H<sub>2</sub>O desionizada.

#### Solución de detección A y B

SDS 10%; NaCl 1M; Buffer P.

Buffer P: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M y H<sub>2</sub>O desionizada.

La solución de detección B consiste en una dilución al décimo de la solución A.

#### Solución de detección C

Tris-HCl 100 mM; NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 10 mM

pH 9,5

#### Buffer Z

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,06 M; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,04 M; KCl 0,01 M; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,001 M; β-mercaptoetanol 0,05 M; 1000 ml csp de agua desionizada.

Ajustar el pH a 7 y no autoclavar.

#### **Abreviaturas**

Nal<sup>5</sup>            Ácido nalidíxico 5 µg/ml

Km<sup>50</sup>           Kanamicina 50 µg/ml

Amp <sup>50</sup>	Ampicilina 50 µg/ml
Gm <sup>5</sup>	Gentamicina 5 µg/ml
Tc <sup>5</sup>	Tetraciclina 5 µg/ml
SDS	Dodecil sulfato de sodio
X-Gal <sup>20</sup>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido 20 µg/ml
CTAB	hexadeciltrimetil bromuro de amonio
EDDHA	ácido etilendiamino -N, N' -bis(2-hidroxifenilacético)
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
DO	densidad óptica
pb	pares de bases
Kb	kilobases

**Datos de los recuentos de microcolonias obtenidos en los ensayos de colonización de arroz**

Los resultados finales mostrados en la sección Resultados, son el promedio de los obtenidos en varios ensayos (con excepción de la cepa 4.3-*fecA*<sup>-</sup>, con la cual se realizó un único ensayo). En cada uno se realizaron 8 repeticiones, y de cada una se sembraron las cinco diluciones al décimo por triplicado.

---

**Cepa Z67**

**Ensayo 1**

<b>Repetición</b>	<b>Sin diluir</b>	<b>Dilución 10<sup>-1</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-2</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-3</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-4</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-5</sup></b>	<b>Peso (grs)</b>
1	Lawn	Lawn	9	0	0	0	0,1375
	Lawn	Lawn	16	1	0	0	
	Lawn	18	8	1	0	0	
2	Lawn	4	0	0	0	0	0,1244
	Lawn	5	0	0	0	0	
	Lawn	6	0	0	0	0	
3	Lawn	Lawn	13	2	1	0	0,0719
	Lawn	Lawn	7	0	0	0	
	Lawn	Lawn	13	1	0	0	
4	Lawn	Lawn	6	1	0	0	0,0683
	Lawn	Lawn	3	0	0	0	
	Lawn	Lawn	3	0	0	0	
5	Lawn	Lawn	25	2	0	0	0,1085
	Lawn	Lawn	21	1	0	0	
	Lawn	Lawn	24	0	0	0	
6	Lawn	Lawn	13	0	0	0	0,0339
	Lawn	Lawn	20	1	0	0	

	Lawn	Lawn	10	2	0	0	
7	Lawn	0	0	0	0	0	0,0389
	Lawn	4	0	0	0	0	
	Lawn	8	1	0	0	0	
8	7	5	1	0	0	0	0,0435
	Lawn	14	1	0	0	0	
	9	8	2	0	0	0	

**Cepa Z67**

**Ensayo 2**

Repetición	Sin diluir	Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dil. 10 <sup>-2</sup>	Dil. 10 <sup>-3</sup>	Dil. 10 <sup>-4</sup>	Dil. 10 <sup>-5</sup>	Peso (grs)
1	Lawn	Lawn	50	7	0	0	0,0042
	Lawn	Lawn	49	7	0	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	51	5	1	
2	Lawn	Lawn	Lawn	46	8	1	0,0146
	Lawn	Lawn	58	2	0	0	
	Lawn	Lawn	56	8	0	0	
3	Lawn	Lawn	46	11	0	0	0,0081
	Lawn	Lawn	25	10	2	0	
	Lawn	Lawn	25	1	0	0	
4	Lawn	Lawn	16	3	0	0	0,0318
	Lawn	28	2	0	0	0	
	Lawn	39	5	0	0	0	
5	Lawn	21	6	0	0	0	0,0462
	Lawn	Lawn	12	0	1	0	
	Lawn	Lawn	2	0	0	0	
6	Lawn	Lawn	15	1	0	0	0,0042
	Lawn	Lawn	27	8	0	0	
	Lawn	Lawn	29	2	0	0	
7	Lawn	Lawn	28	6	0	0	0,0245
	Lawn	Lawn	30	5	2	0	
	Lawn	Lawn	31	10	1	0	
8	Lawn	Lawn	26	5	0	0	0,0366
	Lawn	Lawn	50	7	0	0	
	Lawn	Lawn	49	7	0	0	

**Cepa Z67**

**Ensayo 3**

Repetición	Sin diluir	Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dil. 10 <sup>-2</sup>	Dil. 10 <sup>-3</sup>	Dil. 10 <sup>-4</sup>	Dil. 10 <sup>-5</sup>	Peso (grs)
1	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	9	1	0,0319
	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	17	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	11	1	
2	Lawn	Lawn	39	8	2	0	0,0194
	Lawn	Lawn	29	2	0	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	6	1	0	

3	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	8	0	0,0305
	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	9	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	6	1	
4	Lawn	Lawn	Lawn	28	4	0	0,0578
	Lawn	Lawn	Lawn	22	3	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	25	3	0	
5	Lawn	Lawn	31	5	0	0	0,045
	Lawn	Lawn	23	3	2	0	
	Lawn	Lawn	34	4	0	0	
6	Lawn	Lawn	Lawn	7	0	0	0,0375
	Lawn	Lawn	Lawn	5	3	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	9	0	0	
7	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	7	0	0,0752
	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	12	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	Lawn	4	2	
8	Lawn	Lawn	22	3	1	0	0,0674
	Lawn	Lawn	16	2	0	0	
	Lawn	Lawn	18	1	0	0	

### **Cepa 4.3**

#### **Ensayo 1**

<b>Repetición</b>	<b>Sin diluir</b>	<b>Dilución 10<sup>-1</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-2</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-3</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-4</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-5</sup></b>	<b>Peso (grs)</b>
1	Lawn	26	4	1	0	0	0,0769
	Lawn	33	2	0	0	0	
	Lawn	31	10	0	0	0	
2	Lawn	10	0	1	0	0	0,0281
	Lawn	5	1	0	0	0	
	Lawn	10	1	0	0	0	
3	Lawn	39	3	0	0	0	0,0756
	Lawn	25	10	0	0	0	
	Lawn	32	5	1	0	0	
4	Lawn	Lawn	24	5	0	0	0,075
	Lawn	Lawn	17	1	0	0	
	Lawn	Lawn	22	1	0	0	
5	Lawn	1	1	0	0	0	0,1076
	Lawn	1	3	0	0	0	
	Lawn	3	2	0	0	0	
6	Lawn	13	4	0	0	0	0,0312
	Lawn	19	4	1	0	0	
	Lawn	14	6	1	1	0	
7	Lawn	0	0	0	0	0	0,0901
	Lawn	0	0	0	0	0	
	Lawn	5	0	1	0	0	
8	Lawn	Lawn	37	4	1	0	0,0927
	Lawn	Lawn	30	3	1	0	

Lawn      Lawn      42      6      1      0

**Cepa 4.3**

**Ensayo 2**

<b>Repetición</b>	<b>Sin diluir</b>	<b>Dilución 10<sup>-1</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-2</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-3</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-4</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-5</sup></b>	<b>Peso (grs)</b>
1	Lawn	37	13	2	0	0	0,0167
	Lawn	22	8	0	0	0	
	Lawn	10	10	1	0	0	
2	0	1	0	0	0	0	0,0820
	3	0	0	0	0	0	
	7	0	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0,0209
	1	0	0	0	0	0	
	2	0	0	0	0	0	
4	Lawn	9	1	0	0	0	0,033
	Lawn	16	1	0	0	0	
	Lawn	10	2	0	0	0	
5	Lawn	9	0	0	0	0	0,0395
	Lawn	10	0	0	0	0	
	Lawn	8	0	0	0	0	
6	Lawn	25	3	0	0	0	0,0443
	Lawn	27	3	0	0	0	
	Lawn	20	1	0	0	0	
7	Lawn	Lawn	31	1	0	0	0,0659
	Lawn	Lawn	29	3	2	0	
8	39	3	0	0	0	0	0,0192
	36	3	0	0	0	0	

**Cepa 4.3**

**Ensayo 3**

<b>Repetición</b>	<b>Sin diluir</b>	<b>Dilución 10<sup>-1</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-2</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-3</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-4</sup></b>	<b>Dil. 10<sup>-5</sup></b>	<b>Peso (grs)</b>
1	Lawn	67	19	2	0	0	0,0509
	Lawn	65	23	2	0	0	
	Lawn	60	10	2	0	0	
2	Lawn	14	1	0	0	0	0,0504
	Lawn	17	5	0	0	0	
	Lawn	11	2	1	0	0	
3	0	0	0	0	0	0	0,0566
	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
4	Lawn	50	3	0	0	0	0,0993
	Lawn	52	4	0	0	0	
	Lawn	25	4	1	0	0	
5	Lawn	41	15	1	0	0	0,0714
	Lawn	58	8	2	0	0	

	Lawn	37	5	1	0	0	
6	2	0	0	0	0	0	0,0539
	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
7	Lawn	8	1	0	0	0	0,0766
	Lawn	29	5	0	0	0	
	Lawn	22	3	0	0	0	
8	18	2	1	0	0	0	0,0567
	28	9	0	0	0	0	
	23	3	0	0	0	0	

### Cepa 4.3

#### Ensayo 4

Repetición	Sin diluir	Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dil. 10 <sup>-2</sup>	Dil. 10 <sup>-3</sup>	Dil. 10 <sup>-4</sup>	Dil. 10 <sup>-5</sup>	Peso (grs)
1	Lawn	Lawn	19	2	0	0	0,035
	Lawn	Lawn	26	2	0	0	
	Lawn	Lawn	23	2	0	0	
2	Lawn	Lawn	Lawn	26	3	0	0,0438
	Lawn	Lawn	Lawn	22	4	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	23	1	0	
3	Lawn	Lawn	Lawn	33	2	1	0,1006
	Lawn	Lawn	Lawn	29	2	1	
	Lawn	Lawn	Lawn	25	3	0	
4	Lawn	Lawn	25	3	1	0	0,0335
	Lawn	Lawn	26	1	1	0	
5	Lawn	Lawn	Lawn	23	2	1	0,0419
	Lawn	Lawn	Lawn	23	1	2	
6	Lawn	Lawn	Lawn	9	0	0	0,0408
	Lawn	Lawn	Lawn	8	0	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	8	4	0	
7	Lawn	Lawn	Lawn	6	1	0	0,0456
	Lawn	Lawn	Lawn	12	2	0	
	Lawn	Lawn	Lawn	8	0	0	
8	Lawn	Lawn	13	1	0	0	0,0394
	Lawn	Lawn	12	1	0	0	
	Lawn	Lawn	7	1	0	0	

### Cepa 4.3-fecA'

#### Ensayo 1

Repetición	Sin diluir	Dilución 10 <sup>-1</sup>	Dil. 10 <sup>-2</sup>	Dil. 10 <sup>-3</sup>	Dil. 10 <sup>-4</sup>	Dil. 10 <sup>-5</sup>	Peso (grs)
1	Lawn	Lawn	13	0	0	0	0,0338
	Lawn	Lawn	10	1	0	0	
	Lawn	40	14	3	1	0	
2	Lawn	1	0	0	0	0	0,0493
	Lawn	2	0	0	0	0	

	Lawn	4	0	0	0	0	
3	22	7	0	0	0	0	0,0383
	Lawn	7	1	0	0	0	
	15	3	0	0	0	0	
4	Lawn	27	0	0	0	0	0,0337
	Lawn	14	0	0	0	0	
	Lawn	19	3	0	0	0	
5	0	0	0	0	0	0	0,044
	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	0	0	0,0288
	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	
7	Lawn	2	0	0	0	0	0,0241
	10	1	0	0	0	0	
	Lawn	3	0	0	0	0	
8	35	11	2	0	0	0	0,0559
	33	8	1	0	0	0	
	42	10	0	0	0	0	

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mano, H. and H. Morisaki, *Endophytic bacteria in the rice plant*. Microbes and environments / JSME, 2008. **23**(2): p. 109-17.
2. Rosenblueth, M. and E. Martinez-Romero, *Bacterial endophytes and their interactions with hosts*. Molecular plant-microbe interactions : MPMI, 2006. **19**(8): p. 827-37.
3. Hardoim, P.R., L.S. van Overbeek, and J.D. Elsas, *Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth*. Trends in microbiology, 2008. **16**(10): p. 463-71.
4. Reinhold-Hurek, B. and T. Hurek, *Living inside plants: bacterial endophytes*. Current opinion in plant biology, 2011. **14**(4): p. 435-43.
5. Ryan, R.P., K. Germaine, A. Franks, D.J. Ryan, and D.N. Dowling, *Bacterial endophytes: recent developments and applications*. FEMS microbiology letters, 2008. **278**(1): p. 1-9.
6. Paterson, A.H., M. Freeling, and T. Sasaki, *Grains of knowledge: genomics of model cereals*. Genome Research, 2005. **15**(12): p. 1643-50.
7. James, E.K. and F.L. Olivares, *Infection and Colonization of Sugar Cane and Other Graminaceous Plants by Endophytic Diazotrophs*. Critical Reviews in Plant Sciences, 1997. **17**(1): p. 77-119.
8. Sandy, M. and A. Butler, *Microbial iron acquisition: marine and terrestrial siderophores*. Chemical reviews, 2009. **109**(10): p. 4580-95.
9. Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones, *Bacterial iron homeostasis*. FEMS microbiology reviews, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
10. Chu, B.C., A. Garcia-Herrero, T.H. Johanson, K.D. Krewulak, C.K. Lau, R.S. Peacock, Z. Slavinskaya, and H.J. Vogel, *Siderophore uptake in bacteria and the battle for iron with the host; a bird's eye view*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2010. **23**(4): p. 601-11.

11. Baichoo, N. and J.D. Helmann, *Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence*. Journal of bacteriology, 2002. **184**(21): p. 5826-32.
12. Platero, R., L. Peixoto, M.R. O'Brian, and E. Fabiano, *Fur is involved in manganese-dependent regulation of mntA (sitA) expression in Sinorhizobium meliloti*. Applied and environmental microbiology, 2004. **70**(7): p. 4349-55.
13. Chao, T.C., J. Buhrmester, N. Hansmeier, A. Puhler, and S. Weidner, *Role of the regulatory gene rirA in the transcriptional response of Sinorhizobium meliloti to iron limitation*. Applied and environmental microbiology, 2005. **71**(10): p. 5969-82.
14. Todd, J.D., M. Wexler, G. Sawers, K.H. Yeoman, P.S. Poole, and A.W. Johnston, *RirA, an iron-responsive regulator in the symbiotic bacterium Rhizobium leguminosarum*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 12): p. 4059-71.
15. O'Brian, M. and E. Fabiano, *Mechanisms and Regulation of Iron Homeostasis in the Rhizobia*, in *Iron Uptake and Homeostasis in Microorganisms*, C. P. and A. S.C., Editors. 2010, Caister Academic Press: Norfolk, UK. p. 37-63.
16. Letoffe, S., P. Delepelaire, and C. Wandersman, *Free and hemophore-bound heme acquisitions through the outer membrane receptor HasR have different requirements for the TonB-ExbB-ExbD complex*. Journal of bacteriology, 2004. **186**(13): p. 4067-74.
17. Amarelle, V., M.R. O'Brian, and E. Fabiano, *ShmR is essential for utilization of heme as a nutritional iron source in Sinorhizobium meliloti*. Applied and environmental microbiology, 2008. **74**(20): p. 6473-5.
18. Harding, R.A. and P.W. Royt, *Acquisition of iron from citrate by Pseudomonas aeruginosa*. Journal of general microbiology, 1990. **136**(9): p. 1859-67.
19. Silva, A.M., X. Kong, and R.C. Hider, *Determination of the pKa value of the hydroxyl group in the alpha-hydroxycarboxylates citrate, malate and lactate by <sup>13</sup>C NMR: implications for metal coordination in biological systems*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2009. **22**(5): p. 771-8.

20. Guerinot, M.L., E.J. Meidl, and O. Plessner, *Citrate as a siderophore in Bradyrhizobium japonicum*. Journal of bacteriology, 1990. **172**(6): p. 3298-303.
21. Braun, V., M. Braun, and H. Killman, *Ferrichrome-and citrate-mediated iron transport*, in *Iron transport in bacteria*, C. J.H., M. A.R., and P. S.M., Editors. 2004, AM Press: Washington DC. p. 158-177.
22. Enz, S., S. Mahren, U.H. Stroehler, and V. Braun, *Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(3): p. 637-46.
23. Ferguson, A.D., C.A. Amezcua, N.M. Halabi, Y. Chelliah, M.K. Rosen, R. Ranganathan, and J. Deisenhofer, *Signal transduction pathway of TonB-dependent transporters*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007. **104**(2): p. 513-8.
24. Krewulak, K.D. and H.J. Vogel, *TonB or not TonB: is that the question?* Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire, 2011. **89**(2): p. 87-97.
25. Cornelis, P., S. Matthijs, and L. Van Oeffelen, *Iron uptake regulation in Pseudomonas aeruginosa*. Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine, 2009. **22**(1): p. 15-22.
26. Leoni, L., N. Orsi, V. de Lorenzo, and P. Visca, *Functional analysis of PvdS, an iron starvation sigma factor of Pseudomonas aeruginosa*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(6): p. 1481-91.
27. Miethke, M. and M.A. Marahiel, *Siderophore-based iron acquisition and pathogen control*. Microbiology and molecular biology reviews : MMBR, 2007. **71**(3): p. 413-51.
28. Pandey, A. and R.V. Sonti, *Role of the FeoB protein and siderophore in promoting virulence of Xanthomonas oryzae pv. oryzae on rice*. Journal of bacteriology, 2010. **192**(12): p. 3187-203.

29. Marshall, B., A. Stintzi, C. Gilmour, J.M. Meyer, and K. Poole, *Citrate-mediated iron uptake in Pseudomonas aeruginosa: involvement of the citrate-inducible FecA receptor and the FeoB ferrous iron transporter*. Microbiology, 2009. **155**(Pt 1): p. 305-15.
30. Jones, A.M. and M.C. Wildermuth, *The phytopathogen Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000 has three high-affinity iron-scavenging systems functional under iron limitation conditions but dispensable for pathogenesis*. Journal of bacteriology, 2011. **193**(11): p. 2767-75.
31. Elbeltagy, A., K. Nishioka, T. Sato, H. Suzuki, B. Ye, T. Hamada, T. Isawa, H. Mitsui, and K. Minamisawa, *Endophytic colonization and in planta nitrogen fixation by a Herbaspirillum sp. isolated from wild rice species*. Applied and environmental microbiology, 2001. **67**(11): p. 5285-93.
32. Schmid, M., J.I. Baldani, and A. Hartmann, *The Genus Herbaspirillum*, in *Prokaryotes* 2006. p. 141-150.
33. Baldani, J.I., B.V. Baldani, L. Seldin, and J. Döbereiner, *Characterization of Herbaspirillum seropedicae gen. Nov., a root-associated nitrogen-fixing bacterium*. Int. J. Syst. Bacteriol, 1986. **36**: p. 86-93.
34. Roncato-Maccari, L.D., H.J. Ramos, F.O. Pedrosa, Y. Alquini, L.S. Chubatsu, M.G. Yates, L.U. Rigo, M.B. Steffens, and E.M. Souza, *Endophytic Herbaspirillum seropedicae expresses nif genes in gramineous plants*. FEMS microbiology ecology, 2003. **45**(1): p. 39-47.
35. Balsanelli, E., R.V. Serrato, V.A. de Baura, G. Sasaki, M.G. Yates, L.U. Rigo, F.O. Pedrosa, E.M. de Souza, and R.A. Monteiro, *Herbaspirillum seropedicae rfbB and rfbC genes are required for maize colonization*. Environmental microbiology, 2010. **12**(8): p. 2233-44.
36. Pedrosa, F.O., et al., *Genome of Herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses*. PLoS genetics, 2011. **7**(5): p. e1002064.

37. James, E.K., P. Gyaneshwar, N. Mathan, W.L. Barraquio, P.M. Reddy, P.P. Iannetta, F.L. Olivares, and J.K. Ladha, *Infection and colonization of rice seedlings by the plant growth-promoting bacterium Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular plant-microbe interactions* : MPMI, 2002. **15**(9): p. 894-906.
38. Rosconi, F., E.M. Souza, F.O. Pedrosa, R.A. Platero, C. Gonzalez, M. Gonzalez, S. Batista, P.R. Gill, and E.R. Fabiano, *Iron depletion affects nitrogenase activity and expression of nifH and nifA genes in Herbaspirillum seropedicae*. *FEMS microbiology letters*, 2006. **258**(2): p. 214-9.
39. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular Cloning. A laboratory manual* 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
40. Becker, A., M. Schmidt, W. Jager, and A. Puhler, *New gentamicin-resistance and lacZ promoter-probe cassettes suitable for insertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions*. *Gene*, 1995. **162**(1): p. 37-9.
41. Selbitschka, W., S. Niemann, and A. Pühler, *Construction of gene replacement vectors for Gram- bacteria using a genetically modified sacRB gene as a positive selection marker*. *Applied microbiology and biotechnology*, 1993. **38**(5): p. 615-618.
42. Balzarini, M.G., L. Gonzalez, M. Tablada, F. Casanoves, D.R. J.A., and R. C.W., *Manual del Usuario*, E. Brujas, Editor 2008: Córdoba, Argentina.
43. Finn, R.D., *et al.*, *The Pfam protein families database*. *Nucleic acids research*, 2007. **36**(Database issue): p. D281-8.
44. Llamas, M.A. and W. Bitter, *Iron gate: the translocation system*. *Journal of bacteriology*, 2006. **188**(9): p. 3172-4.
45. Jones, C.M. and M. Niederweis, *Role of porins in iron uptake by Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 2010. **192**(24): p. 6411-7.
46. Tamir-Ariel, D., T. Rosenberg, and S. Burdman, *The Xanthomonas campestris pv. vesicatoria citH gene is expressed early in the infection process of tomato and is*

*positively regulated by the TctDE two-component regulatory system. Molecular plant pathology*, 2011. **12**(1): p. 57-71.

47. Rellan-Alvarez, R., J. Giner-Martinez-Sierra, J. Orduna, I. Orera, J.A. Rodriguez-Castrillon, J.I. Garcia-Alonso, J. Abadia, and A. Alvarez-Fernandez, *Identification of a tri-iron(III), tri-citrate complex in the xylem sap of iron-deficient tomato resupplied with iron: new insights into plant iron long-distance transport. Plant & cell physiology*, 2010. **51**(1): p. 91-102.