

**Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas**

**Rol del glutatión en la tolerancia a estreses ambientales  
por rizobio**

RESERVA.....  
A.....  
Fecha..... 11-12-2008 .....  
Inv. N.º..... 58908

**Cecilia Isabel Muglia  
Director: O. Mario Aguilar**

**Instituto de Bioquímica y Biología Molecular  
Facultad de Ciencias Exactas  
UNLP**

**Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas  
de la Universidad Nacional de La Plata  
2003**

**(043.2)**  
**TESIS**  
**R**  
**01041**

Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Biblioteca  
50 y 115 1º subsuelo  
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar  
Tel 0221 422-6977/79 Int. 129



DEX-58938

Esta Tesis Doctoral fue realizada gracias a la Beca de Formación de Postgrado Interna de CONICET que me fuera otorgada, y al apoyo financiero de las siguientes instituciones:

Facultad de Ciencias Exactas. UNLP  
CONICET  
Agencia de Promoción Científica

## **Indice**

<b>1. Resumen</b>	9
<b>2. Introducción</b>	11
2.1. Mecanismos de protección frente a condiciones estresantes.	11
2.2. El estrés y los rizobios	12
2.3. El glutatión: funciones celulares y en estrés	13
2.4. El glutatión es importante para la tolerancia a estreses en <i>Rhizobium tropici</i>	16
2.5. Efecto de la acidez sobre las bacterias	17
2.6. La acidez y los rizobios	19
2.7. Genes involucrados en la respuesta a la acidez en los rizobios	20
2.8. La acidez es un factor adverso de amplia distribución	22
2.9. Importancia de la fijación simbiótica de nitrógeno	22
2.10 Taxonomía rizobiana	23
2.10. La cepa <i>R. tropici</i> CIAT899 es intrínsecamente tolerante a los estreses Ambientales	25
2.12. Etapas del proceso de nodulación	25
2.12.1. Iniciación e invasión	25
2.12.3. Maduración del nódulo.	27
2.12.4. Senescencia del nódulo	28
<b>3. Objetivos</b>	32
<b>4. Materiales y métodos</b>	33
4.1 Cepas Bacterianas y plásmidos	33
4.2. Medios de cultivo utilizados	35
4.3. Aislamiento y purificación del ADN	35
4.3. Extracción y purificación de ADN	35
4.3.2. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa	35
4.4. Manipulación y análisis de ADN	36
4.4.1. Procedimientos generales	36
4.4.2. Condiciones generales de PCR y de electroforesis	36
4.4.3. Ensayos de hibridación de ADN (Southern blot)	36
4.4.4. Análisis de hibridación de colonias	37
4.4.5. Visualización de plásmidos de <i>R. tropici</i> según la técnica de Eckhardt	37
4.6. Análisis informático de ADN	37
4.7. Aislamiento y manipulación de ARN	37
4.8. Procedimientos de introducción de material genético en <i>E. coli</i> y <i>R. tropici</i> .	37
4.8.1. Introducción de plásmidos en <i>E. coli</i>	37
4.8.2. Transferencia de plásmidos mediante conjugación	38
4.9. Construcciones plasmídicas.	38
4.9.1. Construcción de una biblioteca genómica de <i>R. tropici</i>	38
4.9.2. Construcción de plásmidos para su uso en la complementación de la mutación en la cepa CIAT899-13T2	39

condiciones de acidez	74
5.1.2.7. Efecto de otros estreses sobre la transcripción del gen <i>gshB</i>	75
5.1.2.8. Conclusiones	79
5.2. Estudio del rol del glutatión en la tolerancia a la acidez	80
5.2.1. Efecto del Ca sobre el crecimiento de la cepa CIAT899-13T2	80
5.2.2. Estudio del patrón de expresión de proteínas de estrés ácido	80
5.2.2.2. Análisis de las proteínas inducidas en el mutante GshB <sup>-</sup> por la acidez	80
5.2.3. Relación entre el glutatión y los niveles de potasio intracelulares	83
5.2.3.1. Estudio del efecto de la acidificación de células de <i>R. tropici</i> CIAT899 sobre el nivel de K <sup>+</sup> intracelular (Ki)	83
5.2.3.2. Obtención de mutantes en un gen <i>kef</i> derivado de <i>R. tropici</i> CIAT899	85
5.2.3.3. Determinación de los niveles de Ki de los mutantes en el gen <i>kef</i>	86
5.2.3.4. Efecto del metilglioxal y CDNB sobre los niveles de Ki de la cepa salvaje y mutantes	87
5.2.3.5. Efecto de una mutación en el gen <i>kef</i> sobre el crecimiento de las cepas CM23 y CM24 en condiciones de pH neutro y ácido	89
5.2.3.6. Efecto de la acidez sobre el contenido de potasio de los mutantes <i>Kef</i>	90
5.2.3.8. Conclusiones	91
5.3. Estudio de los efectos de la mutación del gen <i>gshB</i> sobre <i>S. meliloti</i> 1021	93
5.3.1. Construcción de un mutante GshB <sup>-</sup> derivado de <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	93
5.3.2. Efecto de la mutación sobre el crecimiento de <i>S. meliloti</i>	94
5.3.3. Estudio de la capacidad de nodulación del mutante <i>gsh2</i> de <i>R. meliloti</i> 1021	95
5.3.4. Conclusiones	96
5.4. Protección del glutatión frente a estreses diversos: estrés oxidativo, osmótico y ayuno de nutrientes	97
5.4.1 Rol del glutatión en la protección frente al estrés oxidativo	97
5.4.1.1. Efecto del ditioneitol sobre el crecimiento del mutante GshB <sup>-</sup> de <i>R. tropici</i>	97
5.4.1.2. Estudio de inducción de la catalasa en células del mutante CIAT899-13T2 por peróxido de hidrógeno	98
5.4.1.3. Efecto del glutatión sobre la tolerancia al ayuno de nutrientes en <i>R. tropici</i>	99
5.4.1.4. Conclusiones	101
5.5. Importancia del glutatión en la fijación simbiótica de nitrógeno	102
5.5.1. Estudios de la influencia de la mutación en el gen <i>gshB</i> sobre la nodulación en <i>Phaseolus vulgaris</i>	102
5.5.2. Medida de marcadores moleculares senescencia de nódulos inducidos por la cepa CIAT899-13T2	103
5.5.3. Conclusiones	105
<b>6. Discusión</b>	106
<b>7. Conclusiones</b>	110
<b>8. Bibliografía</b>	112
<b>9. Agradecimientos</b>	120

## 1. RESUMEN

En el presente trabajo de tesis se estudió la genética y bioquímica del glutatión en *Rhizobium tropici* y su relación con la protección frente a estreses ambientales. En nuestro laboratorio previamente se había aislado un mutante GshB<sup>-</sup> de esta bacteria, caracterizado por su sensibilidad a la acidez. En este trabajo se clonó y caracterizó el gen *gshB* (que codifica para la glutatión sintetasa) salvaje y su región adyacente. Mediante la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales se determinó que la expresión de este gen es independiente de los marcos de lectura contiguos. Asimismo, se encontró que este gen se activa en condiciones de acidez respondiendo a la demanda de mayores niveles de glutatión provocada por la acidificación. Al estudiar los niveles de potasio se observa que la cepa mutante en el gen *gshB* no aumenta su nivel de potasio interno luego de una acidificación, a diferencia de la cepa salvaje. Se obtuvieron mutantes en un gen que codifica para una proteína de un canal Kef (de eflujo de potasio regulado por el glutatión) de *R. tropici*, los cuales se caracterizaron. Los estudios que hemos realizado utilizando agentes inductores para canales Kef nos permiten concluir que probablemente exista más de un canal de tipo *kef* en esta bacteria. Por otra parte, se demostró que la mutación en el gen *gshB* no modifica la expresión de proteínas de shock ácido inducidas por esta bacteria. Asimismo, se estudió que el glutatión es necesario para la protección frente al estrés oxidativo, posiblemente a través de un mecanismo mediado por un regulador el tipo OxyR de *Escherichia coli*. Se demostró que en *R. tropici*, el glutatión no está implicado en la protección frente al ayuno de nutrientes. Además, se demostró que un mutante GshB<sup>-</sup> de *Sinorhizobium meliloti* 1021, seleccionada por ser una cepa intrínsecamente sensible a los estreses ambientales, el glutatión ejerce un efecto protector frente a dichos estreses, similar a lo observado en *R. tropici*. Por último se demostró que el glutatión es necesario para el mantenimiento de una simbiosis efectiva en poroto común, protegiendo al nódulo de la senescencia temprana.

## 2. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos en el suelo están expuestos a una diferentes de condiciones adversas *i.e.* variaciones térmicas, acidez del medio, escasa disponibilidad de nutrientes y agua, y presencia de moléculas tóxicas, condiciones que en general llamamos de estrés. En microbiología se puede definir a estrés como una situación ambiental que provoca alguna de las siguientes reacciones: una disminución de la velocidad de crecimiento, o que genere daño en ausencia de una respuesta celular, o que estimule la expresión de ciertos genes (Storz *et al*, 2000). Algunas de estas condiciones provocan respuestas dirigidas a responder frente a un estrés específico: por ejemplo shock térmico o estrés oxidativo. Estas respuestas de la célula le permiten seguir creciendo o al menos sobrevivir en algunos casos. Otras son respuestas generales, como la formación de esporas y las respuestas reguladas por los factores de transcripción  $\sigma^s$  y  $\sigma^B$ .

### 2.1. Mecanismos de protección frente a condiciones estresantes

Entre las respuestas generales a estrés se ha estudiado con cierto detalle la formación de esporas en *Bacillus subtilis*, *Myxococcus xanthus* y en *Streptomyces coelicolor*. Se trata de un mecanismo de resistencia inducido por una única condición: ayuno de nutrientes, pero que también induce células resistentes a otro tipo de estreses. Las esporas de bacilos son altamente resistentes a la temperatura, desecación, ácidos y bases, solventes orgánicos, radiación y enzimas proteolíticas y sacarolíticas (Sonenshein *et al*, 2000, Errington *et al* , 1993). Además, las bacterias Gram+ poseen una respuesta general a otros estreses que contribuye a su capacidad de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales. En *Bacillus subtilis* esta respuesta está controlada por el factor de transcripción  $\sigma^B$  que es activado por un gran número de factores limitantes del crecimiento y promueve las síntesis de al menos 100 proteínas. La pérdida de la función de  $\sigma^B$  causa una sensibilidad aumentada a una multiplicidad de estreses incluyendo acidez, temperatura, estrés osmótico y oxidativo. Se conoce la función de algunos de los genes controlados por el factor  $\sigma^B$  y estas están implicadas en la protección del ADN, proteínas y lípidos celulares especialmente de las especies reactivas del oxígeno que se generan por un desbalance metabólico (Price *et al*, 2000).

La mayor parte del conocimiento actual sobre la resistencia y supervivencia frente a condiciones adversas de bacterias que no se diferencian proviene del estudio de enterobacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella thyphimurium* y de bacterias marinas como *Vibrio spp.* (Kjelleberg *et al*, 1993) Estas bacterias tendrían mecanismos comunes con respuestas cruzadas para diferentes tipos de estrés inclusive para condiciones de privación de compuestos carbonados. En términos generales, la adaptación a los cambios ambientales requiere cambios fisiológicos e implica

la inducción de una batería de genes específicos. La respuesta general a estreses de *E. coli* se caracteriza por numerosas alteraciones de la fisiología celular que mejoran la supervivencia aumentando la resistencia, en general previniendo el daño celular, más que reparándolo. Esta respuesta puede ser inducida por un gran número de factores adversos que incluyen el ayuno de nutrientes (que resulta en la fase estacionaria), alta osmolaridad, variaciones térmicas, o acidez. Estos factores provocan un aumento de la síntesis de la subunidad  $\sigma^s$  de la ARN polimerasa (Jishage *et al.*, 1996) que controla la transcripción de al menos 50 genes implicados en la resistencia a estreses, o en rearrreglos morfológicos o metabólicos ( Hengge-Aronis *et al.*, 2000).

Una de las respuestas a un estrés específico más estudiadas es la causada por un aumento de temperatura: *E. coli* induce la expresión de las llamadas proteínas de shock térmico ("heat shock") cuyos genes codificantes constituyen un regulón. Los promotores de estos genes requieren del factor de transcripción específico denominado  $\sigma^{32}$  (codificado por el gen *rpoH*). La mayor parte de las proteínas de heat shock son chaperonas o proteasas dependientes de ATP que actúan en el plegamiento, reparación, y degradación de las proteínas en condiciones de estrés. (Yura *et al.*, 2000).

## 2.2. El estrés y los rizobios

El ciclo de vida de los rizobios comprende una fase saprobiótica, libre, y otra fase simbiótica asociada a la leguminosa hospedadora. En ambas fases los rizobios deben enfrentar situaciones ambientales extremas tales como altas temperaturas, acidez, estrés oxidativo, estrés salino y limitación de nutrientes. Puede interpretarse que una fase del ciclo de vida transcurra en estrecha asociación con plantas como una ventaja para la supervivencia en condiciones ambientales adversas. Sin embargo, es razonable suponer que los rizobios, a través de la evolución, han debido desarrollar mecanismos que les permitan una interacción exitosa con el hospedante superando la respuesta de defensa de este aún en condiciones limitantes y a su vez adaptarse a condiciones fluctuantes de privación de compuestos nutritivos alternando con situaciones de abundancia que son el resultado de las características propias de un cultivo de ciclo anual como el de las leguminosas.

Se han estudiado las respuestas de bacterias del suelo (*Pseudomonas* spp. y rizobios) a los factores de estrés ambientales (Givskov *et al.*, 1994., Milcamps *et al.*, 1999, Kragelund *et al.*, 1995). Mediante mutaciones al azar usando el transposón Tn5 se han encontrado en *S. meliloti* genes involucrados en la persistencia en suelo y en la competitividad para la nodulación en alfalfa (Milcamps *et al.*, 1998). De igual forma se han identificado en esta bacteria genes inducidos por el crecimiento en fuentes alternativas de C o N (Milcamps *et al.*, 1998, 1999).



### 2.3. El glutatión: funciones celulares y en estrés

El glutatión ( $\gamma$ -glutamil-L cisteínglicina; gsh) se encuentra ampliamente distribuido en tejidos animales, vegetales y en microorganismos. Es el tiol celular de bajo peso molecular más abundante y prevalente, encontrándose en concentraciones intracelulares de 0,1 – 10 mM, llegando a constituir un 90 % de los tioles celulares. El gsh fue descubierto hace más de 100 años, y su estructura fue establecida en 1935 (Meister *et al*, 1988).

El glutatión está presente en cianobacterias, proteobacterias, protótrofos y en algunas bacterias Gram (+) (Fahey *et al*, 1978), sin embargo los niveles hallados varían mucho de una especie a otra dentro de un mismo género. Los altos niveles de glutatión que se encuentran en las cianobacterias que producen oxígeno mediante la fotosíntesis y en bacterias púrpuras, que usan al oxígeno como aceptor final de electrones, sugieren que el metabolismo del glutatión pudo haberse originado en tiempos en que la Tierra adquirió condiciones aeróbicas. El metabolismo del glutatión se habría extendido a los eucariotas en eventos de endosimbiosis (Vuilleumier *et al*, 1997).

La síntesis de glutatión transcurre en dos etapas. El primer paso es catalizado por la enzima glutamylcisteína sintetasa (codificada en el gen *gshA*) y consiste en la formación del dipéptido  $\gamma$ -glutamil-L cisteína por condensación del ácido glutámico y la L-cisteína (Ec. 6.3.2.2.). El segundo paso es catalizado por la glutatión sintetasa (Ec. 6.3.2.3) (codificada en el gen *gshB*) en el cual la glicina es anexada al C-terminal de la  $\gamma$ -glutamil-L cisteína para formar el glutatión (Okumura *et al*, 1997) (Fig. 1).

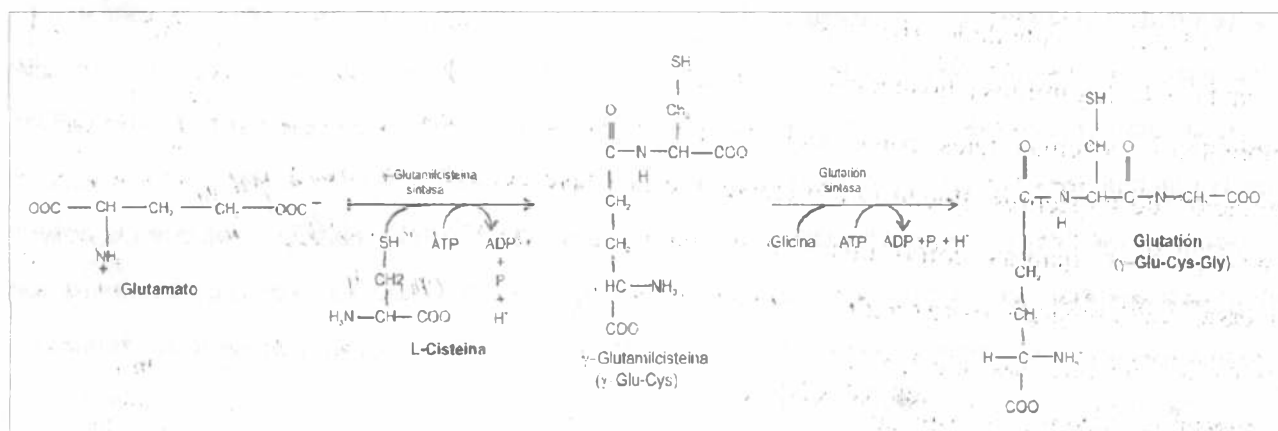


Figura 1. Síntesis del glutatión. La figura muestra la ruta de síntesis del glutatión, indicando las distintas enzimas involucradas.

Estudios de la actividad de las distintas enzimas constituyentes de esta vía en extractos celulares crudos en *Escherichia coli* K 12 (Apontoweil *et al*, 1975) indican que la gamma-glutamylcisteína sintetasa es dos veces más activa que la glutatión sintetasa. En cultivos en crecimiento se observa

un aumento del nivel de glutatión de los extractos en estado estacionario. Estos autores consideran que la vía estaría regulada por retroinhibición negativa más que por represión.

La presencia de una unión  $\gamma$ -Glu y de un grupo  $-SH$  le brindan a la molécula de gsh estabilidad intracelular y están asociadas con su función. A través de la evolución, el gsh ha sido empleado para cumplir diversas funciones. En las células actúa provee poder reductor y promueve la formación de tioles en las proteínas. Funciona en catálisis, metabolismo y transporte; participa en reacciones de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y en la detoxificación. El gsh protege a las células de los efectos tóxicos de las especies reactivas del oxígeno, forma conjugados con una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos, y es cofactor de numerosas enzimas (Meister *et al*, 1988).

El mecanismo *in vivo* más importante para formar puentes disulfuro en las proteínas es una reacción de intercambio tiol-disulfuro de tioles libres con algún compuesto que ya posea un disulfuro. Esta reacción puede ocurrir entre una proteína y el glutatión. Se ha propuesto que en el retículo endoplásmico de células eucariontes y en el periplasma de los procariontes, el glutatión actuaría como un buffer redox, proveyendo equivalentes reductores en condiciones altamente oxidantes, reduciendo cisteínas apareadas incorrectamente y facilitando el correcto plegado de las proteínas (Sevier *et al*, 2002, Aslund *et al*, 1999).

Se ha definido al estrés oxidativo como la perturbación del balance prooxidante-antioxidante a favor de los prooxidantes (Storz, 2000). Los organismos aeróbicos están expuestos a la acción de compuestos oxidantes. El superóxido ( $O_2^-$ ) y el peróxido ( $H_2O_2$ ) pueden generarse por la auto-oxidación de los distintos componentes de la cadena de transporte de electrones. Asimismo los compuestos oxidantes pueden provenir del ambiente. Estos son compuestos altamente reactivos, que podrían oxidar enzimas del citosol. En presencia de hierro el  $H_2O_2$  forma el radical hidroxilo ( $HO^\bullet$ ), (por la reacción de Fenton) altamente oxidante, que reacciona con el ADN celular y con lípidos de membrana (Storz *et al*, 1999). Para evitar el daño causado por el estrés oxidativo, las células poseen diferentes enzimas antioxidantes y sistemas reparadores tales como la catalasa, la superóxido dismutasa, y enzimas reparadoras de ADN. Se ha estudiado en *E. coli* la existencia de los regulones *oxyR* (inducible por  $H_2O_2$ ) y *soxR* (inducible por  $O_2^-$ ), que se activan frente al estrés oxidativo. La expresión de numerosos genes es inducida por el producto del gen regulatorio *oxyR*, tales como la hidropoxidasa I (*katG*) (Visik *et al*, 1997), la alquilhidróxido reductasa (*ahpCF*) la glutatión reductasa (*gorA*), glutaredoxina I (*grxA*) y glutaredoxina 2 (*trxC*) que contribuirían a mantener el estado redox de la célula. La proteína OxyR al oxidarse adquiere la capacidad de unirse al ADN de las regiones promotoras de sus genes diana (Toledano *et al*, 1994). La desactivación de OxyR a través de su reducción es mediada por la tioredoxina 1 a expensas del glutatión (Zheng *et al*, 1998) (Fig. 2). Este sistema se haya conservado en diversos organismos como por ejemplo *Erwinia*

*carotovora* (Calcutt *et al*, 1998), *Brucella abortus* (Kim *et al*, 2000), y *P. aureginosa* (Storz, 2000). El glutatión puede además contrarrestar el estrés oxidativo simplemente oxidándose a si mismo (Sevier *et al*, 2002).

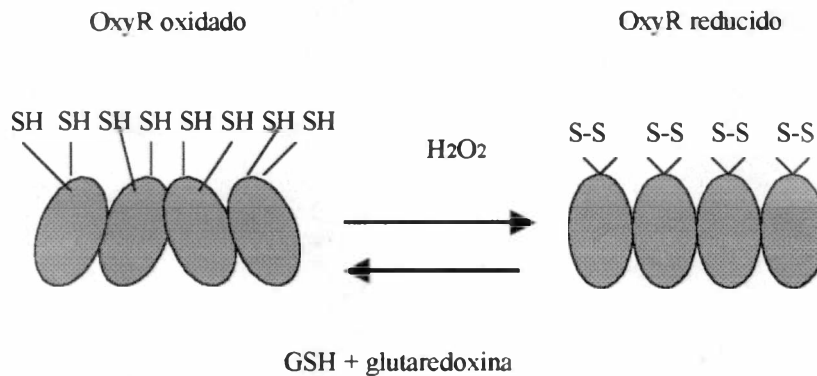


Figura 2. Mecanismo de oxidación y reducción de OxyR. La por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activación de OxyR está dada directamente por la oxidación de los tioles C199 y C208 de OxyR formando puentes disulfuro intramoleculares. OxyR es desactivado por reducción por glutaredoxina I a expensas del glutatión. (Adaptado de Storz *et al*, 2000).

El glutatión participa en la unión, transformación y detoxificación de una diversidad de compuestos, en eucariotas y en procariotas. Se ha descrito en *E. coli* y en numerosas proteobacterias la presencia de glutatión transferasas (Penninckx *et al*, 1993) que se encuentran implicadas en la detoxificación de compuestos químicos xenobióticos (Evans *et al*, 2000) y de productos oxidados del metabolismo celular: lípidos, leucotrienos, esteroides, hidroperóxidos y hidroxialquenos de ADN, antocianinas, e isitiocianatos orgánicos (Vuilleumier *et al*, 1997).

Se ha descrito la existencia en *E. coli* de una familia de canales de eflujo de potasio de tipo Kef (potassium efflux) regulados negativamente por glutatión (Booth, 1985). Estos canales se activan por la acción de conjugados del glutatión con agentes electrofílicos tales como el metilglioxal (2-oxopropanal, MG), la N-etilmaleimida (NEM) y el clorodinitrobenzeno (CDNB) (Mc Laggan *et al*, 2000, Ferguson *et al*, 1993) (Fig. 3). En *E. coli* se ha descrito la existencia de al menos dos canales Kef regulados por glutatión (canales kefB, kefC), habiéndose obtenido mutantes para estos (*kefB* y *kefC*) (Munro *et al*, 1991; Booth *et al*, 1985, Elmore *et al*, 1990). Estos mutantes muestran una disminución en el eflujo de potasio generado por distintos agentes electrofílicos. Asimismo, los distintos canales tienen distinta sensibilidad para cada uno de los diferentes agentes inductores (Ness *et al*, 1997). Mutantes GshA<sup>-</sup> de *E. coli* presentan niveles disminuidos de potasio (Meury *et al*, 1982). El potasio también participa en la tolerancia al estrés osmótico ya que en la mayoría de las bacterias Gram<sup>-</sup> la turgencia se genera acumulando K<sup>+</sup> y glutamato (Epstein *et al*, 1986; McLaggan *et al*, 1994). El mecanismo de acción del glutatión en *E. coli* fue investigado en relación con la regulación de potasio (K<sup>+</sup>) (Booth *et al*, 1996). El transporte de potasio juega un rol

principal en la homeostasis en bacterias neutrófilas tales como *E. coli*, *Rhizobium* sp. y otras géneros que mantienen pHi relativamente neutros (Booth, 1999; Graham *et al.*, 1994).

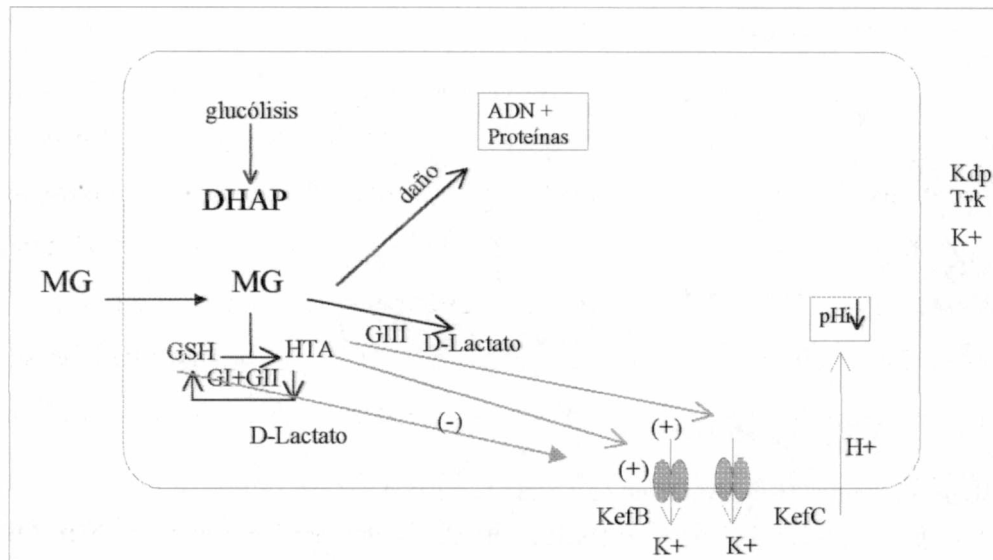


Figura 3. Canales de potasio de tipo KEF. Estos canales son regulados negativamente por el glutatión y activados por el efecto de aductos entre el glutatión y agentes electófilos. Como ejemplo de electrófilo se incluye al metilglioxal (MG). Este, de origen exógeno o endógeno, reacciona dañando las proteínas y el ADN. La detoxificación del metilglioxal ocurre por dos vías: mediante la glicoxilasa dependiente de glutatión I y II (GI y GII) o mediante la glicoxilasa III (GIII) independiente del glutatión (GSH). En ambos casos genera lactato como producto final. Los intermediarios de la vía dependiente de glutatión activan los canales KefB y KefC provocando un eflujo de potasio que es en parte compensado por el flujo de protones hacia adentro de la célula. Al finalizar la detoxificación el glutatión libre generado cierra los canales de K. Los niveles de potasio interno se restablecen por la acción de canales de ingreso de potasio: Kdp, Trk, y el pH citoplasmático recobra su valor basal. Adaptado de Ferguson *et al.*, 1995.

Se ha demostrado que los nódulos resultados de la simbiosis presentan un nivel de glutatión mayor que el resto de la planta (Dalton *et al.*, 1998). Se lo ha implicado en la protección del nódulo frente al estrés oxidativo, y el nivel de glutatión en nódulos se ha considerado como un marcador de senescencia. Sin embargo, se desconoce el rol del glutatión en la simbiosis rizobio-leguminosa.

#### 2.4. El glutatión es importante para la tolerancia a estreses en *Rhizobium tropici*

En nuestro laboratorio se aisló a un mutante en el gen *gshB* de *Rhizobium tropici* CIAT899 caracterizado por su sensibilidad a la acidez. El mutante CIAT899-13T2 crece en medio mínimo GTS neutro pero es incapaz de hacerlo a pH 5,0. Además, es sensible a la acidificación intracelular. En medio ácido es incapaz de mantener el pH intracelular y a diferencia de la cepa salvaje no incrementa su nivel de potasio interno en respuesta a la acidez. Asimismo es sensible al estrés

salino, a la acción del metilglioxal y presenta una viabilidad disminuida frente a un tratamiento con peróxido de hidrógeno (Ricciolo *et al*, 2000).

## 2.5. Efecto de la acidez sobre las bacterias

Se considera estrés ácido al que sufren las bacterias por la acción biológica combinada del ión H<sup>+</sup> y de los ácidos débiles. Aunque la permeabilidad de la membrana celular a los protones es baja, un pH externo bajo puede provocar una entrada de iones H<sup>+</sup> que acidificarán el medio interno. Esta disminución del pH tendrá efectos nocivos sobre diferentes reacciones bioquímicas y estructura de las macromoléculas. La presencia de ácidos débiles es aún más nociva, ya que estos atraviesan la membrana celular en su forma ácido, para luego disociarse en el medio intracelular, acidificando el citoplasma de la célula.

Con el objetivo de sobrevivir frente a una acidificación intracelular, las bacterias han desarrollado distintas estrategias. Las bacterias Gram<sup>+</sup> como los estreptococos son flexibles en su pH intracelular. En general, permiten que su pH interno se acidifique con el del medio, manteniendo el pH interno por lo menos 0,5 o 1 unidad de pH más alto que el pH externo (Kashket *et al*, 1987). Se ha demostrado que la regulación del pH citoplasmático en *Enterococcus faecalis* se produce por la acción de una ATPasa F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> translocadora de electrones (Kobayashi *et al*, 1982). Se demostró que una disminución del pH citoplasmático genera un aumento en la expresión de esta proteína y de la tolerancia a la acidez debida a un aumento en la extrusión de protones (Arikado *et al*, 1999).

El mecanismo que las bacterias entéricas ponen en acción para afrontar el estrés ácido general tiende a mantener el pH interno constante en un valor de entre 7,6 a 7,8 aún frente a cambios del pH del medio. El pH<sub>i</sub> se mantiene estable mediante el uso de bombas que extruyen protones fuera de la célula (Foster, 2000). En general, se considera que el pasaje a un ambiente ácido aumenta la actividad de proteínas antiportadores K/H. La acidez regularía la actividad de estos antiportadores, más que su producción (Foster, 1991, Zilberstein, 1982). *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* al sufrir un aumento en la concentración de protones externa no letal (pH>4) induce un conjunto de cambios fisiológicos que se han denominado respuesta de tolerancia a la acidez (ATR), que permiten que la célula luego tolere un pH extremadamente bajo (pH 3). Estos cambios inducidos por la acción de diferentes reguladores varían según se produzcan en fase logarítmica o estacionaria. El regulador OmpR inducido por la acidez es crítico para la respuesta en fase estacionaria pero no para la ATR de fase logarítmica (Bang, 2000), donde se pone en juego los reguladores Fur, σ<sup>s</sup> y el sistema de dos componentes PhoP/Q, que activan la síntesis de un conjunto de genes. OmpR se activa por la acción de EnvZ, los cuales forman de un sistema sensor-regulador de dos componentes. La activación de EnvZ implica la autofosforilación por efecto de diferentes

condiciones ambientales como acidez y alta osmolaridad. Una vez fosforilado transfiere el fosfato a OmpR, que sufre un cambio conformacional y actúa aumentando la expresión de *ompC* y *ompF*, que codifican para dos porinas de diferente tamaño, probablemente interactuando con la subunidad  $\alpha$  de la ARN polimerasa (Bang, 2002). Además, se ha propuesto que OmpR estaría implicado en la expresión de los flagelos, microcina, división celular y en la virulencia de *Salmonella*. En la fig. 3 se comparan los distintos mecanismos de respuesta de tolerancia a la acidez en esta bacteria.

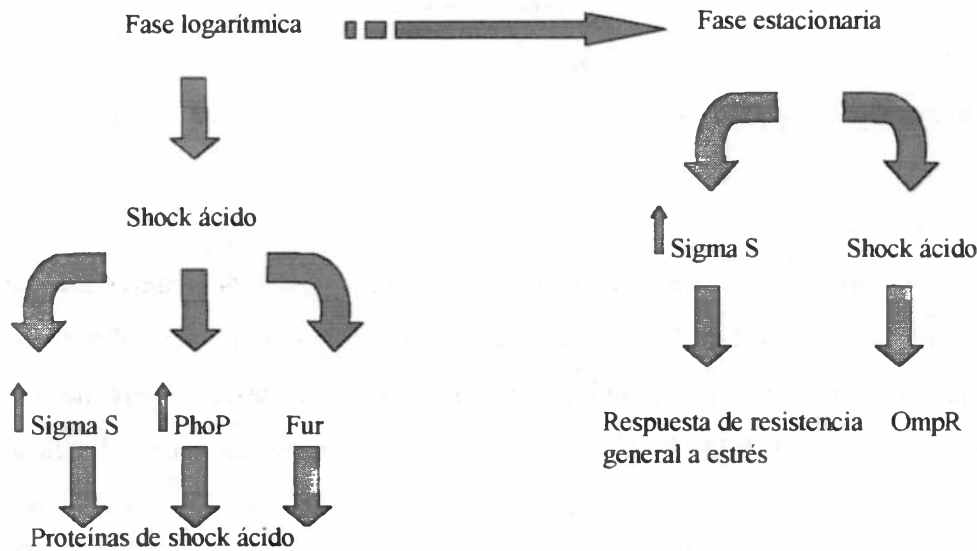


Figura 3. Comparación de la respuesta de tolerancia a la acidez en fase logarítmica y estacionaria de *S. entérica* serovar Thyphimurium. El shock ácido (pH 4,5) en células en fase logarítmica induce los factores sigma S y PhoP, que a su vez inducen un conjunto de proteínas de shock ácido. El factor Fur, que no es inducido por la acidez, se requiere para la inducción de un subgrupo de genes. Mutantes en *rpoS*, *phoP* y *fur* son sensibles a la acidez, por lo que las proteínas de shock ácido (ASP) estarían relacionadas a la tolerancia a la acidez. En fase estacionaria se induce una respuesta general de estrés dependiente de sigma S y del regulador OmpR, que se requiere para la repuesta a la acidez conocida como ATR (Adaptado de Foster *et al*, 2000).

En *E. coli* se han identificado tres respuestas frente a la acidez: la repuesta de tolerancia, la respuesta de adaptación y la respuesta de resistencia a la acidez. La mayor parte de los estudios se han referido a la respuesta a la habituación, que se refiere a los mecanismo que se ponen en juego por la exposición de células crecidas en medio rico durante períodos cortos (7 minutos) a pH 3. En fase logarítmica esto genera un mecanismo de respuestas complejas que a su vez son influenciadas por diferentes metabolitos con la glucosa, glutamato, aspartato, KCl, y FeCl<sub>3</sub> entre otros (Rowbury *et al*, 1998). En fase estacionaria las células ante una acidificación inducen la respuesta de resistencia a la acidez (AR). Se han identificado tres sistemas de AR. El sistema 1 es dependiente de *rpoS* y CRP (proteína receptora de AMPcíclico), inducible en medio LB, protege a las bacterias a hasta pH 2,5 en medio mínimo. La resistencia se daría por la disminución de un inhibidor que se acumularía a pH 8 (Castanie-Cornet *et al*, 1999). El sistema de AR 2 requiere la presencia de

glutamato extracelular para la resistencia a pH 2. Este sistema es dependiente de la glutamato decarboxilasa, enzima que convierte al glutamato intracelular en ácido gama-butírico (GABA), y del antiportador glutamato/GABA (GadC). Este sistema inducible consumiría protones intracelulares, alcalinizando el citoplasma. Existen dos glutamato decarboxilasas, codificadas por *gadA* y *gadB*. Estos genes son dependientes de  $\sigma^s$  en fase estacionaria (Castanie-Cornet, 2001) pero en medio ácido se activan mediante un mecanismo dependiente de CRP. El tercer sistema de AR requiere arginina y parece ser similar al anterior (Foster, 2000).

## 2.6. La acidez y los rizobios

Distintos rizobios presentan diferentes grados de resistencia a la acidez medido como la capacidad de crecer, no de sobrevivir, a bajo pH. Así *Rhizobium leguminosarum* es moderadamente resistente a la acidez, y capaz de crecer en un rango de pH 4,0. *Sinorhizobium meliloti* es más sensible a la acidez, y crece sólo hasta pH 5,5. *Rhizobium tropici* crece hasta un pH de 4,5 (Brockweell, 1991; Date, 1979; Graham, 1982, 1994). El conocimiento de las bases de estas diferencias es limitado.

Los rizobios en general mantienen un pH ligeramente alcalino con respecto al medio (pHi entre 7,2 y 7,5) (O'Hara, 1989, Graham, 1994, Glenn, 1994). Se encuentra que las cepas sensibles a la acidez disminuyen su pHi con la acidificación del medio, lo cual lleva a un detenimiento del crecimiento celular.

Se ha encontrado que la concentración de  $Ca^{++}$  en el medio influye sobre los efectos de la acidez en los rizobios, aumentando la velocidad de crecimiento en medio ácido y haciendo las bacterias tolerantes a pH más ácidos (Glenn *et al*, 1994). El  $Ca^{++}$  no parece afectar el tipo de moléculas de exopolisacárido secretadas pero sí la cantidad de estas. Sin embargo la protección a los bajos pH dada por el  $Ca^{++}$  no parece depender de este aumento en la cantidad de exopolisacárido secretado (Dilworth *et al*, 1999). Los mutantes de *S. meliloti* ácido sensibles han sido clasificados en dos grupos: aquellos en los cuales el aumento de la concentración de  $Ca^{++}$  revierte el efecto de la mutación y aquellos en los cuales no la revierte (Foster, 2000). Además se conoce que el Ca afecta la supervivencia de los rizobios, siendo importante la concentración de  $Ca^{++}$  del medio ácido con el cual se hará el shock.

*R. leguminosarum* y *Bradyrhizobium japonicum* exhiben respuestas de tolerancia a la acidez cuando se crecen a pH 5,0 (O'Hara *et al*, 1994). Cuando células de rizobios son expuestas a un shock ácido se produce la síntesis de la llamadas "proteínas de shock ácido" (ASP), que han sido descritas en distintos rizobios incluyendo *Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium etli* CIAT611 y

*R. tropici* CIAT899 (Aarons *et al*, 1991, Peick *et al*, 1999). Asimismo se han descrito diferentes cambios metabólicos producidos por la acidez, que incluyen la acumulación celular de poliaminas, glutamina y de iones potasio (Aarons *et al*, 1991, Graham *et al*, 1991, 1994).

La acidez influye en los distintos estadios de la simbiosis rizobio-leguminosa: -en el intercambio de señales (Howieson *et al*, 1995), -en la adhesión (Caetano-Anolles *et al*, 1989, Lodeiro *et al*, 1999) y -en la nodulación. Cultivos hidropónicos se observa la inhibición de la nodulación a pH menor a 4,8 (Munns *et al*, 1986).

## 2.7. Genes involucrados en la respuesta a la acidez en los rizobios

El conocimiento sobre las bases genéticas que determinan la tolerancia a la acidez en los rizobios es limitado. Utilizando mutagénesis inducida con el transposón Tn5 se han obtenido diferentes mutantes ácido sensibles en diferentes especies, tales como *S. meliloti* WSM419, *R. leguminosarum* bv. *trifolii* WSM710 y *R. tropici* CIAT899. A partir de ellos se han identificado diversos genes necesarios para el crecimiento en condiciones de acidez (Tabla 1).

gen	características	bacteria	cita
<b>genes estructurales:</b>			
<i>actA</i>	mutante en este gen son sensibles a la acidez, Cu y Zn; codifica para una proteína ácida de membrana	<i>S. meliloti</i> WSM419	O'Hara <i>et al</i> , 1989. Tiwari <i>et al</i> , 1996
<i>actP</i>	mutantes crecen a bajos pH dependiente de la concentración de Cu; el producto del gen muestra dominios de unión a ATP, y es homólogo a las ATPasas tipo P involucradas en el transporte de Cu	<i>S. meliloti</i> y <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	Glenn <i>et al</i> , 1999
<i>atvA</i>	gen con alta homología con el gen de la proteína de virulencia de <i>Agrobacterium</i> AcvB. Es el segundo ORF en un operón que se activa en condiciones de acidez	<i>R. tropici</i> CIAT899	Vinuesa <i>et al</i> , 2003
<i>exoH/exoR</i>	mutantes sensibles a la acidez y al Zn; produce un exopolisacárido no succinilado	WSM419	Glenn <i>et al</i> , 1999.
<i>gshB</i>	mutantes son sensibles a la acidez, al ClNa, al estrés oxidativo y al metilgloxal	<i>R. tropici</i> CIAT899	Riccillo <i>et al</i> , 2000

### **genes regulatorios:**

<i>actS-actR</i>	sistema de dos componentes esencial para el crecimiento en condiciones de acidez. ActS sería una proteína de	<i>S. meliloti</i> WSM419	Tiwari <i>et al</i> , 1996
------------------	--	------------------------------	----------------------------



	membrana con un dominio protein kinasa C-terminal similar a proteínas sensoras. ActR presenta los residuos aspartato y lisina que caracterizan en este tipo de proteínas y un motivo hélice-vuelta-hélice consistente con una proteína regulatoria		
--	--	--	--

**genes regulados por el pH:**

<i>phrR</i>	gen que codifica para una proteína con un motivo hélice-vuelta-hélice de unión a ADN; responde también a otros estreses (oxidativo, etc.)	<i>S. meliloti</i> WSM419	Freiberg <i>et al</i> , 1997, Reeve <i>et al</i> , 1998
<i>lpiA</i>	gen inducible a bajo pH, no está bajo el control de <i>phrR</i> ni del sistema sensor regulador <i>actRS</i>	<i>S. meliloti</i>	Glenn <i>et al</i> , 1999

Tabla 1. Genes de rizobio implicados en la tolerancia al pH ácido. La tabla muestra diferentes genes ya sea estructurales, regulatorios o regulados por el pH bajo, necesarios para la tolerancia de los rizobios a la acidez.

A partir de los estudios en *S. meliloti* WSM419, Glenn *et al* (1999) propusieron el siguiente modelo para la regulación de genes controlados por la acidez (Fig. 4)

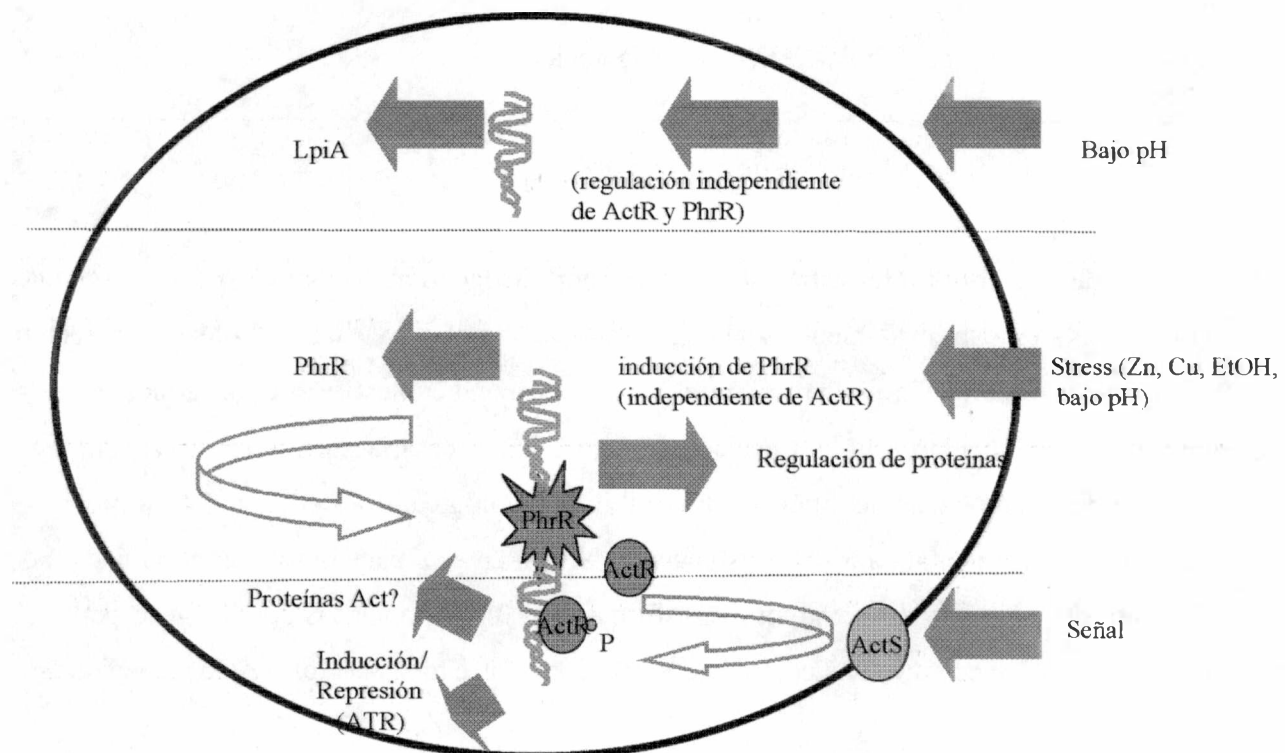


Figura 4. Modelo actual para la regulación de genes controlados por la acidez en *S. meliloti* WSM419. El sistema *actS-actR* regula algunos genes responsables de la tolerancia a la acidez (ATR). El sistema *phrR* responde a una señal inducida por el pH desconocida y probablemente controla otros genes de respuesta a la acidez. *lpiA* responde a la acidez pero a través de un sistema que no es dependiente ni de *actS-actR* ni de *phrR*. (Modificado de Glenn *et al*, 1999).

## 2.8. La acidez es un factor adverso de amplia distribución

Los suelos ácidos constituyen un problema en zonas templadas y tropicales (Munns *et al* 1982, 1986). Los suelos ácidos ocupan aproximadamente 30% de la tierra libre de hielo (von Uexkull *et al*, 1995). La acidez es una importante limitación para la agricultura. En Latinoamérica, unas 500 millones de hectáreas potencialmente arables corresponden a suelos ácidos (Cochrane *et al*, 1979). La deforestación y abuso de métodos de cultivo intensivo modernos ha dejado una vasta cantidad de suelos ácidos altamente erosionados y degradados. Anualmente, unas 11 millones de hectáreas son desmontadas, pero sólo una pequeña proporción de estas tierras se transforman en zonas altamente productivas, mientras que el resto se convierte en pastizales improductivos.

La acidez es un factor limitante para el cultivo de leguminosas ya que afecta a la planta, al rizobio y a la interacción entre ambos (O'Hara *et al*, 1989). El bajo rendimiento de los cultivos puede atribuirse a la toxicidad de distintos compuestos, que se vuelven biodisponibles a pH ácido, como el aluminio (Coleman *et al*, 1967), manganeso, hierro, y a una limitada disposición de fósforo, calcio, manganeso y potasio (von Uexkull *et al*, 1995). La alta concentración de iones H<sup>+</sup> es asimismo tóxica. (Pijnborg *et al*, 1990; Glenn *et al*, 1994). Para afrontar este problema se han desarrollado diferentes estrategias, que incluyen la alcalinización de los suelos con compuestos químicos y el uso de cepas de rizobios resistentes a la acidez.

## 2.9. Importancia de la fijación simbiótica de nitrógeno

El 80% de la atmósfera terrestre está formado por nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>). La entalpía de disociación del N<sub>2</sub> es extremadamente grande, de 944,7 kJ.mol<sup>-1</sup>, lo cual la hace una reacción extremadamente favorable. Sin embargo aún a 3000°C en condiciones de presión atmosférica la disociación no ocurre, debido a la alta energía de activación necesaria para la reacción. Por este motivo se trata de una molécula de difícil biodisponibilidad biológica.

Un requerimiento fundamental para la persistencia de la vida en este planeta es la continuidad en el funcionamiento del ciclo del nitrógeno, que transforma unas 3x10<sup>9</sup> toneladas de nitrógeno por año. Para que esto ocurra es necesario una compleja interrelación entre todas las formas de vida (Fig. 5).

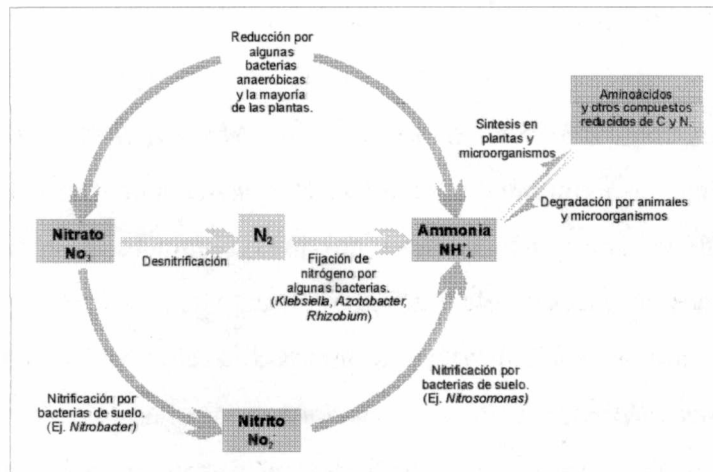


Figura 5. Ciclo simplificado del nitrógeno. El nitrógeno atmosférico puede ser reducido a amonio por procesos químicos (Haber-Bosch) o por bacterias que poseen el sistema de la nitrogenasa. El amonio puede ser incorporado en la materia biológica. En suelos el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> es secuencialmente oxidado a nitrito y nitrato por dos especies distintas de bacterias. El nitrato puede ser usado por las plantas y a su vez puede ser reducido vía nitrito, óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N<sub>2</sub>O), a nitrógeno gaseoso por un proceso total llamado desnitrificación cumplido mayormente por bacterias, aunque han sido reconocidas algunas especies de hongos (Ferguson *et al*, 1998).

Las fuentes de nitrógeno del ciclo son:

- 10% del nitrógeno del ciclo es fijado a través de descargas eléctricas en la forma de amonio;
- industrialmente la reducción de nitrógeno a amonio se realiza a través del proceso de Haber-Bosch, a 400-500°C y a 10<sup>2</sup> – 10<sup>3</sup> atmósferas de presión, en presencia de un catalizador. Este proceso, llevado a cabo por la industria de fertilizantes, da cuenta de un 25% del nitrógeno recién fijado;
- fijación biológica de nitrógeno se lleva a cabo en condiciones normales de presión y temperatura, fija el 65% del nitrógeno restante que ingresa al ciclo .

Las plantas no son capaces de asimilar el nitrógeno atmosférico sino que dependen de otros compuestos, como el nitrato, amonio, urea, aminoácidos, etc. La fijación biológica de nitrógeno aprovecha N<sub>2</sub> atmosférico, lo convierte en amonio y eventualmente proteínas, es llevado a cabo a través de la estrecha relación entre microorganismos y plantas superiores. Los primeros pasos de la fijación de nitrógeno, la conversión de nitrógeno en amonio, son llevados a cabo simbióticamente en los nódulos de las raíces de las plantas leguminosas que contienen bacterias fijadoras de nitrógeno. La fijación biológica de nitrógeno es una fuente eficiente de nitrógeno, siendo económicamente rentable y ecológicamente más limpia con respecto al uso de fertilizantes químicos.

## 2.10. Taxonomía rizobiana

Se ha identificado como diazotrofos (organismos que fijan nitrógeno) a un número reducido de especies. Existen organismos fijadores de vida libre, entre los que se encuentran bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhodospirillum*, *Mycobacterium*. Otros organismos fijan en asociación simbiótica: el actinomiceto *Frankia*, la *Spirochaeta aurantia* y los rizobios. Estos últimos forman parte de la familia Rhizobiaceae, cuyo rasgo característico es la capacidad de inducir la formación de nódulos en raíces de plantas leguminosas.

La familia *Rhizobiaceae* se encuentra, en términos filogenéticos, emparentada con las familias *Bartonellaceae*, *Brucellaceae* y *Phyllobacteriaceae* de las  $\alpha$  -Proteobacteria. Esta nomenclatura de las familias es la propuesta por la segunda edición del Manual Bergey de Bacteriología Sistemática (<http://www.cme.msu.edu/Bergeys>). Las bacterias que son capaces de formar nódulos fijadores de nitrógeno en leguminosas herbáceas y arbóreas se dividen actualmente en 6 géneros *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. En la Tabla 2 se muestra la clasificación actual de los rizobios, así como también la planta hospedante de donde fueron aislados.

Género	Especie	Huésped
<i>Allorhizobium</i>	<i>A. undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium</i>	<i>A. caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium</i>	<i>B. elkanii</i>	<i>Glicine max</i>
	<i>B. japonicum</i>	<i>Glicine max</i>
	<i>B. liaoningense</i>	<i>Glicine max</i>
<i>Mesorhizobium</i>	<i>M. amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
	<i>M. ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. huakuii</i>	<i>Astragalus spp.</i>
	<i>M. loti</i>	<i>Lotus spp.</i>
	<i>M. mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
	<i>M. plurifarium</i>	<i>Acacia, Leucaena</i>
	<i>M. chacoense</i>	<i>Prosopis alba</i>
<i>M. tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza, Sophora, Glycine y otras.</i>	
<i>Rhizobium</i>	<i>R. etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris, Mimosa affinis</i>
	<i>R. galegae</i>	<i>Galega spp.</i>
	<i>R. gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. hainanense</i>	<i>Stylosanthes spp., Centrosema spp.</i>

		<i>Desmodium</i> spp., <i>Tephrosia</i> spp.
	<i>R. huatlense</i>	<i>Sesbania herbacea</i>
	<i>R. leguminosarum</i>	<i>Vicia</i> , <i>Trifolium</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i>
	<i>R. tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Leucaena</i>
	<i>R. yanglingense</i>	<i>Coronilla varia</i> , <i>Gueldenstaedtia multiflora</i> , <i>Amphicarpaea trisperma</i>
<i>Sinorhizobium</i>	<i>S. arboris</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
	<i>S. fredii</i>	<i>Glicine max</i>
	<i>S. kostiense</i>	<i>Acacia senegal</i> , <i>Prosopis chilensis</i>
	<i>S. medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.
	<i>S. meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i>
	<i>S. saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp.
	<i>S. terangaie</i>	<i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>
	<i>S. xinjiangense</i>	<i>Glicine max</i>

Tabla 2: Género, especie y huésped de los rizobios.

### 2.11. La cepa *R. tropici* CIAT899 es intrínsecamente tolerante a los estreses ambientales.

La cepa CIAT899 define a la especie *Rhizobium tropici*, perteneciente al subgrupo IIB aislada en Brasil (Graham *et al*, 1982). Esta cepa presenta una alta tolerancia a estreses ambientales. Tolera temperaturas de 40 °C y un pH entre 5 y 7. Se ha descrito que es capaz de desarrollar colonias en placa a pH 4 (Peick *et al*, 1995). Además es capaz de asociarse en simbiosis en condiciones de alta temperatura, acidez y alta concentración de metales pesados (Martínez-Romero *et al*, 1991). Presenta un amplio rango de planta hospedadoras entre las que se encuentran: *Phaseolus vulgaris*, *Sesbania exaltata*, *Vigna unguiculata*, *Lotus corniculatus*, ~~*Desmodium canadense*~~, *Desmanthus illinoensis*, *Medicago ruthenica*, *Leucaena leucocephala*, *Albizia lebbek*, y *Gliricidia maculata* (Hernández-Lucas *et al*, 1995; van Berkum *et al*, 1996).

### 2.12. Etapas del proceso de nodulación.

#### 2.12.1. Iniciación e invasión

El proceso de nodulación empieza en el suelo y termina con el desarrollo de un nuevo órgano que puede fijar nitrógeno en la planta (Pueppke *et al*, 1996). Al comienzo, la planta y la bacteria, compañeros en el proceso de simbiosis se comunican en la rizósfera. Esta comunicación se

realiza a través de señales químicas difusibles: flavonoides por parte de la planta y factores Nod por parte de la bacteria.

Los flavonoides son un conjunto de compuestos heterocíclicos que contienen oxígeno, que comparten en su estructura un anillo 1,3-difenilpropano. Su producción es característica de las leguminosas y es constitutiva, aunque sus niveles pueden modularse de acuerdo a distintos estímulos o estreses. Bajas concentraciones de flavonoides actúan como factores quimiotácticos, de crecimiento, o pueden influir en la producción de polisacáridos, pero son fundamentalmente inductores de la expresión de los genes *nod*, que forman parte del regulón *nod*.

Los genes *nod* son clave para el inicio de la simbiosis y sus productos proteicos están involucrados en la síntesis y secreción de lipoquitooligosacáridos (factores Nod) (Fig. 5) que generan reacciones morfogénicas específicas en la planta. Aún en ausencia de bacterias se producen estos cambios morfológicos que incluyen deformación de los pelos radiculares, cambios en la polaridad celular, división de células corticales y la formación de estructuras similares a nódulos. Asimismo, otras macromoléculas bacterianas están involucradas en este proceso (Ho *et al.*, 1990).

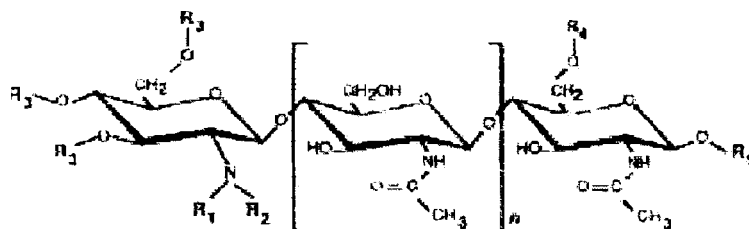


Figura 5. Estructura del Factor Nod de diferentes rizobios. Esquema de la estructura general del Factor Nod bacteriano. La molécula consiste de un esqueleto oligosacáridico, construido por restos de N-acetil-D-glucosamina, unidos entre sí por enlaces β-1, 4. El número total de restos de glucosamina oscila entre 3 y 5, según el número (n) de moléculas centrales de glucosamina. El extremo terminal izquierdo de la molécula corresponde al no reductor y el derecho al extremo reductor. En ambos extremos aparecen sustituyentes (R<sub>1</sub>-R<sub>5</sub>). El sustituyente R<sub>2</sub> corresponde a la cadena de ácido graso y sus características son fundamentales en la estructura de los quitinolisacárido.

En algún momento, los rizobios deben adherirse a la superficie de la planta. De este punto del proceso se conoce poco pero se sabe que es rápido en condiciones de laboratorio. Se han implicado fimbrias bacterianas (Vesper *et al.*, 1986), fibrillas de celulosa, (Smit *et al.*, 1987), la proteína de unión de Ca ricadhesina (Smit *et al.*, 1989, Swart *et al.*, 1994) y lecitinas de la planta y de la bacteria (Dazzo *et al.*, 1983, Bohool *et al.*, 1974, Ho *et al.*, 1990, Dazzo *et al.*, 1986, Wang *et al.*, 1993).

El primer signo morfológico evidente de la respuesta de la leguminosa al rizobio es, en la mayor parte de los casos, el crecimiento de pelos radiculares anormales. Estos se observan

doblados, torcidos, abiertos o enrollados, atrapando a las células afectadas. Los rizobios penetran el pelo radicular mediante hilos de infección que se forman a medida que la bacteria va avanzando, mediante la invaginación de la membrana plasmática de la pared celular del pelo. El tubo de infección está formado por material que va acumulando la planta y está tapizado por membrana, que rodea a las células invasoras del rizobio. El hilo de infección conduce a las bacterias hasta el incipiente meristema nodular. Esta es una estructura derivada de zonas de división localizadas en el córtex de la raíz. Estas zonas se encuentran en las capas más externas del cortex en leguminosas con nódulos determinados que carecen de meristema en la madurez y en capas más internas adyacentes al periciclo en leguminosas que darán origen a nódulos determinados. Se observan en la célula vegetal rearrreglos de microtúbulos, desplazamiento del núcleo al centro de la célula y depósito de material en la pared celular apical (Turgeon *et al.*, 1985).

La entrada de la bacteria también puede ocurrir a través de zonas y mecanismos distintos a los pelos radiculares, a través de fisuras, espacios intercelulares o de raíces laterales emergentes, como en el caso de *Sesbania* y *Parasponia* (Chandler *et al.*, 1982, Rolfe *et al.*, 1988).

Las asociaciones rizobio-leguminosa se caracterizan por diferentes grados de especificidad dada por la estructura de los factores inductores de genes *nod* por parte de la planta y de los factores Nod por el lado de la bacteria. Existen factores de comunicación tardíos también involucrados en la formación del nódulo.

Por su estructura los nódulos se clasifican en dos grandes grupos:

-Nódulos indeterminados: son cilíndricos, poseen un meristema nodular y los haces vasculares no se interconectan en el meristema apical del nódulo. Se observan en plantas de arveja (*Pisum sativum*), trébol (*Trifolium*) y alfalfa (*Medicago sativa*).

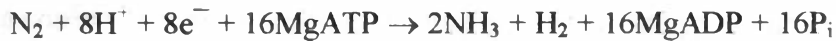
-Nódulos determinados: esféricos, carecen de meristema y los haces vasculares se fusionan en el extremo apical del nódulo. Se ven por ejemplo en plantas de poroto (*Phaseolus vulgaris*).

La formación de uno u otro tipo de nódulo depende de la leguminosa. Un mismo rizobio puede originar distinto tipo de nódulos en distintas plantas.

### 2.12.3. Maduración del nódulo.

Luego de la formación del tubo de infección y del desarrollo de un meristema apical, los rizobios son liberados mediante endocitosis al citoplasma de la planta. En nódulos indeterminados, la bacteria es liberada a células de la planta que han dejado de dividirse, y las bacterias se dividen una o más veces antes de diferenciarse. En nódulos determinados las bacterias sufren cambios morfológicos más importantes y luego de liberarse se dividen múltiples veces en las células de la planta que a su vez se están dividiendo (Oke *et al.*, 1999).

Una vez desarrollado el nódulo, los rizobios se diferencian en el interior del citoplasma de las células vegetales como bacteroides y es allí donde se activa el proceso de fijación de nitrógeno. Este proceso está mediado por la inducción micro-aeróbica de los genes de fijación (*nif/fix*) vía la hemoproteína FixL que es oxígeno sensible. Conjuntamente se activan genes de la planta (nodulinas tardías) que codifican para una proteína transportadora de oxígeno (leghemoglobina), y proteínas involucradas en la asimilación de carbono y nitrógeno. La enzima nitrogenasa cataliza la reducción del N<sub>2</sub> atmosférico según la siguiente reacción:



En la figura 6 se resumen los distintos pasos del establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.

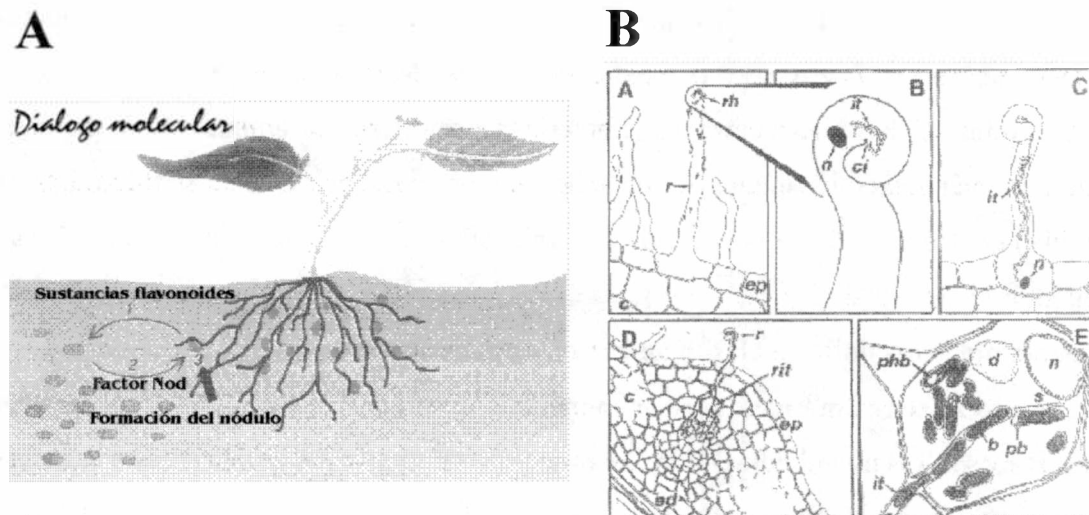


Figura 6: Proceso de nodulación. A- Esquema del diálogo molecular entre la planta y los rizobios del suelo: (1) Las sustancias flavonoides secretadas por la planta inducen a las bacterias a la producción del factor Nod (2), el cual desencadena el desarrollo del nódulo (3). B (A, B, C, D y E)- Invasión de la raíz de la leguminosa por rizobio. El rizobio (*rh*) coloniza la rizosfera y se une al pelo radicular (*r*), aquí se produce el primer intercambio de señales y el factor Nod induce el curvado del pelo radicular y permite la entrada del rizobio al centro de infección (*ci*). El núcleo de la planta (*n*) precede al o los hilos de infección (*it*). Acompañado por el núcleo (*n*) se elonga el hilo de infección (*it*) hasta llegar a la base de la célula del pelo radicular. El hilo de infección se ramifica (*rit*) cerca del primordio del nódulo formado por división de las células corticales. En las células del nódulo se forman los simbiosomas (*s*) a partir de los bacteroides (*b*) que llegan por el hilo de infección. En los bacteroides se observa el almacenamiento de C mediante la acumulación de poli-β- hidroxibutarato (*phb*) alrededor de la membrana peribacteroidal (*pb*). Otras abreviaciones: Cortex (*c*), vacuola digestiva (*d*), epidermis (*ep*) y endodermis (*ed*).

#### 2.12.4. Senescencia del nódulo



La senescencia de los nódulos se evidencia por una disminución en la fijación de nitrógeno, en los niveles de leghemoglobina y en las proteínas citosólicas totales (Gogorcena *et al.*, 1997). Esta puede producirse tempranamente en respuesta a factores ambientales tales como defoliación, déficit de agua, déficit de luz y fertilización con nitratos. En general, el primer signo de senescencia es la disminución de la actividad nitrogenasa, el aumento de las enzimas líticas y la formación de pigmentos verdes a partir de la leghemoglobina (Matamoros *et al.*, 1999).

Se desconocen los mecanismos que desencadenan la senescencia nodular, pero se supone que dentro del nódulo las bacterias se encuentran en un ambiente estresante. Se ha observado que bacteroides de *B. japonicum* sintetizan proteínas de estrés del tipo de GroEL y GroES y en *Rhizobium* el lipopolisacárido del bacteroide adquiere características similares a las que se obtiene por tratamiento con baja tensión de oxígeno o bajo pH (Kanenberg *et al.*, 1989). El endosimbionte puede ser considerado como un compartimiento lisosomal en el sistema de endomembranas de la planta (Mellor *et al.*, 1989). Dos actividades características tienden a acidificar el espacio rodeado por la membrana del peribacteroide: el transporte de ácidos dicarboxílicos y el transporte de protones por parte de la ATPasa de membrana. Por otra parte el líquido peribacteroidal contiene hidrolasas ácidas, lo cual sugiere que la caída del pH podría transformar al endosimbionte en un lisosoma (Brewin *et al.*, 1991).

En el nódulo, la actividad nitrogenasa está sujeta a un delicado equilibrio entre la velocidad de respiración necesaria para cubrir las demandas de ATP del proceso de reducción del nitrógeno y el hecho de que la nitrogenasa es una enzima altamente sensible al oxígeno y a las especies reactivas del oxígeno. En los nódulos este problema es enfrentado mediante diferentes estrategias: la presencia de una barrera difusional que limita el acceso del oxígeno a las regiones infectadas, la actividad de la proteína captadora y transportadora de oxígeno leghemoglobina, y la presencia de diferentes mecanismos de protección frente las especies reactivas del oxígeno. Dentro de estos mecanismos se destaca la existencia del ciclo del ascorbato-gsh (u homoglutación en algunas leguminosas) (Dalton *et al.*, 1986, Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2001). Este ciclo resulta en la detoxificación del peróxido de hidrógeno a expensas del NAD(P)H, e involucra la acción concertada de cuatro enzimas: ascorbato peroxidasa, la dehidroascorbato reductasa, la monodehidroascorbato reductasa y la glutatión reductasa (Matamoros *et al.*, 1999). Asimismo, la superóxido dismutasa y la catalasa han demostrado ser de importancia para la simbiosis. Sigaud y colaboradores (1999) han descrito que mutantes *katA katC* de *S. meliloti* presentan niveles de reducción de acetileno muy inferiores a los de la cepa salvaje, sin embargo, mutantes en uno de los dos genes no difieren mucho de la cepa salvaje, lo cuál indicaría que una de estas catalasas activas sería suficiente para la nodulación. Por otra parte, mutantes *sodA* (Santos *et al.*, 2000) de *S. meliloti*

presentan una drástica disminución en los niveles de reducción de acetileno, y nódulos que sin llegar a madurar y senescen tempranamente.

Se conoce que la concentración de glutatión en nódulos es mayor a la hallada en tallos y hojas (Dalton *et al*, 1993, 1998). En poroto común y otras leguminosas, el tiol predominante es el homoglutatión. Iturbe-Ormaetxe y col. (2001) han sugerido que el homoglutatión sería sintetizado por la planta y en parte exportado al bacteroide, mientras que el bacteroide sintetizaría glutatión, el cual no sería transportado a la planta (fig. 7). Al producirse la senescencia de los nódulos, ya sea en forma natural o inducida, se produce una disminución en el contenido de glutatión, ascorbato peroxidasa y catalasa de los mismos (Lodeiro *et al*, 2000, Matamoros *et al*, 1999). Se desconoce si esta disminución en las defensas contra la oxidación de los nódulos es una causa o una consecuencia de la senescencia (Escudero *et al*, 1996, Gogorcena *et al*, 1997). El rol del glutatión bacteriano en el nódulo no ha sido aún dilucidado.

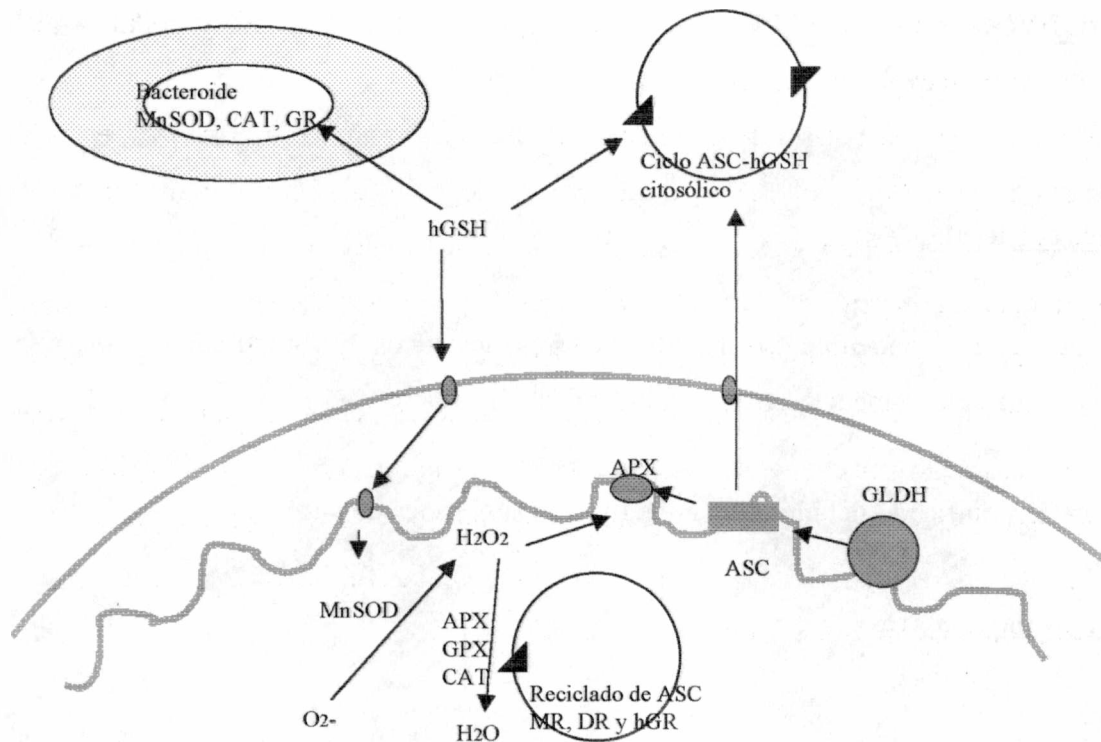


Figura 8. Modelo de procesos antioxidantes en el nódulo. Se destaca la interacción con las especies reactivas de oxígeno (ROS) en los bacteroides y el citosol. El agua oxigenada generada por la cadena de transporte de electrones (CTE) es captada por la ascorbato peroxidasa (APX) a expensas del ascorbato (ASC) que provee la L-galactono-1,4-lactona deshidrogenasa (GLDH). Ambas enzimas se localizan en la membrana interna. Los productos oxidados, monodehidroascorbato y dehidroascorbato, pueden ser nuevamente reducidos a ASC en la matriz o en el citosol por la monodehidroascorbato reductasa (MR), con NADH como dador de electrones, o por la dehidroascorbato reductasa (DR) y homoglutación reductasa (hGR), usando NADPH como dador de electrones. Las ROS generados en la matriz por el metabolismo oxidativo y la actividad de la superóxido dismutasa dependiente de manganeso (MnSOD) pueden ser destruidos directamente por el homoglutación (hGSH) o por enzimas antioxidantes, posiblemente isoenzimas específicas de APX, guaiacol peroxidasa (GPX) y catalasa (CAT). El hGSH requerido para la regeneración de ASC en la matriz se genera en el citosol. Los bacteroides también pueden importar el hGSH pero no exportan el GSH. Modificado de Matamoros, 2001.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivos generales**

- Avanzar en el conocimiento de los factores genéticos y bioquímicos del rizobio determinantes de la tolerancia a estreses ambientales.
  
- Evaluar el significado del glutatión en la fijación simbiótica de nitrógeno.

#### **Objetivos particulares**

- Determinar la organización genética y el patrón de expresión del gen *gshB*, que codifica para la glutatión sintetasa.
  
- Investigar el rol del glutatión en la tolerancia a la acidez.
  
- Investigar la protección por glutatión frente a otros estreses: estreses oxidativo y ayuno de nutrientes.
  
- Estudiar los efectos de la deficiencia de glutatión bacteriano en la simbiosis.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo, así como sus características más relevantes se presentan en las Tablas 1 y 2.

Cepa	Características relevantes	Origen/ referencia
<i>E. coli</i> S17-1	recA, RP4 integrado en el cromosoma.	Simon <i>et al</i> (1984)
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	supE44 $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80 lacZ $\Delta$ M15) hsdR17 recA endA1 gyrA96 thi-1 relA1	Bethesda Research relA1 Laboratory (BRL) Hanahan <i>et al</i> (1985)
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899	Sm <sup>r</sup> derivada de la cepa salvaje	Graham <i>et al</i> (1982) Martinez-Romero <i>et al</i> (1991)
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899-13T2	Sm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> gshB::Tn5-luxAB	Riccillo <i>et al</i> (2000)
<i>S. meliloti</i> 1021	Salvaje, Sm <sup>r</sup> derivada de RmeSU47	Meade <i>et al</i> (1982)
<i>S. meliloti</i> 1021 CM25	Tc <sup>r</sup> ; tiene una mutación en el gen gshB	Esta tesis
<b>Cepas derivadas de <i>R. tropici</i> CIAT899</b>		
CM10	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF1-lacZ	Esta tesis
CM11d	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional gshB-lacZ	Esta tesis
CM12	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF3-lacZ	Esta tesis
CM10i	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF1-lacZ en la cual el lacZ está en sentido 3'→5' con respecto al marco de lectura abierto	Esta tesis
CM12i	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF3-lacZ en la cual el lacZ está en sentido 3'→5' con respecto al marco de lectura abierto	Esta tesis
CM13i	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF2-lacZ en la cual el lacZ está en sentido 3'→5' con respecto al marco de lectura abierto	Esta tesis
CM13	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF2-lacZ	Esta tesis
CM11b	Sm <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional gshB-lacZ, presenta una única copia del ORF-2	Esta tesis
CM20	Tc <sup>r</sup> ; presenta una mutación en el ORF-2	Esta tesis
CM23	Tc <sup>r</sup> ; presenta una mutación en el gen kef	Esta tesis
<b>Cepas derivadas de <i>R. tropici</i> CIAT899-13T2</b>		
CM15	CIAT899-13T2 con fusión transcripcional gshB-lacZ	Esta tesis
CM16	CIAT899-13T2 con fusión transcripcional ORF3-lacZ	Esta tesis

CM16	CIAT899-13T2 con fusión transcripcional ORF3- <i>lacZ</i>	Esta tesis
CM24	Tc <sup>r</sup> ; presenta una mutación en el gen <i>kef</i>	Esta tesis
CM17	CIAT899-13T2 con fusión transcripcional ORF2- <i>lacZ</i>	Esta tesis

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en la realización de este trabajo de tesis.

Plásmido	Características	Origen/ referencia
PIC19R	Ap <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , sitio EcoRI a ambos extremos del MCS con un sitio HindIII central	Marsh <i>et al</i> (1984)
PIC20H	Ap <sup>r</sup> , <i>lacZ</i> , sitio HindIII a ambos extremos del MCS con un sitio HindIII central	Marsh <i>et al</i> (1984)
PSUP102	Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , vector mobilizable suicida en <i>Rhizobium</i>	
PSUP104	Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , vector mobilizable replicativo en <i>Rhizobium</i>	Priefer <i>et al</i>
PUCK4	Am <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	
PK18Mob	Km <sup>r</sup> ; <i>lacZ</i> , vector mobilizable replicativo en <i>Rhizobium</i>	
PK18Mob B	Km <sup>r</sup> ; <i>lacZ</i> , pK18 modificado, carece del sitio de restricción BamHI	Esta tesis
PK18Mob H	Km <sup>r</sup> ; <i>lacZ</i> , pK18 modificado, carece del sitio de restricción BamHI	Esta tesis
PK18Mob S-E	Km <sup>r</sup> ; <i>lacZ</i> , pK18 modificado, con una delección SmaI-EcoRI	Esta tesis
PNM481	Ap <sup>r</sup> , <i>placZY</i> con sitios de restricción que permiten la construcción de fusiones traduccionales	Minton <i>et al</i> , 1984
PCM1	Ap <sup>r</sup> , pIC20H con fragmento EcoRI de 8 kb de DNA cromosomal de <i>R. tropici</i> DNA que contiene al gen <i>gshB</i>	Esta tesis
PCM2	Tc <sup>r</sup> , pSUP104 con fragmento EcoRI de 8 kb de pCM1	Esta tesis
PCM4	Ap <sup>r</sup> , pUCK4 con fragmento EcoRI-BglII de pCM1 que contiene la región 3' del gen <i>gshB</i>	Esta tesis
PCM3	Ap <sup>r</sup> , pIC19R con fragmento XbaI-SalI de pCM1 que comprende al gen <i>gshB</i>	Esta tesis
PCM6	Tc <sup>r</sup> , pSUP104 con fragmento EcoRI de 3 kb de pCM3	Esta tesis
PCM7	Km <sup>r</sup> ; pK18mobH con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> de 3 kb proveniente del plásmido pCM3	Esta tesis
PCM8	Km <sup>r</sup> ; pK18mob18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> de 3 kb proveniente del plásmido pCM3	Esta tesis
PCM9	Tc <sup>r</sup> , pSUP104 con fusión traduccional <i>gshB-lacZ</i>	Esta tesis
PCM10d	pK18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF1- <i>lacZ</i>	Esta tesis
PCM10i	pK18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> con fusión transcripcional ORF1- <i>lacZ</i> , en la cual en gen <i>lacZ</i> se encuentra en sentido 3'→5' con respecto al ORF interrumpido	Esta tesis
PCM11d	pK18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM3)Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional <i>gshB-lacZ</i>	Esta tesis
PCM11b	pK18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM3) al que se le delecionó un fragmento HindIII, eliminando de este modo el ORF-2); Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional <i>gshB-lacZ</i>	Esta tesis
PCM13d	pK18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM3) Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF2- <i>lacZ</i>	Esta tesis
PCM13i	pK18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> con fusión transcripcional ORF2- <i>lacZ</i> en la cual en gen <i>lacZ</i> se encuentra en sentido 3'→5' con respecto al ORF interrumpido	Esta tesis
PCM12d	pK18 con fragmento EcoRI-BglII de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM1)Gm <sup>r</sup> , Nm <sup>r</sup> con fusión transcripcional ORF3- <i>lacZ</i>	Esta tesis
PCM12i	pK18 con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> con una fusión transcripcional en el ORF-3, en el cual el <i>lacZ</i> se encuentra en el sentido opuesto al de transcripción esperado.	Esta tesis
PCM15	Km <sup>r</sup> ; pK18mobH con fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> de 3 kb proveniente del plásmido pCM3	Esta tesis
PCM19	Ap <sup>r</sup> , pGem T con fragmento interno de ADN del ORF-2	Esta tesis
PCM20	Tc <sup>r</sup> , pSUP102 con el fragmento de ADN de <i>R. tropici</i> de pCM19	Esta tesis

PCM21	Ap <sup>r</sup> , pGem T con fragmento interno de ADN del gen <i>kef</i>	Esta tesis
PCM23	Tc <sup>r</sup> , pSUP102 con el fragmento de ADN del gen <i>kef</i>	Esta tesis
PCM24	Ap <sup>r</sup> , pGem T con fragmento interno de ADN de <i>S. meliloti</i> del gen <i>gshB</i>	Esta tesis
PCM25	Tc <sup>r</sup> , pSUP102 con el fragmento de ADN de <i>S. meliloti</i> del plásmido pCM24	Esta tesis

Tabla 2. Plásmidos utilizados en la realización de este trabajo de tesis.

#### 4.2. Medios de cultivo utilizados.

*E. coli* fue crecida a 37 °C en medio Luria- Bertani (LB) (Sambrook *et al*, 1989). Cuando fue necesario se agregó tetraciclina, kanamicina, gentamicina o ampicilina (5, 30, 5, 200 µg/ml respectivamente). Las cepas de rizobio fueron crecidas en medio Tryptone Yeast (TY) (Beringer *et al*, 1974) y en medio mínimo base Glucose-Mineral Salts (GTS) (Kiss *et al*, 1979) pH 7,5. Como medio de estrés ácido se utilizó GMS que contiene lo mismo que el medio GTS excepto que el MES (ácido morfolinonetansulfónico) reemplaza al Tris. El medio GMS fue acidificado a diferentes pH según el experimento con CIH. Cuando fue necesario se agregaron antibióticos neomicina, estreptomina, gentamicina, o tetraciclina (100, 400, 50 o 5 µg/ml respectivamente). En todos los casos el medio sólido se obtuvo agregando agar (15 g/L).

Para el de riego de plantas se utilizó el medio mineral Fahraeus (Vincent *et al*, 1970).

#### 4.3. Aislamiento y purificación del ADN.

##### 4.3.1. Extracción y purificación de ADN:

- ADN total

La preparación de ADN total se llevó a cabo utilizando el kit Wizard Plus (Promega, Madison, WI, USA) o mediante en método de Meade *et al* (1982), modificado para volúmenes pequeños de cultivos (1,5 ml) descrito previamente por Aguilar y Grasso (1991).

- ADN plasmídico (preparación a pequeña escala)

Las purificaciones de ADN plasmídico fueron realizadas por el método de lisis alcalina de Birnboim y Doly (1979).

##### 4.3.2. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se hizo mediante el kit Wizard DNA Cleanup de Promega (Madison, WI, USA) de acuerdo a las instrucciones dadas por los fabricantes.

#### **4.4. Manipulación y análisis de ADN.**

##### 4.4.1. Procedimientos generales.

Los cortes con enzimas de restricción, ligación de ADN, rellenado de extremos 5'protruyentes y electroforesis en geles de agarosa han sido descritos en detalle previamente (Sambrook *et al*, 1989). Las enzimas de restricción, polimerización de ADN y los marcadores de tamaño molecular fueron provistos por Promega o Gibco.

##### 4.4.2. Condiciones generales de PCR y de electroforesis

Todas las amplificaciones del trabajo fueron realizadas en los termocicladores Biometra UNO Thermoblock o Mastercycler gradient de Eppendorf. Las condiciones de PCR fueron variables de acuerdo a los oligonucleótidos utilizados. Alícuotas de 2 a 5  $\mu$ l de los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa al 1% en buffer TBE 0,5X, posteriormente fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio ( $5 \times 10^{-4}$  mg/ml) y fotografiados bajo luz UV con película Polaroid tipo 667 positivo o las imágenes fueron digitalizadas con la cámara Kodak DC120. Todos los geles fueron preparados en cubas de electroforesis de 7 x 10 cm, 15 x 10 cm o 25 x 15 cm (BIO-RAD) y las fuentes de poder utilizadas fueron PowerPac 200 y 300 (BIO-RAD).

##### 4.4.3. Ensayos de hibridación de ADN (Southern blot).

- La transferencia de geles de agarosa a filtros de nylon cargados positivamente Nylon (Nylon N)-Hybond (Amersham Pharmacia) se realizó utilizando el procedimiento indicado por el fabricante.
- La marcación de las sondas y visualización del resultado de las hibridaciones se hizo según el protocolo indicado por el sistema Gene Images AlkPhos Direct (Amersham Pharmacia Biotech). Este sistema se basa en la marcación de la sonda



mediante una reacción covalente del ADN con una fosfatasa alcalina termoestable. Luego de la hibridación esta fosfatasa alcalina cataliza la descomposición de un sustrato de dioxetano, provocando la quimioluminiscencia de este último, lo cual se detecta mediante una película radiográfica.

#### 4.4.4. Análisis de hibridación de colonias

- Los ensayos de hibridación de colonias se realizaron siguiendo el procedimiento de Amersham Pharmacia para el uso de filtros de nylon cargados positivamente Nylon (Nylon N)-Hybond.
- La sonda se marcó usando  $^{32}\text{P}\alpha\text{-dATP}$  mediante amplificación por PCR de un fragmento de ADN interno del gen *gshB* de *R. tropici*, utilizando oligonucleótidos específicos. El resultado de las hibridaciones se reveló por autoradiografía.

#### 4.4.5. Visualización de plásmidos de *R. tropici* según la técnica de Eckhardt

La visualización del perfil de plásmidos de *R. tropici* mediante electroforesis se realizó según el procedimiento de Eckhardt, 1978, modificado para geles horizontales según López, 2001.

#### **4.6. Análisis informático de ADN.**

Las secuencias de nucleótidos y proteínas fueron analizadas mediante el paquete de programas Wisconsin Versión 9,0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, y el programa Blast (NCBI) y el BCM Search Launcher, (Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center, One Baylor Plaza, Houston, TX) de acceso en Internet.

#### **4.7. Aislamiento y manipulación de ARN.**

#### **4.8. Procedimientos de introducción de material genético en *E. coli* y *R. tropici*.**

##### 4.8.1. Introducción de plásmidos en *E. coli*.

Las células de *E. coli* correspondientes a las cepas S17-1 y DH5 $\alpha$  fueron llevadas al estado competente por tratamiento con CaCl<sub>2</sub> (Mandel y Higa, 1970) o por el método de Hanaham (1985), respectivamente. La suspensión de células competentes (100  $\mu$ l) fue incubada en presencia de ADN (hasta 25 ng) en hielo durante 30 min. A continuación se realizó un shock térmico que consistió en una incubación a 42° C durante 2 min, seguida por otros 2 min en hielo. También, se utilizaron células de *E. coli* electrocompetentes preparadas según el protocolo de Tung y Chow, (1998). La electrotransformación se llevó a cabo en un equipo Gene Pulser (BioRad) de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes (25  $\mu$ F, 200 $\Omega$ , 2,5 kV).

#### 4.8.2. Transferencia de plásmidos mediante conjugación.

Los plásmidos fueron transferidos a cepas de rizobios mediante conjugación. Se mezclaron 800  $\mu$ l de una suspensión de rizobio (DO<sub>600</sub>=0,5-0,7) y 400  $\mu$ l de un cultivo del donador (DO<sub>600</sub>=0,5-0,7). La mezcla fue centrifugada durante 7 minutos a 3000 g. El sedimento obtenido fue resuspendido en 70  $\mu$ l de medio TY. Este extracto se colocó en el centro de una placa de TY e incubó a 28 °C toda la noche. Luego de la incubación se resuspendió todo el cultivo en 1 ml de solución salina, se realizaron las diluciones correspondientes y se incubó cada dilución a 28 °C en placas de medio TY suplementado con el antibiótico de selección y Sm (0,2 mg/ml). En todos los casos se incluyeron controles de la cepa donadora y la cepa aceptora por separado. Las colonias obtenidas fueron confirmadas mediante el método de visualización de plásmidos Ekhardt.

### **4.9. Construcciones plasmídicas.**

#### 4.9.1. Construcción de una biblioteca genómica de *R. tropici*

ADN total de *R. tropici* CIAT899 se digirió con la enzima de restricción EcoRI y se ligó con el plásmido pIC 20H digerido con esta enzima. La ligación se introdujo en *E. coli* DH5 $\alpha$  y las colonias con inserto se seleccionaron por ser blancas en medio LB

suplementado con el sustrato cromógeno X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactosido).

#### 4.9.2. Construcción de plásmidos para su uso en la complementación de la mutación en la cepa CIAT899-13T2

De la hibridación de colonias se obtuvo una colonia con un plásmido con un inserto de ADN de *R. tropici* de 7,5 kb (plásmido pCM1). Este fragmento se digirió con EcoRI y se ligó en el sitio EcoRI del plásmido pSUP104. El plásmido obtenido se denominó pCM2. Un fragmento de 3,5 kb se purificó a partir del plásmido pCM1 digerido con XbaI y Sall y se ligó en el vector pIC19R digerido con estas mismas enzimas. Al plásmido así generado se lo llamó pCM3. De este modo el fragmento adquirió dos sitios EcoRI flanqueantes al inserto de ADN de *R. tropici*, que se utilizaron para su posterior clonación en el vector pSUP104 digerido con esta enzima. Se obtuvo de este modo el plásmido pCM6.

#### 4.9.3. Construcción de plásmidos con una fusión transcripcional con el gen *lacZ*

El plásmido pCM3 se digirió con EcoRI y el fragmento de ADN de *R. tropici* liberado se insertó en el sitio de esta misma enzima del pK18mob. El plásmido así generado, llamado pCM8, se digirió con XhoI (perdiéndose un pequeño fragmento XhoI-XhoI interno al *gshB*) y se ligó con el casete *lacZ-gm* del plásmido pAB2001 digerido con Sall. La orientación del casete insertado se verificó mediante el estudio del tamaño de los fragmentos obtenidos mediante la digestión con BamHI, SmaI y XbaI. Se obtuvo de este modo el plásmido pCM11d, que contiene una fusión transcripcional *gshB:lacZ*.

Se construyó una fusión ORF-1:*lacZ*. Para esto el fragmento EcoRI de ADN de *R. tropici* inserto en el plásmido pCM3 se ligó en el sitio EcoRI del plásmido pK18mobH (que carece del sitio de reconocimiento para la enzima de restricción HindIII). El plásmido así generado se denominó pCM7. Este plásmido se digirió con HindIII (perdiéndose un pequeño fragmento interno que incluye el extremo 3' del ORF-1 y el extremo 5' del ORF-2) y se ligó con el casete *lacZ-gm* del plásmido pAB2001 digerido con esta misma enzima. La orientación del inserto en los plásmidos resultantes se verificó mediante la digestión con las enzimas BamHI, SacI y XbaI. Se obtuvo así los

plásmidos pCM10d y pCM10i (con el gen *lacZ* a favor y en sentido contrario a la orientación del ORF-1 respectivamente).

Con el objeto de construir una fusión transcripcional en el ORF-2, el fragmento de ADN de *R. tropici* obtenido a partir de la digestión del plásmido pCM3 con EcoRI se insertó en el sitio de esta misma enzima del plásmido pK18mobB (pK18 modificado de modo de eliminar el sitio BamHI). El plásmido resultante se digirió con BamHI y se ligó con el casete *lacZ-gm* del plásmido pAB2001 digerido con esta misma enzima. La orientación del casete en el plásmido resultante se determinó mediante el corte con las enzimas XhoI, HindIII y XbaI. Los plásmidos resultantes se denominaron pCM13d (con el gen *lacZ* en la misma orientación que el ORF-2) y pCM13i (con el gen *lacZ* en orientación contraria al ORF-2).

Para obtener una fusión ORF-3:*lacZ* se ligó un fragmento EcoRI-BglII, proveniente del plásmido pCM1 en el plásmido vector pUCK4. Este fragmento luego se liberó usando los sitios EcoRI del vector y se insertó en el sitio de esta misma enzima del plásmido pBluescript, con el objeto de anexar al fragmento los sitios PstI y Sall provenientes de este vector. El plásmido resultante se digirió con estas dos últimas enzimas y se ligó en el plásmido pK18mobSE (con una delección SmaI-EcoRI que elimina el sitio KpnI) digerido con estas enzimas. Al plásmido resultante se le insertó el casete *lacZ-gm* del plásmido pAB2001 digerido con KpnI en el sitio de esta enzima. La orientación del casete se verificó mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos para los genes *lacZ* y *gshB* y *gm* y *gshB*. Se obtuvieron de este modo los plásmidos pCM12d (con el gen *lacZ* en la misma orientación que el ORF-3) y pCM12i (con el gen *lacZ* en orientación contraria al ORF-3).

#### 4.9.4 Construcción de una fusión traduccional entre un fragmento que incluye al extremo 5' del gen *gshB* y su región próxima y el gen *lacZ*

Se construyó una fusión entre la región 5'- del gen *gshB* y el gen reportero *lacZ*. Se identificó un sitio BglII interno al gen y un sitio HindIII, en la región 5' adyacente al gen *gshB*, que dan lugar a un fragmento de 900 bp. El fragmento BglII -HindIII se clonó en el único sitio BamHI que contiene el plásmido pNM481 (Minton, 1984). Este plásmido contiene el gen estructural de la  $\beta$ -galactosidasa desprovisto de su promotor y por la ubicación del sitio BamHI permite, que los marcos de lectura de *gshB* y *lacZ* resulten en fase generando una fusión traduccional. La mezcla de ligación se usó para

electrotransformar células de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Las colonias transformantes fueron seleccionadas por la resistencia al antibiótico ampicilina. El análisis de restricción del plásmido resultante demostró la presencia del fragmento BglII-HindIII esperado. Se verificó la orientación correcta del fragmento mediante la ubicación de un sitio SacI interno al mismo. El fragmento EcoRI-DraI que contiene la fusión *gshB-lacZ* se subclonó en un plásmido vector replicativo en rizobio, en el sitio EcoRI que interrumpe al gen del cloramfenicol. Se denominó a este último plásmido pCM9. En la figura 1 se esquematizan los distintos pasos seguidos.

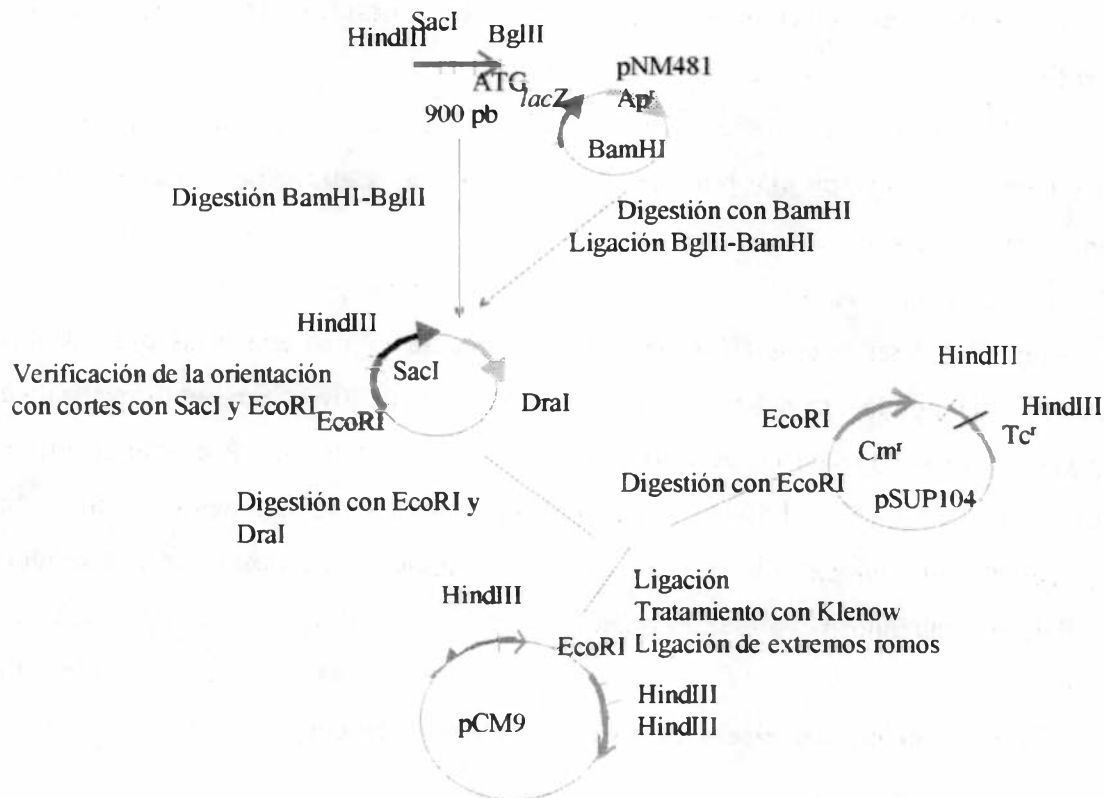


Figura 1. Estrategia seguida para la construcción de una fusión transcripcional *gshB:lacZ*.

#### 4.9.5. Construcción del plásmido pCM20 (que contiene un fragmento interno del ORF-2)

Se amplificó ADN del plásmido pCM1 usando oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento interno del ORF-2 de 350 pb usando oligonucleótidos específicos. Este fragmento se clonó en el plásmido pGemT-Easy, para luego, utilizando los sitios EcoRI de este vector, subclonarlo en el sitio de esta enzima del plásmido pSUP102. De este modo se obtuvo el plásmido pCM20.

#### 4.9.6. Construcción de un plásmido que contiene un fragmento interno de un gen *kef* de *R. tropici*

Se diseñaron oligonucleótidos a partir regiones conservadas de las secuencias de genes *kef* presentes en el banco. Estos oligonucleótidos se usaron para amplificar ADN total de *R. tropici*, obteniéndose un único fragmento del tamaño esperado (600 pb) interno del gen. Este fragmento se clonó en el vector pGemT-Easy. Mediante la digestión con NcoI y XhoI, se obtuvieron fragmentos de tamaño similar a los esperados para *S. meliloti*. El plásmido resultante se digirió con EcoRI y el inserto se clonó en el sitio de esa enzima del vector suicida pSUP102. El plásmido obtenido se denominó pCM23.

#### 4.9.7. Construcción de un plásmido que contiene un fragmento interno del gen *gshB* de *S. meliloti* 1021

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen *gshB1* a partir de la secuencia disponible en la base de datos de *S. meliloti*, los cuales amplificaron un fragmento interno de 784 pb de la región codificante de este gen. Este fragmento se clonó en el vector pGemT-Easy. Se verificó la identidad del fragmento amplificado mediante la digestión con BamHI y Sall. Este inserto luego se subclonó en el plásmido pSUP102, obteniéndose el plásmido pCM25.

#### **4.10. Determinación del efecto de estreses sobre el crecimiento de mutantes en medios de cultivo líquido.**

Las cepas a estudiar se cultivaron en medio mínimo GTS a 28° C con agitación hasta una densidad óptica a 600 nm de 1,0 unidad, luego de lo cual se resuspendieron en medio fresco en condiciones de estrés. Siempre se incluyeron controles que fueron resuspendidos en medio GTS. El crecimiento se evaluó mediante la determinación de la densidad óptica de los cultivos a 600 nm a lo largo del tiempo. Los experimentos se realizaron por duplicado, y fueron repetidos al menos dos veces.

Para provocar un estrés por acidez, los cultivos se resuspendieron en medio GMS pH 4,85. Los experimentos de acidificación citoplasmática se realizaron suplementando al medio GTS con acetato de sodio, a partir de una solución stock 2,5 M,

pH 5,5, hasta una concentración final de 20 mM (Pérez Galdona y Kahn, 1994). En los ensayos de estrés osmótico se utilizó en el medio GTS con una concentración final 0,3 M de NaCl (Ricciolo *et al*, 2000). El estrés por el agregado de metilglioxal se realizó agregando a los cultivos este agente a concentración final 2,5 mM a partir de una solución madre 100 mM. Los ensayos con ditioneitol (2,3-dihidroxi butano-1,4-ditione, DTT) se realizaron agregando este agente en concentración final 0,1, 0,2 y 0,4 mM. En los ensayos de crecimiento en medio mínimo con déficit de C se utilizó medio mínimo GTS modificado, en el cual la concentración de glucosa-succinato de sodio fue reducida a un 50%. Para el ensayo de déficit de N se utilizó medio GTS con el nivel de cloruro de amonio reducido a un 5%.

#### **4.11. Ensayos de inducción de catalasa**

Se cultivaron células de las cepas a estudiar en medio GTS a 28°C con agitación durante la noche. Luego se las resuspendió en medio GTS fresco, continuándose con la incubación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,3 unidades. Para la inducción se realizaron 5 agregados de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> espaciados en 12 minutos hasta una concentración final de 200 µM, según el método descrito por Herourart *et al*, (...). Se extrajeron muestras para la determinación de actividad catalasa a tiempo cero y 2 horas después de la inducción.

#### **4.12. Determinaciones enzimáticas**

##### **4.12.1. Determinación enzimática del contenido de glutatión.**

- Condiciones de crecimiento de los cultivos: los cultivos se crecieron en medio mínimo GTS durante toda la noche, luego se resuspendieron en medio GTS fresco en incubados hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5 unidades. Para el estudio del efecto de la acidez sobre los niveles de glutatión los cultivos se centrifugaron y resuspendieron en medio GMS pH 5,3, continuándose con la incubación. Cultivos controles se resuspendieron en GTS. Se tomaron muestras a distintos tiempos, que fueron procesadas como se detalla en el siguiente inciso. Para estudiar el efecto del agregado de CINA sobre el nivel de glutatión celular, los cultivos se crecieron como se acaba de describir, pero en vez de centrifugar las células, se agregó CINA en

concentración final 1,5 y 0,3 M y se prosiguió con la incubación, extrayéndose muestras a distintos intervalos a lo largo del tiempo. Los experimentos se realizaron por duplicado y fueron repetidos al menos una vez.

- Preparación de los extractos celulares (Modificado de Chesney *et al*, 1996):

i) las células se precipitaron centrifugando a 8000 rpm por 10 min. en GSA;

ii) se lavaron con 50 ml de bufer fosfato pH 7,0;

iii) se centrifugó nuevamente, y las células precipitadas se resuspendieron en 1 ml de bufer fosfato pH 7,0;

iv) las células se rompieron por sonicación en un aparato Sanyo Soniprep 150 (4 pulsos de 15 micrones de potencia, durante 30 segundos, con intervalos de 30 segundos en agua-hielo).

v) el sobrenadante se extrajo por ultracentrifugación a 20.000 rpm durante 30 min. (rotor SW40). Luego se le agregó 5% p/v de ácido sulfosalicílico y las muestras fueron guardadas a 4° C hasta su uso.

- Medición del contenido total de glutatión por el método enzimático de Anderson, (1985): se utilizó el ensayo de reciclado para el GSH total (GSH + GSSG, en equivalentes de GSH). El GSH es oxidado por el DTNB [5,5 ditiobis (2-ácido nitrobenzoico)] para dar GSSG y la formación estequiométrica de TNB (5-thio-2-ácido nitrobenzoico). El GSSG es reducido a GSH por acción de la enzima altamente específica glutatión reductasa (GSSG reductasa) y NADPH. La velocidad de formación de TNB es seguida a 412 nm y es proporcional a la suma de GSH y GSSG presente.



Procedimiento: se colocó en una cubeta de cuarzo 700 µl de bufer fresco, 100 µl de solución de DTNB, y agua bidestilada estéril (200 µl menos el volumen de la muestra, por ej. si el volumen de la muestra es de 25 µl, se usa 175 µl de agua). Las cubetas se calentaron a 30° C en el compartimento del espectofotómetro durante 15 min. Luego 25 µl de muestra (equivalente en ambas cepas a 60 µg de proteína) fue agregada y mezclada. El ensayo se inició al agregar 10 µl de la enzima GSSG reductasa. La formación de TNB se registró en forma continua mediante la determinación de la absorbancia a 412 nm hasta un total de 2 a 2,5 unidades de absorbancia.



#### Reactivos:

- buffer stock: fosfato de sodio (143 mM) y Na<sub>4</sub>-EDTA (6,3 mM); a pH 7,5;
- buffer fresco: NADPH (0,248 mg/ml) en buffer stock se preparó en el momento de usarlo;
- DTNB: DTNB (6mM) se preparó en buffer stock (se guarda en freezer);
- GSSG reductasa: se utilizó reductasa del glutatión de la levadura baker (Sigma-Aldrich). La enzima se diluyó en buffer stock a una concentración de 266 U/ml y se almacenó a 4° C;
- estándares de GSH : los estandares se diluyeron diariamente en 5% p/v de ácido 5-sulfosalicilico a partir de una solución madre mantenida en freezer (100 mM de GSH), preparada semanalmente.
- La determinación de proteínas totales se realizó mediante el método de Lowry.

#### 4.12.2. Ensayos de actividad $\beta$ -galactosidasa

- Se crecieron cultivos como en el inciso anterior. Los distintos agentes de estrés fueron agregados al medio de cultivo para cada experimento en las concentraciones que se indican en Resultados. En las determinaciones de inducción en condiciones de acidez los cultivos se centrifugaron y resuspendieron en medio GMS pH 5,3. Se tomaron muestras periódicamente durante 24 horas. Los experimentos se realizaron por duplicado y fueron repetidos al menos dos veces, los resultados que se muestran son la media entre duplicados de una misma determinación. Se determinó la densidad óptica a 600 nm de los cultivos utilizados para el cálculo de las Unidades Miller.
- La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó usando o-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) según el procedimiento por Miller, (1972): . Se centrifugaron 400  $\mu$ L de cultivo el sobrenadante se eliminó y se resuspendieron en igual volumen de agua destilada. Luego se les agregó 400  $\mu$ L de buffer Z, 50  $\mu$ L de cloroformo y 100  $\mu$ L de SDS 0,1 %. Se agitó las muestras vigorosamente durante 1 minuto y se les agregó 150  $\mu$ L de solución de ONPG (4 mg/ mL en buffer Z). Se incubó a las muestras a 28 °C durante 20 minutos, luego de lo cual se detuvo la reacción mediante el agregado de 400  $\mu$ L de CO<sub>3</sub>Na<sub>2</sub> 1 M. Las muestra se centrifugaron 4 minutos a 12.000 x g y se evaluó la absorbancia a 420 nm. Los resultados se expresan en Unidades Miller, definidas como

[absorbancia a 420 nm x 1000/ (densidad óptica a 600 nm de los cultivos x tiempo de incubación)].

Soluciones:

Buffer Z: 0,06 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,04 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, KCl 0,01 M, MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,001 M y 0,05 M β-mercaptoetanol, pH 7,0.

#### 4.12.3. Determinación de actividad catalasa

- La actividad catalasa se evaluó en extractos de nódulos y en cultivos líquidos. Los extractos de nódulos se trataron como se indica abajo. Los extractos celulares a partir de cultivos se procesaron del siguiente modo: se centrifugó 100 mL de cultivo de las distintas cepas a estudiar a 7000 x g durante 10 min a 4 °C. El pellet celular se resuspendió en 1 mL de buffer fosfato (50mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1 mM EDTA) y se lo sonicó en hielo (seis pulsos de 1 s, con un pulso cada 30 segundos). Se clarificó el extracto sonicado mediante centrifugación a 10,000 x g durante 10 minutos. La concentración de proteínas de los extractos se determinó por Lowry.

- La actividad catalasa se determinó usando el protocolo de Herouart (1996). A 300 µL de extracto celular o de nódulo se les agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentración final 20 mM. Se evaluó la descomposición del peróxido de hidrógeno a 240 nm. El coeficiente de extinción molar del peróxido de hidrógeno a esta longitud de onda es de 43 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>. Una unidad de actividad catalasa se definió como la cantidad de enzima que degrada 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min<sup>-1</sup> a 30 °C. Los experimentos se hicieron por duplicado y se repitieron al menos una vez.

#### 4.12.4. Determinación de actividad proteasa

- La actividad proteasa de los extractos de nódulos se midió usando 125 mg mL<sup>-1</sup> de azocaseína como sustrato (Malik *et al*, ). Una unidad de actividad proteasa se fue definida como la cantidad de enzima que produce un aumento en la absorbancia de 0,1 unidades h<sup>-1</sup> a 37 °C. Los experimentos se hicieron por duplicado y se repitieron al menos una vez.

#### 4.12.5. Medida de actividad ascorbato peroxidasa

- La actividad ascorbato peroxidasa se determinó según el procedimiento de Sheokand *et al* (1996). A 300  $\mu\text{L}$  de extracto de nódulos se le agregó ácido ascórbico a concentración final 0,1 mM y  $\text{H}_2\text{O}_2$  a concentración final 1 mM. La descomposición del ascorbato se siguió mediante la absorbancia a 265 nm durante 5 minutos. La autooxidación del ascorbato en ausencia de peróxido de hidrógeno fue despreciable. Una unidad de actividad ascorbato peroxidasa se definió como la cantidad de enzima que degradaba un nanomol de ascorbato por  $\text{min}^{-1}$ . Los experimentos se hicieron por duplicado y se repitieron al menos una vez.

#### **4.12. Determinación de potasio intracelular**

- Las cepas a estudiar se cultivaron en medio mínimo GTS hasta una fase exponencial tardía. Posteriormente estos cultivos fueron diluidos en medio frescos y crecidos hasta fase exponencial ( $\text{OD}_{600} = 0,5$ ). Luego los cultivos fueron divididos según el número de tratamientos a realizar. En los ensayos de acidificación se los centrifugó y resuspendió en medio GMS pH 5,3, continuándose con la incubación. Se incluyeron en todos los casos controles en medio GTS. Para estudiar los efectos del metilglioxal y clorodinitrobenzoceno sobre los niveles de potasio intracelulares los cultivos se crecieron como se de indicó, pero en este caso al medio GTS se le agregó el agente a evaluar en las siguientes concentraciones: metilglioxal 1,25 ó 0,25 mM o CDNB 0,15 ó 0,25 mM final, continuándose con la incubación. Se tomaron muestras de 1 ml por duplicado para la determinación de proteínas totales y muestras de 1,5 ml, también por duplicado, para el análisis de contenido de  $\text{K}^+$ . Los experimentos se realizaron por duplicado y fueron repetidos al menos una vez.

- Para la determinación de potasio las muestras se precipitaron en microcentrífuga a 12000 x g luego de lo cual se les agregó 1 ml de agua bidestilada estéril. Se hirvieron durante 5 minutos se enfriaron a  $-20^\circ\text{C}$  hasta la determinación del contenido de  $\text{K}^+$ . Este se determinó por espectrofotometría de llama (Varian. Spectra AA300). La emisión de llama funcionó con una mezcla de aire ( $3\text{ kg/cm}^2$ ) y acetileno ( $1,5\text{ kg/cm}^2$ ). Para la

curva de calibración se uso como blanco agua desionizada y los estándares consistieron en diluciones de una solución de reserva de  $K^+$  de Carlo Erba 1000 mg/l a una concentración final de 8,7; 21,8; 87,2, 218 mg/l (Ferguson, 1995).

- La determinación de proteínas se realizó mediante el método de Lowry .

#### **4.13. Determinación de proteínas totales.**

Se realizó mediante el ensayo de Lowry *et al*, (1951) las que son comparadas con una curva de calibración realizada con una solución de BSA.

#### **4.14. Ensayos de inoculación de plantas**

Esterilización superficial de semillas: las semillas de poroto se esterilizaron por agitación en etanol 95% v/v 30 segundos, luego se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio ( $8,25g.l^{-1}$ ), y finalmente se enjuagaron seis veces con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas se germinaron en en placas agar-agua invertidas a 28° C y en oscuridad. Las semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) se esterilizaron por agitación durante 20 minutos en una solución  $HgCl_2$  0,2% y  $HClO$  0,5%.

Las plántulas de poroto de tres días de edad se transfirieron a macetas plásticas de 800 cm<sup>3</sup> conteniendo vermiculita. Una vez transferidas las plántulas se inocularon con 5 ml de una suspensión de rizobios en solución salina Fahraeus. Las macetas con las plantas se colocaron en invernáculo en condiciones controladas de temperatura, luz y humedad (25°C, con un fotoperíodo de 16 hs, y una humedad relativa de 60%), se regaron con agua destilada estéril y en dos ocasiones con solución de Fahraeus, hasta la observación de resultados. Las semillas de alfalfa se crecieron en placas de agar Fahreus.

Variedades de plantas utilizadas: *Phaseolus vulgaris*: Negro NAG12 fue provisto por INTA-Cerrillos (Pcia. de Salta). Es una variedad con buena capacidad de nodulación, de uso comercial. *Medicago sativa*.....

#### **4.15. Preparación de extractos de nódulo para la determinación de enzimas marcadores de senescencia**

Las proteínas solubles nódulares se extrajeron según el protocolo de Lodeiro *et al* (1999). Los nódulos se cosecharon e inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido. Luego se picaron usando un mortero pre-enfriado al que se le adicionó polivinilpolipirrolidina en polvo. El componente soluble se extrajo mediante el agregado de buffer fosfato 25 mM con 1 mM de CaCl<sub>2</sub>. La suspensión resultante se clarificó por centrifugación a 12.000 x g durante 10 minutos. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 500 µL y se guardó a -80 °C hasta su procesamiento.

#### **4.16. Análisis del patrón de expresión de proteínas**

- Preparación de geles desnaturalizantes de poliacrilamida para la separación de proteínas: se realizó según el protocolo de Laemmli *et al* (1970) usando las indicaciones provistas por BIO-RAD.
- Marcación in vivo de las proteínas con <sup>35</sup>S metionina: cultivos líquidos en medio GTS se centrifugaron y resuspendieron en GMS pH 5,5 o GTS suplementado con acetato de sodio 20 mM. Se tomaron alícuotas de los cultivos de 1 mL y se les agregaron 15 µCi / mL de <sup>35</sup>S metionina. A diferentes tiempos la marcación se detuvo enfriando las muestras en agua-hielo. Luego se las centrifugó a 12000 x g 3 minutos, se las lavó con buffer fosfato salino y se las resuspendió en buffer SDS de siembra. La metionina marcada incorporada a las proteínas fue cuantificada. Se sembraron entre 100.000 y 150.000 cpm por calle del gel. Los geles se corrieron a 220 V durante 3 horas, se fijaron, secaron y revelaron por autorradiografía.

## **5. RESULTADOS**

### **5.1. Estudio de la organización genética y del patrón de expresión del gen de la glutatión sintetasa.**

#### **5.1.1. Análisis transcripcional de la región *gshB* de *R. tropici*.**

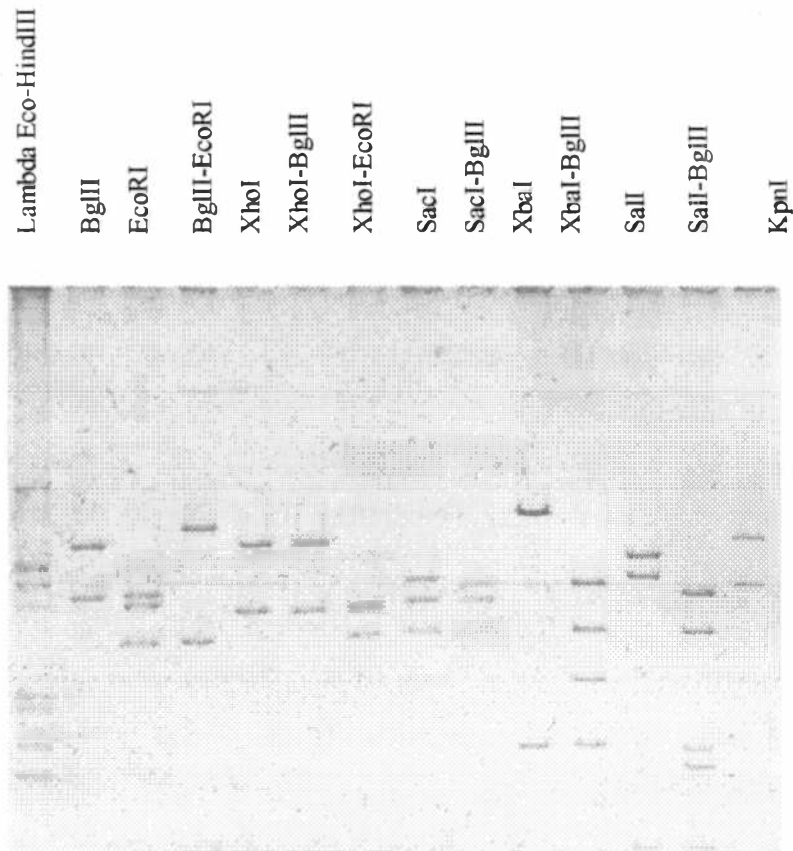
El mutante *R. tropici* CIAT899-13T2, que tiene una única inserción del transposón Tn5-*luxAB* en el gen *gshB* fue aislado en nuestro laboratorio por su sensibilidad a la acidez. Nos propusimos entonces estudiar la organización genética del fragmento EcoRI que contiene al gen *gshB*, clonado en el plásmido p13T2.

##### **5.1.1.1. Clonación de región *gshB* de *R. tropici* CIAT899.**

Con el propósito de clonar el gen *gshB* salvaje se construyó una biblioteca genómica de *R. tropici* CIAT899. Por el plásmido p13T2, que contiene un fragmento EcoRI de ADN que contiene al gen *gshB* mutado con el transposón Tn5-*luxAB*, conocíamos que el fragmento EcoRI que contiene al gen *gshB* era de unas de 7 kb. Se encaró la construcción de una biblioteca parcial de fragmentos EcoRI de ADN de *R. tropici* mayores a 5 kb. Esta colección de fragmentos fue ligada en el plásmido vector pIC20H linealizado con EcoRI. La ligación fue introducida en la cepa DH5 $\alpha$  y las colonias transformantes fueron seleccionadas por ser blancas en presencia de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indoil- $\beta$ -D-galactósido), lo que demuestra la interrupción del gen *lacZ*, presente en el vector, por una inserción. Estas colonias fueron sometidas a un análisis de hibridación de colonias. Para esto se usó como sonda un fragmento de ADN de *R. tropici* obtenido por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *gshB*. Como resultado de la hibridación se obtuvieron dos colonias positivas. Se extrajo el ADN plasmídico de estas colonias y se utilizó como molde para PCR utilizando oligonucleótidos específicos para amplificar el gen *gshB*. El resultado de la amplificación dio un fragmento del tamaño esperado (500 pb), confirmando que dichos plásmidos contenían el gen buscado. Asimismo, el ADN plasmídico de estas colonias fue analizado con enzimas de restricción, confirmándose que

las colonias seleccionadas efectivamente contenían un plásmido con el fragmento buscado. Uno de estos plásmidos recombinantes fue denominado pCM1. El mapeo de restricción parcial de este fragmento se muestra en la figura 1.

A.



B.

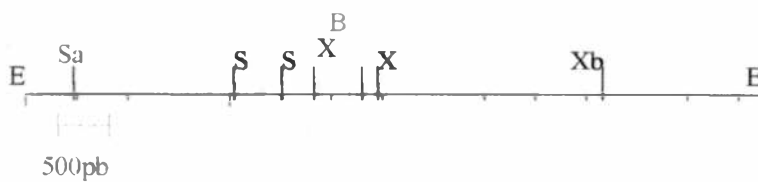


Figura 1. Análisis de restricción del fragmento de ADN de 7,5 kb de *R. tropici* clonado en el plásmido pCM1. A. Electroforesis en gel de agarosa del fragmento obtenido luego de la incubación con las diferentes enzimas de restricción. B. Mapa de restricción del fragmento en el cual se ubican los sitios de corte de diferentes enzimas. Abreviaciones: S: Sall, B: BglIII, X: XhoI, E: EcoRI, Xb: XbaI, Sa: SacI.

5.1.1.2. Análisis de complementación con el plásmido pCM1.

Con el propósito de demostrar que el fragmento de ADN de *R. tropici* clonado en el plásmido pCM1 contiene al gen *gshB* funcional, se ensayó su capacidad para restaurar el fenotipo salvaje en la cepa CIAT899-13T2. Con este objetivo se subclonó este fragmento en el plásmido pSUP104 replicativo en rizobio, generando el plásmido pCM2, que fue transferido mediante conjugación a la cepas mutante CIAT899-13T2 y salvaje CIAT899. Los transconjugantes obtenidos se denominaron CIAT899(pCM2) y CIAT899-13T2(pCM2), respectivamente.

Se evaluó el crecimiento de células de las cepas CIAT899(pCM2) y CIAT899-13T2(pCM2) en cultivos en medio líquido y en placa; en GTS, en GTS suplementado con metilglioxal y en medio GMS. Se utilizaron las cepas salvaje CIAT899 y mutante CIAT899-13T2 como controles. Los resultados de estos estudios se muestran en la figura 3. En medio GTS la cepa CIAT899-13T2, a diferencia de la cepa salvaje CIAT899, presenta una fase *lag* aumentada tal como ya fuera demostrado por Riccillo y col., (2000). Es incapaz de crecer en medio GMS pH 4,8, y en medio GTS suplementado con metilglioxal. La cepa CIAT899-13T2 que contiene el plásmido con el fragmento de ADN de 7,5 kb con el gen *gshB* CIAT899-13T2(pCM2) recuperó el fenotipo salvaje, demostrando que el fragmento clonado es capaz de revertir el efecto de la mutación en la cepa CIAT899-13T2.

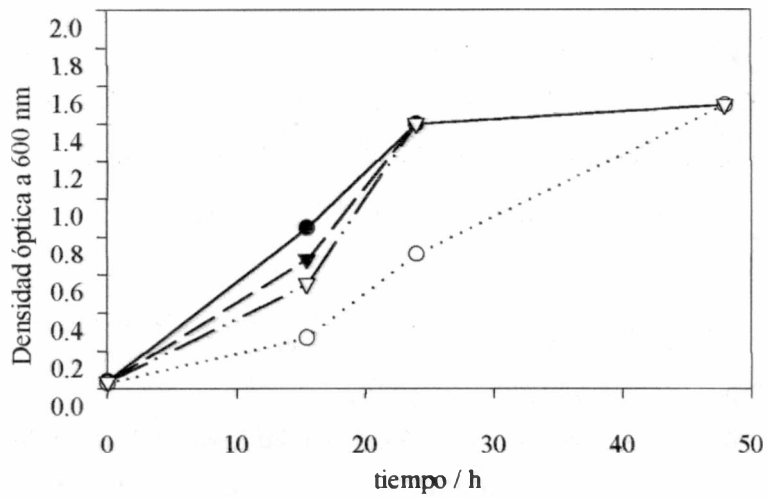
Con el objeto de delimitar la región de ADN que es importante para la complementar el mutante *gshB* se procedió a subclonar un fragmento XbaI-SalI 3,5 kb del plásmido pCM1. Este fragmento, que incluye la secuencia completa del gen *gshB*, se clonó en el plásmido vector pIC19R digerido con XbaI y SalI, generando el plásmido pCM3. De este modo, a ambos lados del fragmento insertado quedan sendos sitios EcoRI. El plásmido pCM3 se digirió aprovechando los sitios EcoRI y el fragmento de ADN de *R. tropici* liberado fue clonado en el plásmido replicativo en rizobio pSUP104 digerido con esta misma enzima, dando así origen al plásmido pCM6. Este plásmido fue transferido conjugativamente a la cepa mutante y salvaje, CIAT-13T2 y CIAT899 respectivamente.

Se hicieron estudios de crecimiento de células de las cepas CIAT899-13T2(pCM3) y CIAT899(pCM3) en GTS, GMS y GTS suplementado con metilglioxal. En todos los casos las células recuperaron el fenotipo salvaje, como se muestra en la figura 3, lo cual indica

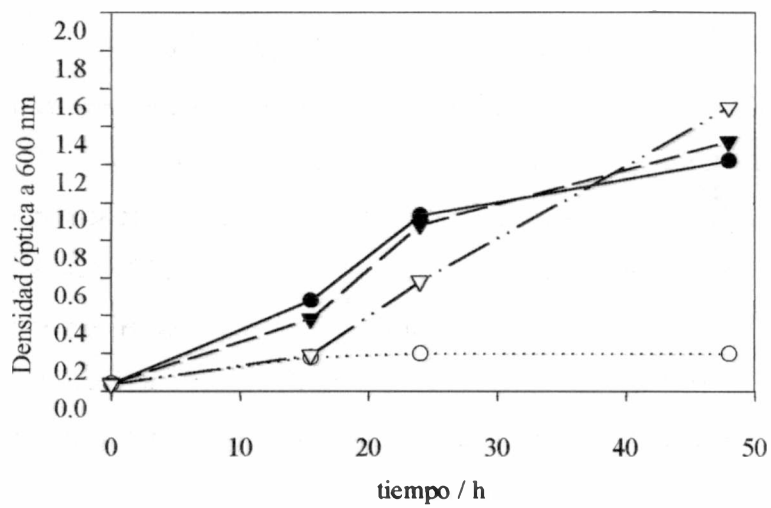


que el fragmento clonado en el plásmido pCM3 es suficiente para complementar el defecto del mutante CIAT899-13T2.

A.



B.



C.

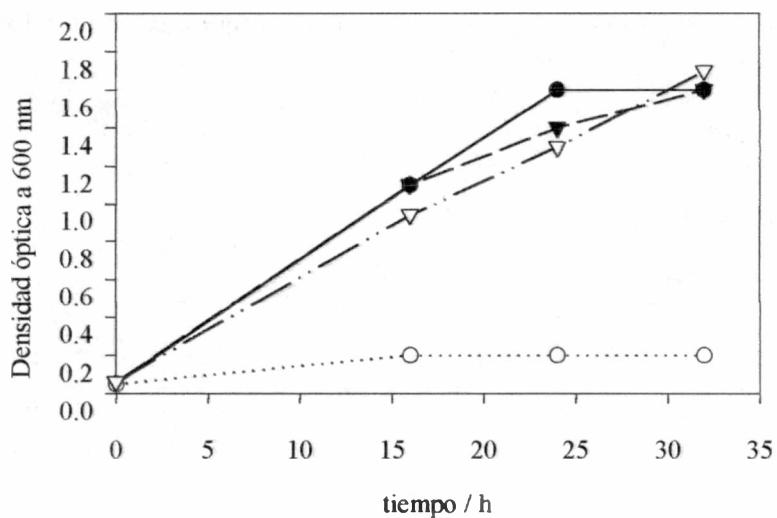


Figura 3. Ensayo de complementación del mutante CIAT899-13T2 con el fragmento de ADN de *R. tropici* salvaje clonado en el plásmido pCM2. El crecimiento de células de las distintas cepas se determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm. A. Crecimiento en medio GTS; B. crecimiento en medio GMS; C. crecimiento en medio GTS suplementado con metilglioxal 2,5 mM.

● CIAT899 ○ CIAT899-13T2 ▼ CIAT899 (pCM2) ▽ CIAT899-13T2 (pCM2)

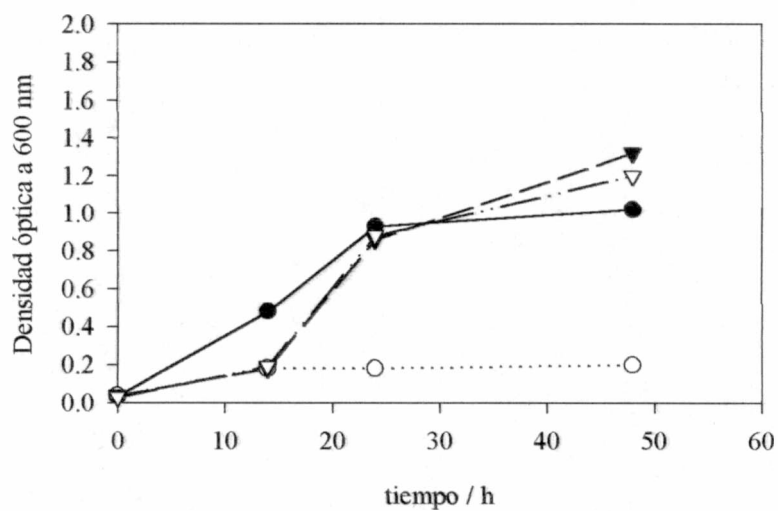


Figura 4. Ensayo de complementación del mutante CIAT899-13T2 con el fragmento de ADN de *R. tropici* salvaje de 3,5 kb clonado en el plásmido pCM6. El crecimiento de células de las distintas cepas se

determinó midiendo la densidad óptica a 600 nm. Se estudió el crecimiento de las distintas cepas en medio GMS pH 4,8.

—●— CIAT899 ···○··· CIAT899-13T2 —▼— CIAT899 (pCM6) —▽— CIAT899-13T2 (pCM6)

### 5.1.1.3. Análisis de la secuencia de ADN de *R. tropici* clonado en el plásmido pCM3.

A partir de estudios realizados en nuestro laboratorio se había determinado la secuencia de de 3058 pb del plásmido p13T2, el cual comprendía al gen *gshB*. El tamaño del fragmento secuenciado es un poco menor al del plásmido pCM3. Usando el programa de análisis Blast se identificaron en la región secuenciada cuatro marcos de lectura abiertos. Desde el extremo 5'- se encontraron dos marcos de lectura abiertos cortos denominados ORF-1 y ORF-2 respectivamente. Estos marcos de lectura no presentan homología con proteínas conocidas. Además, río abajo de éstos se encuentra, en fase, el marco de lectura abierto correspondiente al gen *gshB*. A continuación del extremo 3' de este gen, comienza un marco de lectura abierto parcialmente secuenciado al que denominamos ORF-3. En la figura 5 se muestra un esquema del fragmento secuenciado, indicabdo los distintos marcos de lectura abiertos hayados. La secuencia del ORF-3 presenta homología con un marco de lectura abierto identificado en el genoma de *S. meliloti* al cual se le asigna la función de una quelatasa dependiente de Mg<sup>++</sup> (50 % de identidad, 52 % positivo) (ref), que también está presente en *Mesorhizobium loti* (41 % de identidad, 50 % positivo), *Agrobacterium tumefaciens* (44 % de identidad, 51 % positivo)ref y *Brucella melitensis* (39 % de identidad, 50% positivo)ref y *Bradyrhizobium japonicum* (41 % de identidad, 50 % positivo)ref.

De este análisis se puede concluir que en el fragmento clonado en el pCM3 se identifican cuatro marcos de lectura abiertos, tres de los cuales están en la misma fase de lectura (*gshB*, ORF-1 y ORF-2). Sólo dos de estos ORF presentan homología con secuencias conocidas.

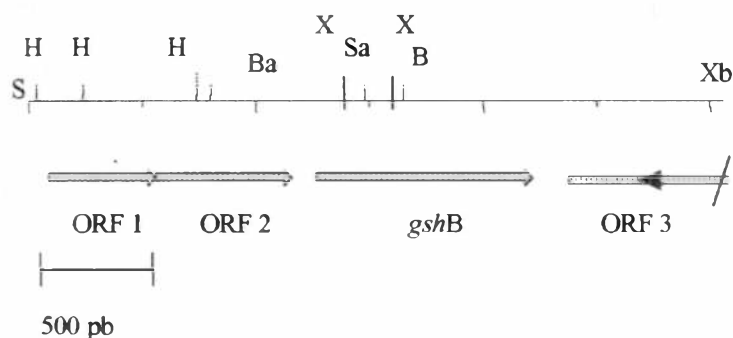
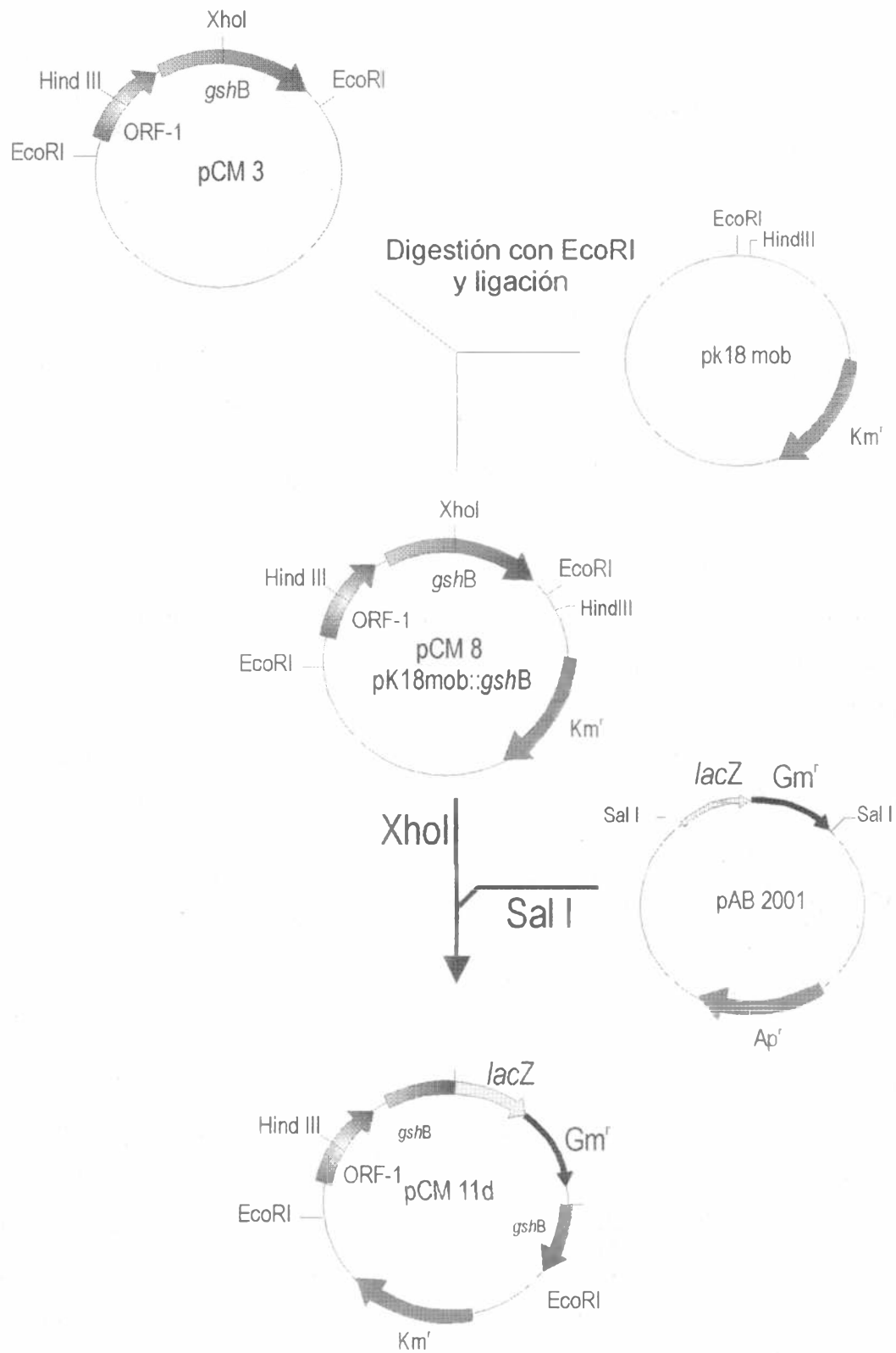


Figura 5. Análisis de la región *gshB* de *R. tropici*. Fragmento EcoRI de 3,5 kb de ADN de *R. tropici* clonado en el plásmido pCM6. Con flechas se indican los distintos marcos de lectura deducidos del análisis de secuencia. Abreviaturas: Ba: BamHI; B: BglII; H: HindIII; Sa: SacI; S: Sall; Xb: XbaI; X: XhoI.

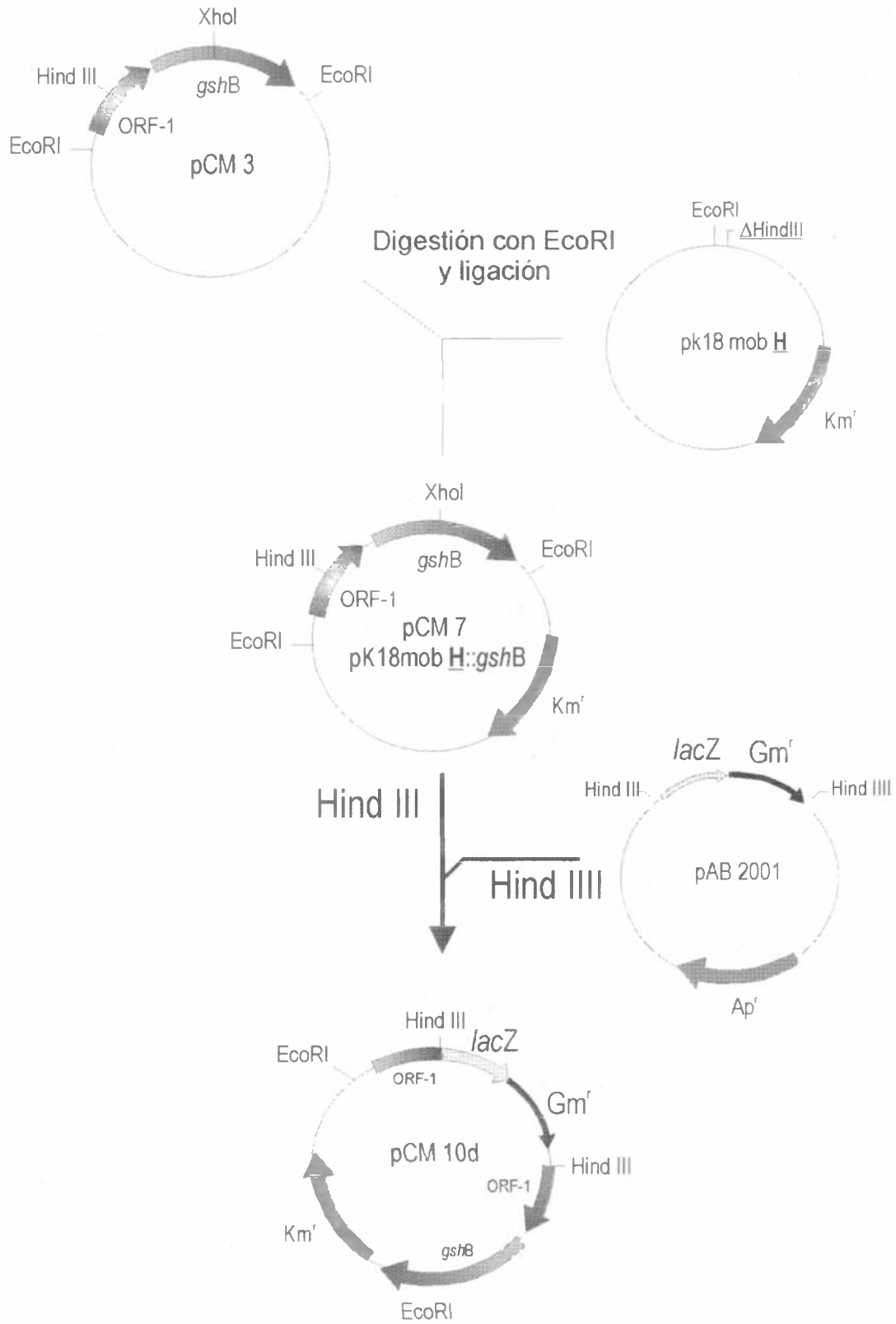
#### 5.1.1.4. Análisis funcional de los marcos de lectura abiertos encontrados.

Nos propusimos investigar si los marcos de lectura encontrados corresponden a genes activos y si las mutaciones en los mismos provocan cambios fenotípicos. Con este fin se generaron fusiones transcripcionales entre cada uno de los marcos de lectura individualmente y el gen *lacZ*. El fragmento de ADN de *R. tropici* del plásmido pCM3 fue insertado en el plásmido pK18mob, no replicativo en rizobio y fácilmente movilizable. En otro experimento se subclonó un fragmento EcoRI-BglII obtenido de la digestión del plásmido pCM1, en el plásmido pK18mob. Este fragmento comprende a la región 3' del gen *gshB* y una kilobase de la región adyacente, generando el plásmido (pCM4) (ver figura 6). A partir de los plásmidos pCM7, pCM8, y pCM4, se construyeron fusiones entre las secuencias de *R. tropici* y el gen *lacZ* desprovisto de su promotor. La fuente de *lacZ* fue el plásmido pAB2001, a partir del cual se obtuvo la secuencia *lacZ* como un casete *lacZ*-Gm (fig. 6). El casete *lacZ*-Gm fue insertado en sitios de restricción únicos dentro de los marcos de lectura que identificamos en la región *gshB* de *R. tropici*. En la tabla 1 se detallan los distintos plásmidos obtenidos. Los plásmidos resultantes fueron transferidos a las cepas salvaje CIAT899 y mutante CIAT899-13T2. Se aislaron transconjugantes de los merodiploides resultantes de un único evento de recombinación. En la figura 7 se muestra el mapa de restricción del fragmento de 3,5 kb que comprende al gen *gshB*, indicando los lugares en los cuales se insertó el casete *lacZ*-Gm.

A.



B.



C.

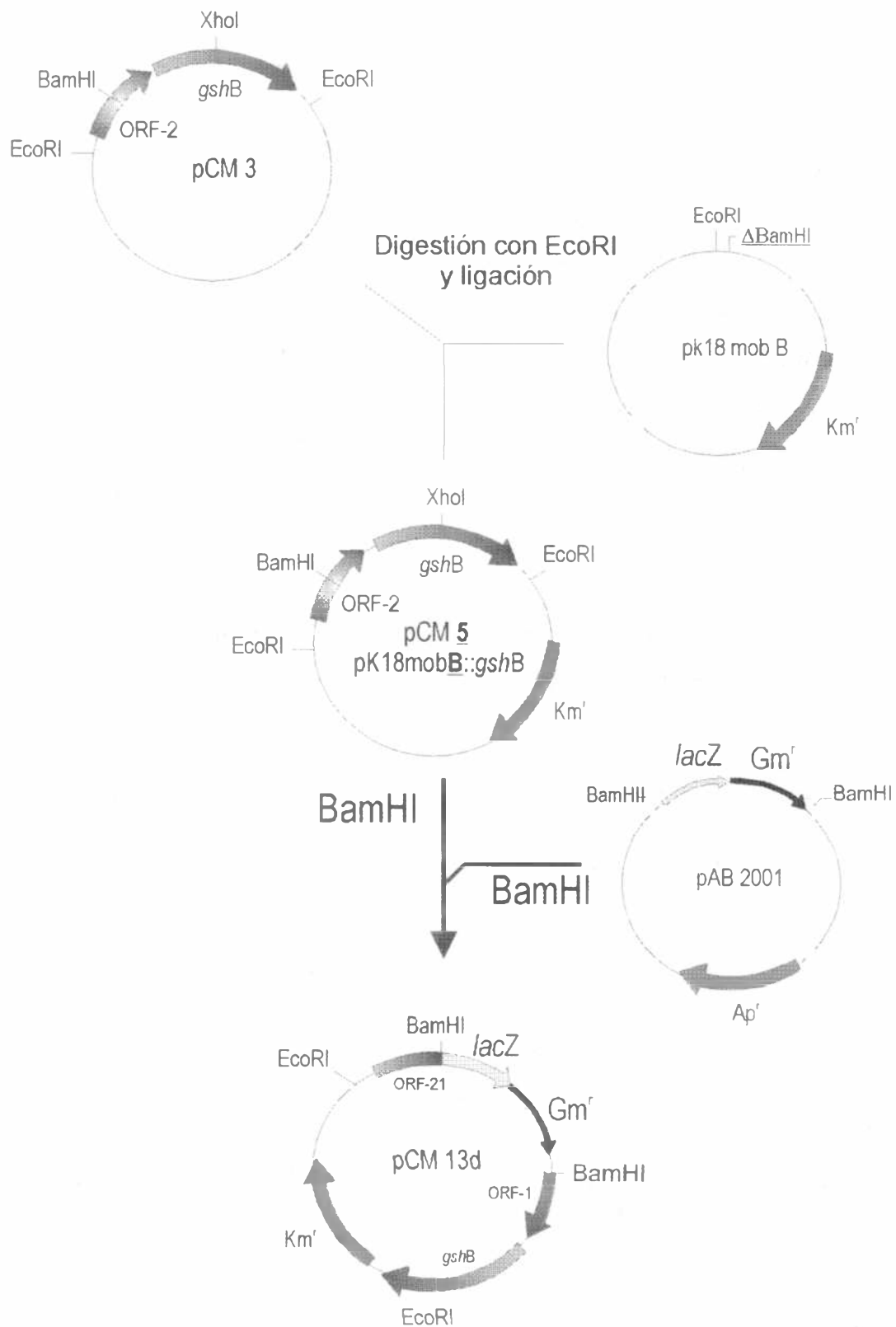


Figura 6. Esquema de la construcción de los plásmidos con fusiones con el gen *lacZ*. A. Esquema donde se detallan los distintos pasos seguidos para la construcción del plásmido pCM11. B. Esquema donde se detallan los distintos pasos seguidos para la construcción del plásmido pCM10. C. Esquema donde se detallan los distintos pasos seguidos para la construcción del plásmido pCM13.

Los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa, en los merodiploides en los ORF-1, -2 y -3 fueron similares a la actividad basal de la cepa salvaje (menor a 30 U.M.) en medio TY y en GTS. Las células *gshB-lacZ* alcanzaron valores superiores, en cultivos saturados de 500 y 1800 U.M. en medios GTS y TY, respectivamente. Las células de los merodiploides en los cuales la dirección del gen *lacZ* es 3'→5' con respecto al ORF interrumpido presentaron valores similares a los basales, como se muestra en la figura 7.

Las cepas resultantes de la integración de los distintas fusiones en células de la cepa CIAT899-13T2 (en un fondo *GshB<sup>-</sup>*) presentaron valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa similares a los de la cepa salvaje, exceptuando el caso de la que contiene la fusión en el gen *gshB*, que presenta valores más elevados, como se indica en la figura 8.

Estos resultados nos permiten concluir que en las condiciones ensayadas, sólo el ORF correspondiente al gen *gshB* se transcribe.

Cepa recombinante (Cepas derivadas de la CIAT899 y CIAT899-13T2 respectivamente, donde figura una sola es derivada de la cepa CIAT899)	Características	Plásmido
CM10 y CM18	pK18 con fragmento XbaI-SalI de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM3) <i>Gm<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup></i> con fusión transcripcional ORF1- <i>lacZ</i>	pCM10
CM11 y CM15	pK18 con fragmento XbaI-SalI de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM3) <i>Gm<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup></i> con fusión transcripcional <i>gshB-lacZ</i>	pCM11
CM12 y CM16	pK18 con fragmento EcoRI-BglII de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM1) <i>Gm<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup></i> con fusión transcripcional ORF3- <i>lacZ</i>	pCM12
CM13 y CM14	pK18 con fragmento XbaI-SalI de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM3) <i>Gm<sup>r</sup></i> , <i>Nm<sup>r</sup></i> con fusión transcripcional ORF2- <i>lacZ</i>	pCM13
CM10i	pK18 con fragmento XbaI-SalI de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM3) CIAT899-13T2 con fusión transcripcional ORF1- <i>lacZ</i> , en la cual en gen <i>lacZ</i> se encuentra en sentido 3'→5' con respecto al ORF interrumpido.	pCM10i
CM12i	pK18 con fragmento EcoRI-BglII de ADN de <i>R. tropici</i> (subclonado del plásmido pCM1) con fusión transcripcional ORF3- <i>lacZ</i> en la cual en gen <i>lacZ</i> se	pCM12i



CM13i

encuentra en sentido 3'→5' con respecto al ORF interrumpido.

pK18 con fragmento de ADN de *R. tropici* XbaI-SalI (subclonado del plásmido pCM3)CIAT899-13T2 con fusión transcripcional ORF2-lacZ en la cual en gen lacZ se encuentra en sentido 3'→5' con respecto al ORF interrumpido.

Tabla 1. Cepas recombinantes con fusiones transcripcionales con el gen lacZ. En la tabla se indican las distintas cepas merodiploides con fusiones en los distintos marcos de lectura y el gen lacZ construidas. Se muestran, asimismo, los plásmidos que dieron origen a estas cepas por conjugación y sus principales características.

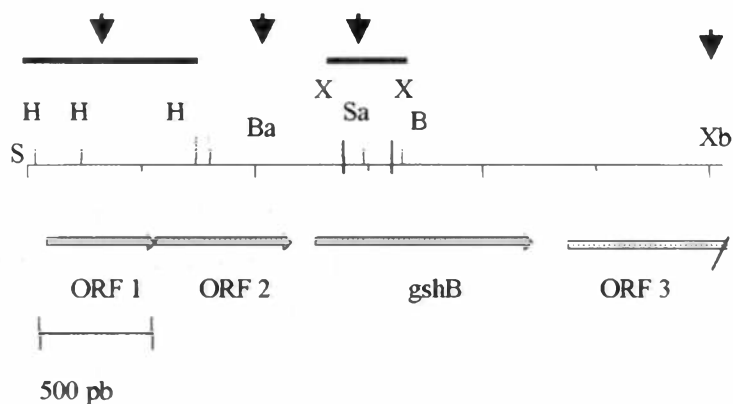


Figura 7. Mapa de la región *gshB* de *R. tropici*. Fragmento XbaI-SalI de ADN de *R. tropici* clonado en el plásmido pCM3, donde se señalan los marcos de lectura abiertos descritos en el texto (flechas grises). Las flechas negras señalan los sitios de inserción del casete *lacZ-gm*. Las líneas negras horizontales indican las secuencias del fragmento SalI-XbaI que fueron removidas y reemplazadas por la secuencia del casete *lacZ-gm* (ver materiales y métodos). Abreviaturas: Ba: BamHI; B: BglII; H: HindIII; Sa: SacI; S: SalI; Xb: XbaI; X: XhoI.

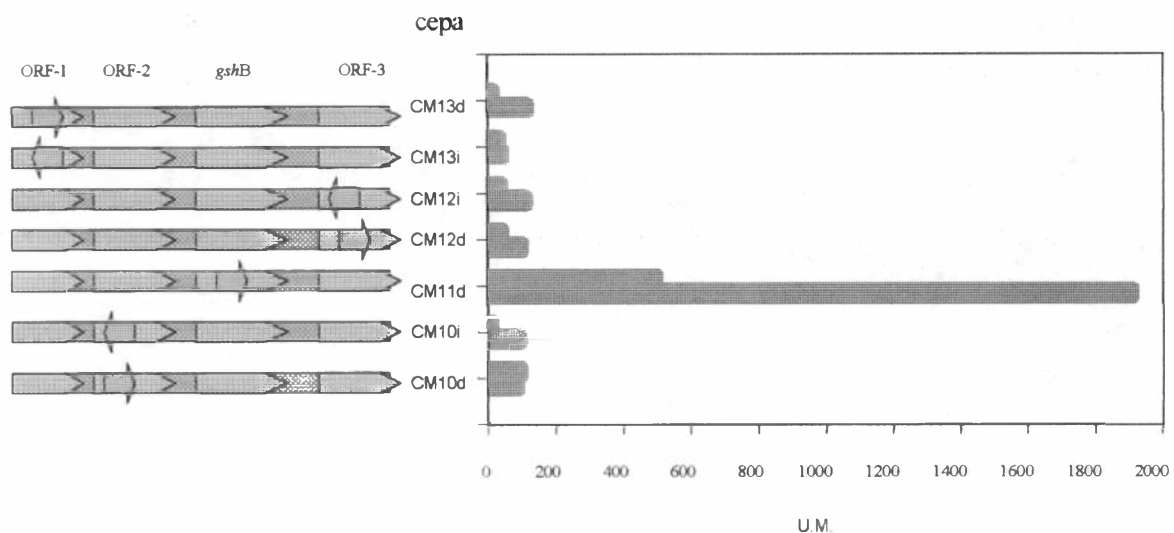


Figura 8. Análisis de la región *gshB* mediante fusiones con el gen *lacZ*. A la izquierda de la figura se ilustran esquemáticamente las fusiones de los ORF del fragmento de 3,5 kb XbaI-Sall y el gen *lacZ*. Con flechas verdes se indican los distintos marcos de lectura abiertos, con flechas rojas, el gen *lacZ*. A la derecha de la figura se muestran los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa, expresada en Unidades Miller, de células merodiploides en cada uno de los distintos marcos de lectura abiertos.

■ TY ■ GTS

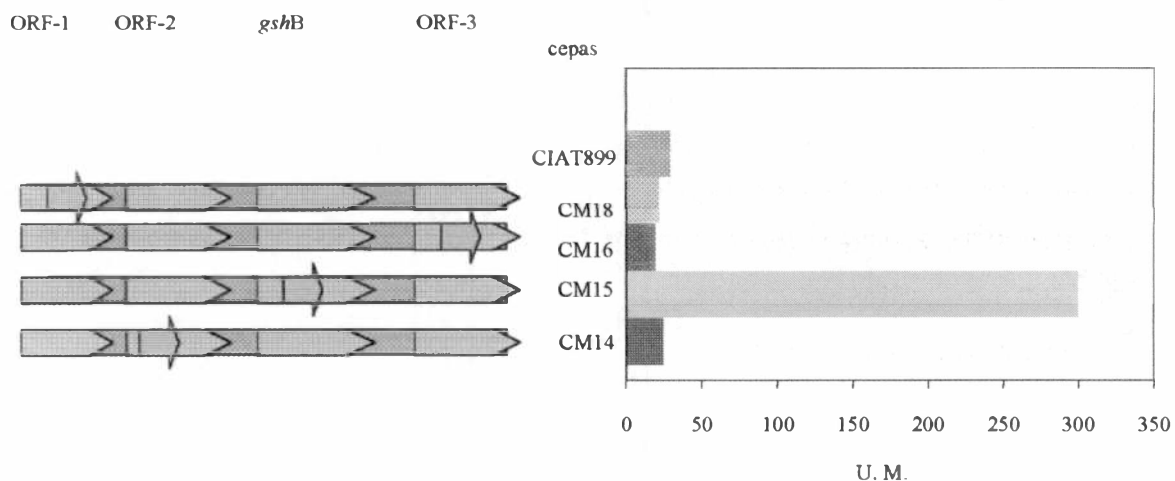


Fig. 9. Análisis de la región *gshB* mediante fusiones con el gen *lacZ*. A la izquierda de la figura se ilustran esquemáticamente las fusiones de los ORF del fragmento de 3,5 kb XbaI-Sall y el gen *lacZ*. Con flechas verdes se indican los distintos marcos de lectura abiertos, con flechas rojas, el gen *lacZ*. A la derecha de la figura se muestran los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa, expresada en Unidades Miller, de células merodiploides en cada uno de los distintos marcos de lectura abiertos.

#### 5.1.1.5. Caracterización de un mutante en el marco de lectura abierto contiguo al extremo 5' del gen *gshB* (ORF-2).

Se examinó la expresión del gen *gshB* en un mutante en el ORF-2 localizado hacia el extremo 5' del gen *gshB*. Con el objeto de obtener mutantes en el ORF-2 se procedió de la siguiente manera: se amplificó un fragmento interno del ORF-2 usando oligonucleótidos específicos y el mismo se clonó en el plásmido pK18mob, obteniéndose el plásmido pCM20. Este plásmido fue transferido mediante conjugación a la cepa CM11b (cepa *gshB-lacZ*). Esta cepa contiene una única copia de los ORF-1 y ORF2, ya que, previamente a la conjugación, se eliminó un fragmento BamHI del plásmido pCM11, que contenía ambos ORF, como se indica en materiales y métodos. La integración de este plásmido mediante un único evento de recombinación resulta en la interrupción del ORF-2. Los transconjugantes fueron confirmados mediante análisis de hibridación por Southern blot (Fig. 10), siendo la cepa resultante denominada cepa CM20. Seguidamente se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de células de la cepa CM20. Los resultados que se muestran en la figura 10 demuestran que la mutación del ORF-2 no altera el nivel de actividad generada a partir del gen *gshB*. Podemos concluir que el gen *gshB* no forma una unidad de transcripción junto al ORF-2.

Se estudió el crecimiento de células de la cepa CM20. Este es idéntico al de la cepa salvaje, como se evidencia en la figura 11, en cuanto al crecimiento en medio neutro, ácido y con el medio suplementado con metilglioxal, quedando demostrado que el fenotipo del mutante CIAT899-13T2 es independiente del ORF-2. El conjunto de datos antes expuestos demuestran que el fenotipo del mutante CIAT899-13T2 es independiente del ORF-2.

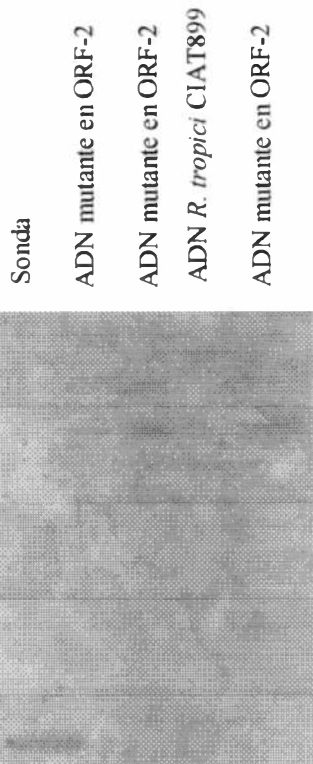


Figura 9. Análisis por Southern blot de células transconjugantes con el plásmido pCM20. Se revela la integración del plásmido mediante un único evento de recombinación. Calles, de derecha a izquierda: 1- control de sonda (fragmento de ADN amplificado con oligonucleótidos específicos); 2- ,3- y 5 ADN de transconjugantes digerido con EcoRI, se ven dos fragmentos, lo cual indica que ha ocurrido un único evento de recombinación; 4- control de ADN de cepa salvaje digerido con EcoRI.

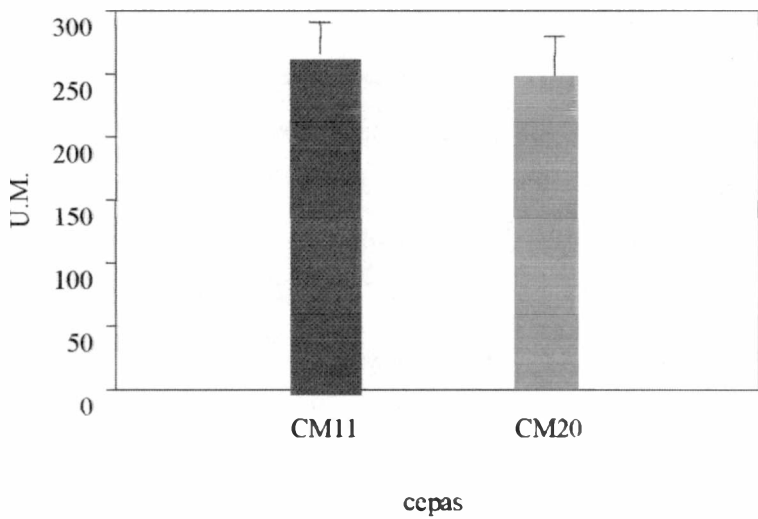


Figura 11. Actividad transcripcional de las cepas CM11 (*gshB-lacZ*, ORF-2) y CM20 (*gshB-lacZ*, ORF-2<sup>-</sup>). La figura muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa, expresada en unidades Miller (U.M.) de cepas con fusiones en el gen *gshB*, con y sin una mutación en e ORF-2, en condiciones de crecimiento exponencial en medio GTS.

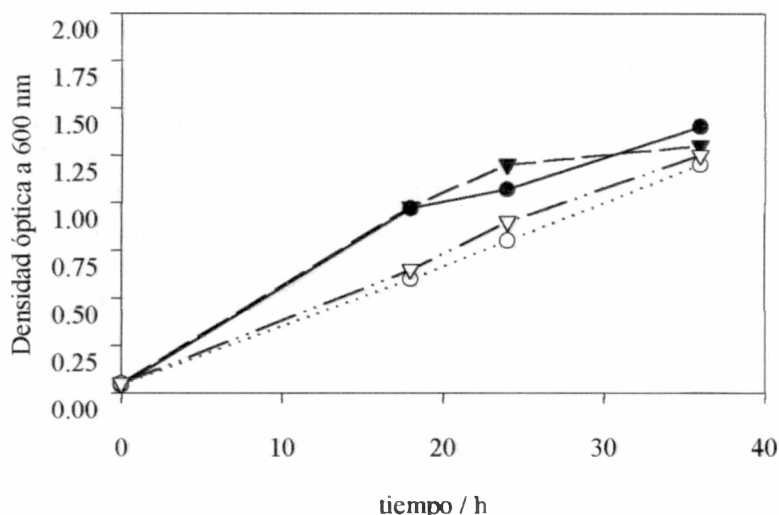


Figura 12. Ensayo de crecimiento de células de la cepa CM20 (*gshB-lacZ*; ORF-2<sup>-</sup>) en medio neutro y ácido. Se estudió el crecimiento de la cepa CM20 en medio GTS y GMS pH4,8 en comparación con la cepa salvaje. El crecimiento se indica como densidad óptica a 600 nm.

● CIAT899 GTS ○ CIAT899 GMS ▼ CM20 ▽ CM20 GMS

#### 5.1.1.6. Construcción de una fusión traduccional del gen *gshB*.

Con el objetivo de delimitar la región 5' del gen *gshB* con actividad promotora de la transcripción de *gshB*, se construyó una fusión traduccional entre la región 5' del gen *gshB* y el gen *lacZ*. Para esto se utilizó el plásmido pNM481 que contiene el gen *lacZ* cuya secuencia carece del ATG de inicio y los ocho codones siguientes. Se obtuvo un fragmento BglII-HindIII de ADN de *R. tropici* a partir del plásmido pCM1. Este fragmento, que incluye el extremo 5'- de la región de codificación del gen *gshB* y las 500 pb contiguas, se insertó en el sitio BamHI del plásmido pNM481. La inserción en este sitio permite la fusión en la cual el gen *gshB* se encuentra en fase traduccional con el *lacZ*. Esta construcción se digirió con las enzimas de restricción EcoRI y DraI, liberando la fusión *gshB-lacZ*. Luego de un tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa, esta fusión se insertó en el sitio EcoRI del plásmido pSUP104, dando origen al plásmido pCM9. Se corroboró, mediante análisis de la digestión con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, que el

sentido de la transcripción del gen *gshB* fuera opuesto al del gen de cloramfenicol del vector. Este plásmido fue transferido mediante conjugación a las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. Las cepas transconjugantes obtenidas fueron denominadas CIAT899(pCM9) y CIAT899-13T2(pCM9) respectivamente.

Se determinaron los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa de células de las cepas CIAT899(pCM9) y CIAT899-13T2(pCM9). En ambas cepas los niveles de actividad fueron mayores al nivel basal (alrededor de 80 Unidades Miller en fase logarítmica de crecimiento). Este resultado sugirió que las 500 adyacentes al sitio AUG contienen la secuencia promotora del gen *gshB*.

#### 5.1.1.7. Conclusiones.

-El fragmento de ADN de *R. tropici* de 3,5 kb, que incluye al gen *gshB*, clonado en el plásmido pCM3 es suficiente para restituir el fenotipo salvaje en la cepa mutante en el gen *gshB* CIAT899-13T2.

-La expresión de este gen es independiente del marco de lectura adyacente a su extremo 5'.

-En la región de 500 pb adyacente al extremo 5' del gen *gshB* se encontraría el promotor de este gen..

## 5.1.2. Estudio de la síntesis del glutatión.

### 5.1.2.1. Estudio de la actividad transcripcional del gen *gshB*.

Se estudió el patrón de expresión del gen *gshB* a lo largo del crecimiento. Para esto se determinaron los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa de células en cultivo de las cepas CM11 y CM15. Los niveles de actividad de células de la cepa CM11 son ligeramente inferiores a los de células de la CM15 (entre un 10 a un 30%). La transcripción del gen *gshB* es constante en fase exponencial y se mantiene en fase estacionaria (Fig 12).

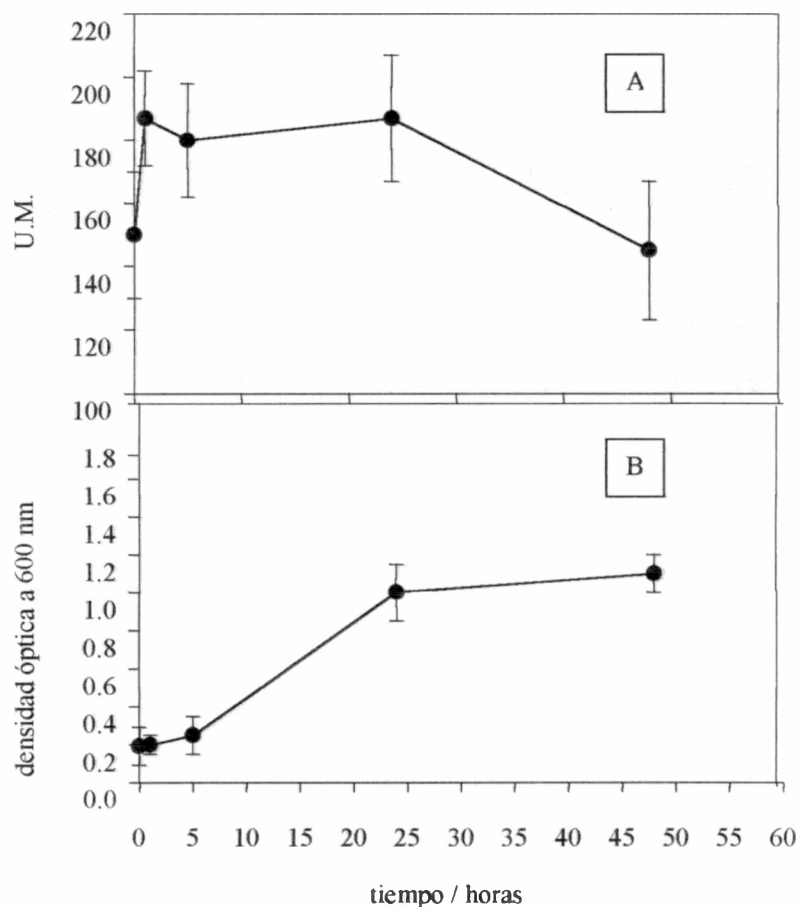


Figura 13. Expresión transcripcional del gen *gshB* en las distintas fases del crecimiento. A. actividad  $\beta$ -galactosidasa expresada en Unidades Miller (U.M.) de cultivos de la cepa CM11 (con fusión transcripcional *gshB-lacZ*). B. Desarrollo bacteriano expresado en unidades de absorbancia ( $DO_{600}$ ) de estos mismos cultivos. Los estudios se realizaron en medio GTS.

actividad  $\beta$ -galactosidasa. Se encontró que la actividad aumenta en un 20 % en forma transitoria al someter a las células a un estrés ácido, como se muestra en la figura 15A. Este aumento se produce entre los 20 y 30 minutos luego de la acidificación del cultivo, y decae a los 60 minutos a los niveles iniciales. Por otro lado el aumento en la actividad  $\beta$ -galactosidasa en la cepa CIAT899(pCM9) (con una fusión traduccional *gshB-lacZ*) fue de hasta 5 veces el valor basal, como se muestra en la figura 15B. Estos resultados indican que el gen *gshB* se encuentra regulado positivamente por la acidez del medio.

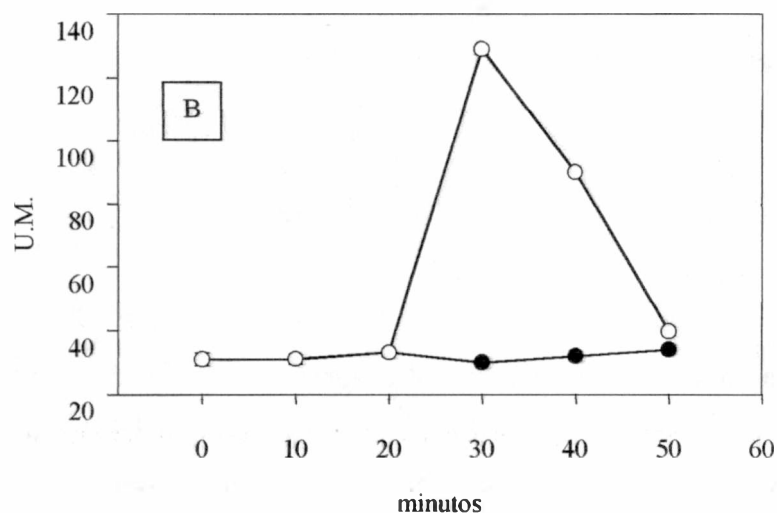
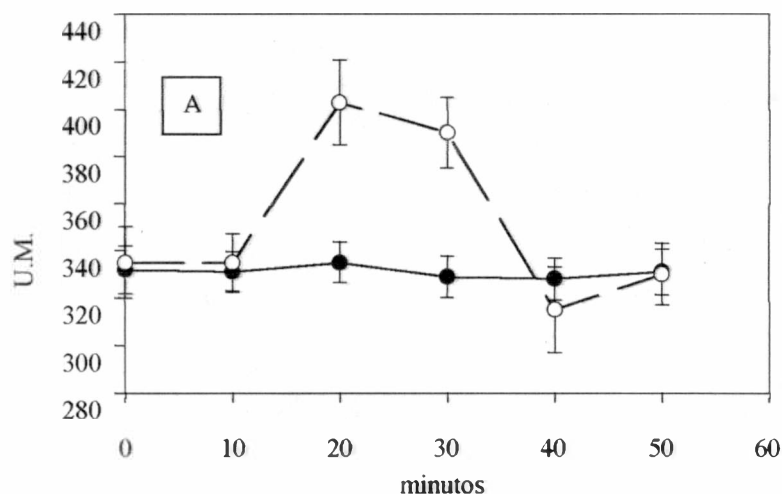


Figura 15. Estudio de la transcripción del gen *gshB* en condiciones de acidez. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicada en Unidades Miller (U.M.), de células crecidas en medio GTS y luego resuspendidas



Con el propósito de determinar el efecto del agregado del glutatión sobre la transcripción del gen *gshB*, se incubaron las cepas CM11 y CM15 en medio GTS suplementado con distintas concentraciones de glutatión entre 0,5 y 1,0 mM. Se determinaron los niveles de actividad  $\beta$ - galactosidasa de las células crecidas en estas condiciones. En ambas cepas se observó un aumento en la expresión del gen *gshB* de hasta un 30 % al aumentar la concentración de glutatión del medio , como se muestra en la figura 14.

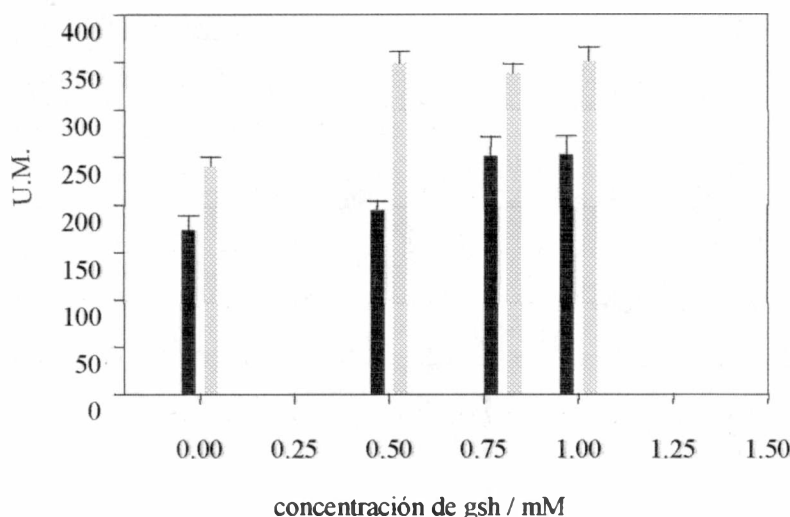


Figura 14. Efecto del agregado de glutatión sobre la transcripción del gen *gshB*. La figura muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa, expresada en Unidades Miller (U.M.) de células de las cepas CM11 (*gshB-lacZ*) y CM15 (*gshB::Tn5, gshB-lacZ*) en medio GTS suplementado con diferentes concentraciones de gsh.

■ CM11      ■ CM15

#### 5.1.2.2. Niveles de transcripción del gen *gshB* en condiciones de acidez.

Nos propusimos estudiar la actividad transcripcional del gen *gshB* en condiciones de acidez. Para esto se determinaron los niveles de actividad  $\beta$ - galactosidasa de células en cultivo de la cepa CM11 (con una fusión transcripcional *gshB-lacZ*) en condiciones de acidez. Se incubaron células en medio GTS hasta alcanzar una densidad óptica de 0,3 unidades a 600 nm. Luego se centrifugaron y se resuspendieron en medio GMS pH 5,3. Se tomaron muestras periódicamente durante 24 hs Sobre los cuales se midieron los niveles de

en medio GMS pH 5,3. A. células de la cepa CM11 (con una fusión transcripcional *gshB-lacZ*); B. células de la cepa CIAT899(pCM9) (con una fusión traduccional *gshB-lacZ*).

● GTS; ○ GMS

### 5.1.2.3. Actividad transcripcional del gen *gshB* al producir una acidificación intracelular.

El crecimiento del mutante CIAT899-13T2 es sensible a la acidificación intracelular con acetato de sodio 20 mM (Riccillo *et al*, 2000). El acetato de sodio por ser la base conjugada de un ácido débil atraviesa la membrana celular en su forma protonada, para luego disociarse, provocando la acidificación intracelular (Pérez-Galdona *et al*, 1994). Se propuso estudiar el efecto de la suplementación del medio GTS con acetato de sodio sobre la transcripción del gen *gshB*. La cepa CM11 (*gshB-lacZ*) se incubó en medio GTS hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,3 unidades. Luego se agregó acetato de sodio y se prosiguió la incubación. Se tomaron muestras a distintos tiempos, a las que se les determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Se ensayaron concentraciones de acetato de sodio entre 5 y 20 mM. Cuando la concentraciones de acetato de sodio son mayores a 7 mM se observa un aumento transitorio en los niveles de transcripción del gen *gshB*, llegando a aumentar en un 150 %, como se muestra en la figura 16. Cuando se aumenta la concentración de acetato de sodio por encima de 15 mM se observa que la actividad transcripcional disminuye, probablemente debido a que el crecimiento de la cepa se encuentra afectado a esta concentración (Fig.17).

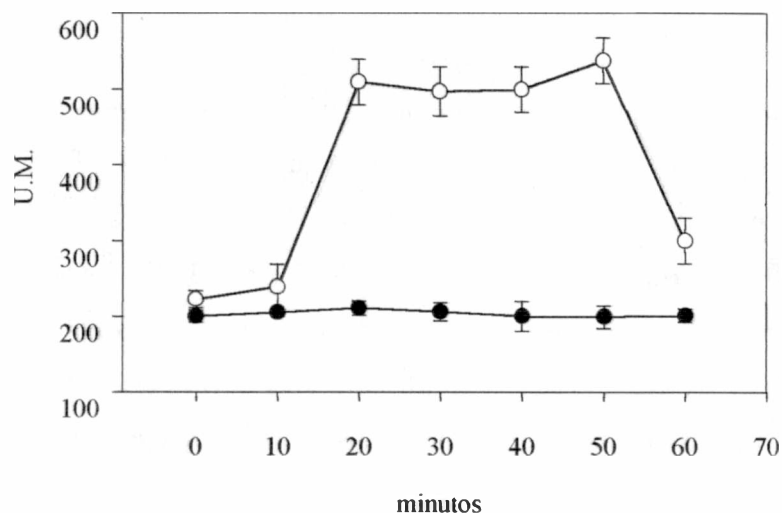


Figura 16. Estudio del efecto de la acidificación intracelular sobre la transcripción del gen *gshB*. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicada en Unidades Miller (U.M.), de células de la cepa CM11 (con una fusión transcripcional *gshB-lacZ*) crecidas en medio GTS y a tiempo cero suplementadas con acetato de sodio 7 mM.

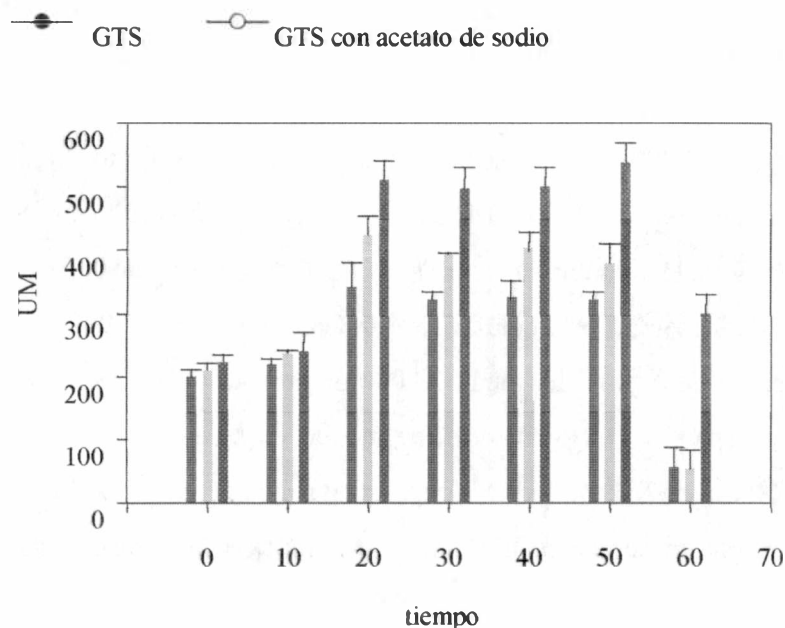


Figura 17. Efecto de distintas concentraciones de acetato de sodio (AcNa) sobre la transcripción del gen *gshB*. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicada en Unidades Miller (U.M.), de células de la cepa CM11 (con una fusión transcripcional *gshB-lacZ*) crecidas en medio GTS y a tiempo cero suplementadas con distintas concentraciones de acetato de sodio.



#### 5.1.2.4. Efecto de la acidez sobre los niveles intracelulares de glutatión.

En una segunda etapa se evaluó si el aumento en la transcripción del gen *gshB* acompaña un aumento en el contenido de glutatión intracelular. Con este objetivo se compararon los niveles de glutatión de la cepa CIAT899 en GTS y luego de ser transferida a medio ácido GMS. Se cultivaron células de la cepa CIAT899 en GTS hasta una densidad óptica de 0,5. Luego se centrifugaron y resuspendieron en GMS pH 5,3. Se tomaron muestras a distintos tiempos para la determinación de glutatión. Se observó que el contenido de glutatión se duplica al someter los cultivos a un shock ácido, como se observa en la figura 18. Cuando se estudió el mismo efecto en células en fase estacionaria, se observó que no registran este aumento luego de un shock ácido.

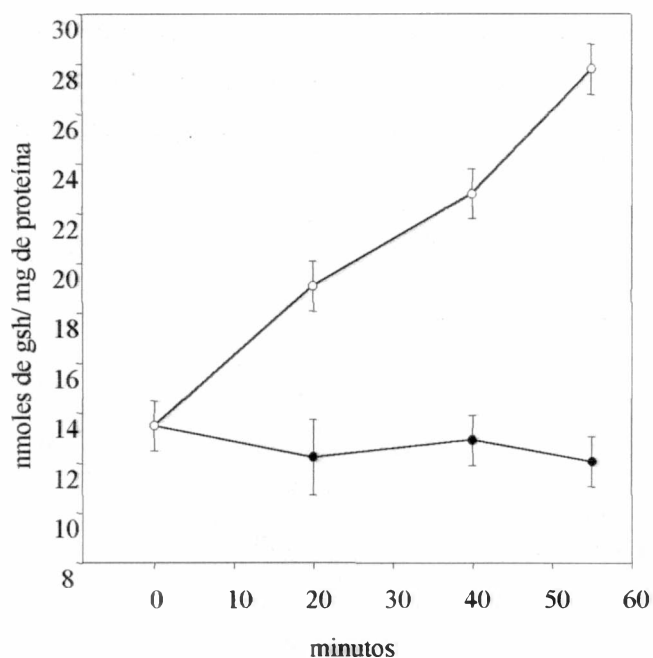


Figura 18. Niveles de glutatión luego de un shock ácido. La figura muestra los niveles de glutatión, expresados como nanomoles de glutatión por mg de proteína, de células de la cepa CIAT899 crecidas en medio GTS hasta una DO de 600 nm y resuspendidas en GMS a tiempo cero.

—●— GTS; —○— GMS

Las células de las cepas CIAT899(pCM6) y CIAT899-13T2(pCM6) presentan múltiples copias del gen *gshB* ya que este se encuentra en un plásmido multicopia. Se determinó el contenido de células de estas cepas. Se encontró que este es diez veces mayor al de la cepa CIAT899. Al resuspender células de cultivos de estas cepas crecidas en medio GTS, en medio ácido, no se observó un aumento en el nivel de glutatión (Fig. 19). Esto podría deberse a que la concentración de glutatión ya es suficiente para satisfacer las demandas generadas por la condición de acidez.

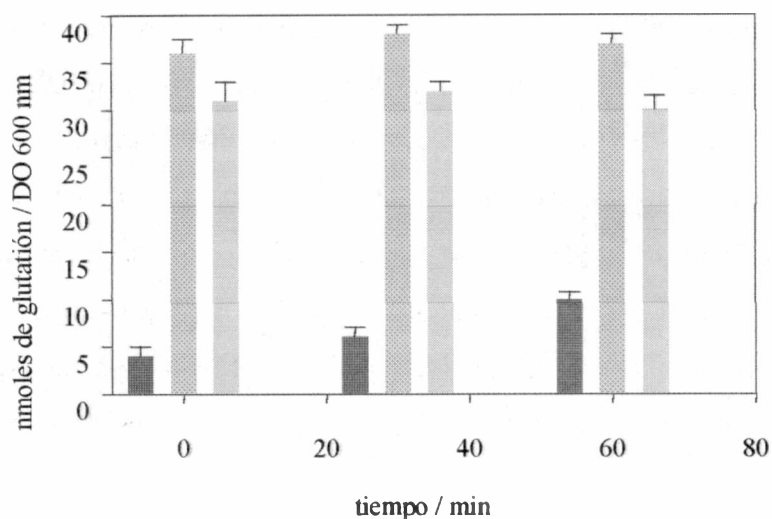


Figura 19. Estudio del efecto de la acidez sobre la transcripción del gen *gshB* en células con múltiples copias de este gen. Se determinaron los niveles de glutatión, expresado como nanomoles de glutatión por mg de proteína, de células de las cepas CIAT899(pCM6) y CIAT899-13T2(pCM6) crecidas en medio GTS y resuspendidas en medio GMS a tiempo cero.

■ CIAT899 ■ CIAT899(pCM6) ■ CIAT899-13T2(pCM6)

#### 5.1.2.5. Efecto del glutatión exógeno sobre la transcripción del gen *gshB* en condiciones de acidez.

Para investigar si la suplementación del medio de cultivo con *gsh* afecta la transcripción del gen *gshB*, se preincubó la cepa CM11. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de células de la cepa CM11 (con una fusión transcripcional *gshB-lacZ*) crecidas en medio GTS y a tiempo cero suplementadas con acetato de sodio 7 mM.

en medio GTS suplementado con glutatión en concentraciones entre 0,5 y 1 mM hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,3 unidades. Luego se centrifugó los cultivos y se los resuspendió en medio ácido. Se tomaron muestras a distintos tiempos a las cuales se les cuantificó el nivel de actividad  $\beta$ -galactosidasa. Cuando la concentración de *gsh* en el medio de cultivo fue mayor a 0,8 mM no se produjo un aumento en la transcripción del gen *gshB* al ser transferido a medio ácido, como se muestra en la figura 20.

Estos resultados, junto con los del inciso anterior, demuestran que existe una respuesta a la acidez que es dependiente del nivel de glutatión.

se hicieron experimentos a tiempos cortos. Se creció la cepa CM11 en GTS hasta una densidad optica de 0,3. Luego se agregó al medio NaCl en concentración final 0,05, 0,15 y 0,3 M y se continuó la incubación. Se tomó muestras cada diez minutos durante una hora y se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las mismas. Para concentraciones de ClNa 0.05 y 0.15 M no se encontró diferencias en la actividad transcripcional. Cuando la concecntración de ClNa fue 0.3 M se produjo una drástica disminución de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, probablemente porque a esa conecctración se afecta el crecimiento de la cepa salvaje (Fig. 22). Resultados similares se obtuvieron al estudiar la cepa CIAT899 (pCM9) (con una fusión traduccional *gshB-lacZ*).

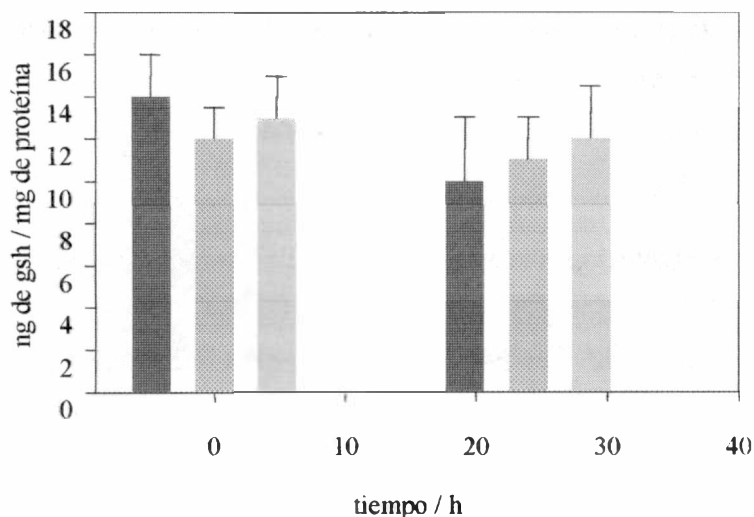


Figura 21. Estudio del efecto de la suplementación del medio de cultivo con cloruro de sodio sobre el contenido de glutatión celular. Se determinó el contenido de glutatión (en ng de gsh por mg de proteína) de cultivos crecidos en medio GTS suplementado con distintas concentraciones de NaCl.

■ control    ▨ NaCl 0,15    ▩ NaCl 0,3

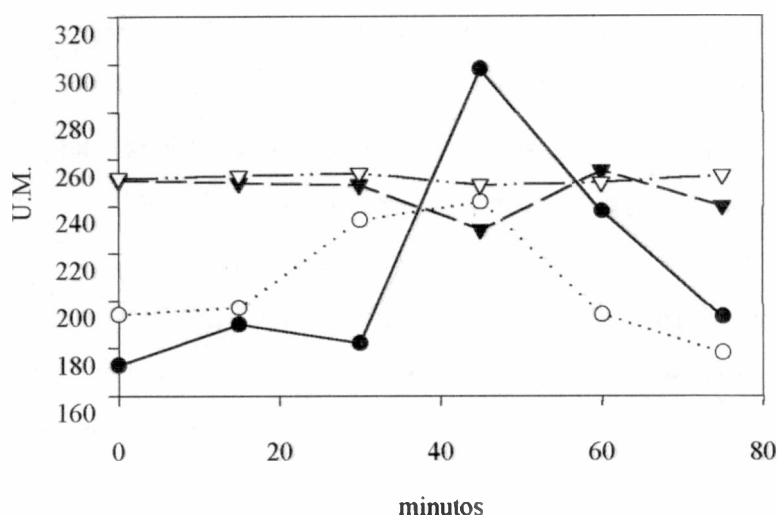


Figura 20. Efecto del glutatión exógeno sobre la transcripción del gen *gshB* en condiciones de shock ácido. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicada en Unidades Miller (U.M.) al centrifugar y resuspender en medio GMS cultivos de células de la cepa CM11 (*gshB-lacZ*) crecidos en medio GTS con distintas concentraciones de glutatión.

—●— sin glutatión, ○ con glutatión 0,5 mM —▼— 0,8 mM —▽— 1 mM

#### 5.1.2.7. Efecto de otros estreses sobre la transcripción del gen *gshB*.

Estudios realizados en *Sacharomyces cerevisiae* demuestran que células crecidas en presencia de altas concentraciones de NaCl presentan niveles de gsh elevados. Por otra parte, el crecimiento de células del mutante CIAT899-13T2 es sensible a altas concentraciones de NaCl. Por este motivo se estudiaron los niveles de glutatión y de actividad  $\beta$ -galactosidasa de células de la cepa CM11 (con una fusión transcripcional *gshB-lacZ*) al suplementar el medio de cultivo con cloruro de sodio. Para esto se crecieron cultivos de la cepa CIAT899 en GTS suplementado con ClNa 0,3 y 0,15 M. Se determinó el contenido de glutatión de muestras tomadas luego de 12 horas (fase logarítmica) y 36 horas (fase estacionaria). No se encontraron variaciones en los niveles de glutatión con respecto a la cepa CIAT899 crecida en GTS, como se muestra en la figura 21. Un procedimiento similar se utilizó para estudiar el efecto del ClNa sobre la expresión del gen *gshB*. Para esto se utilizó la cepa CM11, repitiendo el procedimiento antes descrito. Se tomaron muestras a lo largo del tiempo durante 24 horas. Se midió la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las muestras. No se encontraron diferencias en los niveles hallados. Luego

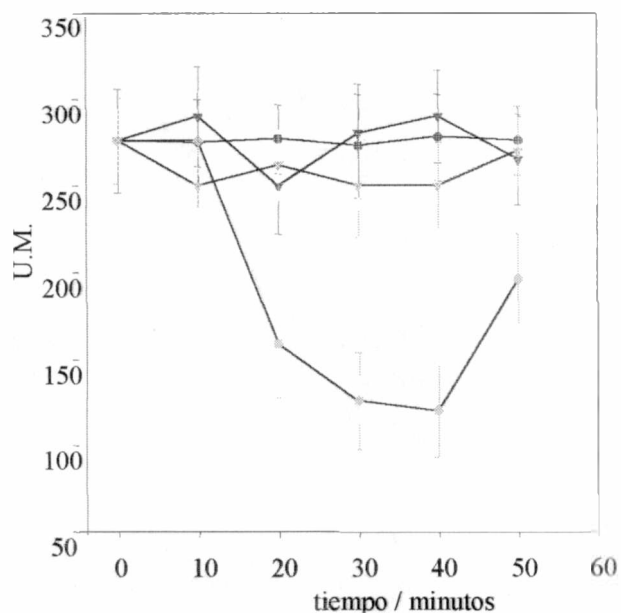


Figura 22. Estudio del efecto de la suplementación del medio de cultivo con cloruro de sodio sobre la transcripción del gen *gshB*. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, expresada en Unidades Miller (U.M.) de células de la cepa CM11 (*gshB-lacZ*) de cultivos crecidos en medio GTS suplementado con distintas concentraciones de NaCl.

—●— control en medio GTS    —○— medio GTS suplementado con NaCl 0,3 M  
 —△— medio GTS suplementado con NaCl 0,15 M    —□— medio GTS suplementado con NaCl 0,05

Las células de la cepa CIAT899-13T2 no son capaces de crecer en GTS suplementado con metilglioxal 2,5 mM. Con el objeto de estudiar si la resistencia de la cepa salvaje a estas concentraciones involucra un aumento en la transcripción del gen *gshB*, se estudió el efecto de la suplementación del medio GTS con metilglioxal sobre cultivos de la cepa CM11 (*gshB-lacZ*). Se cultivó esta cepa en GTS hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0,3 unidades. Luego se le adicionó metilglioxal en concentraciones finales 2,5 y 1,25 mM. Se tomó muestras durante 24 horas y se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las mismas. No se encontraron diferencias en los niveles de transcripción de los cultivos tratados con metilglioxal en comparación con los sin tratar en las condiciones estudiadas, como se muestra en la figura 23.



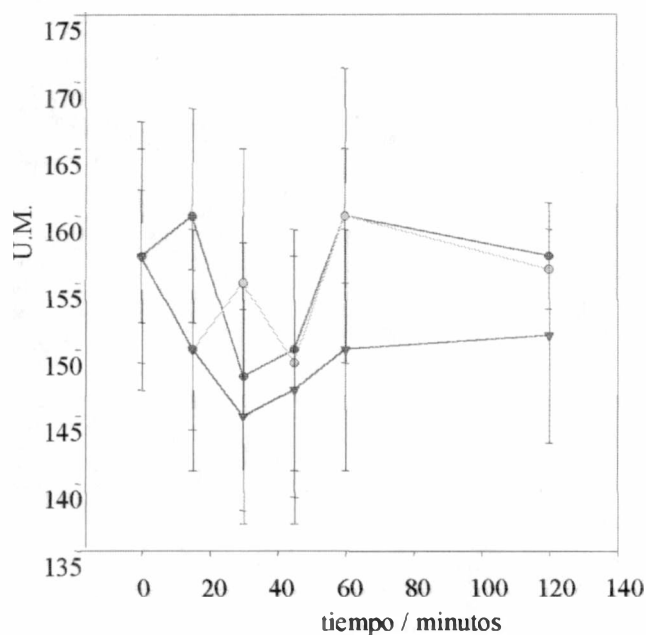


Figura 23. Efecto del metilglioxal sobre la transcripción del gen *gshB*. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasas, en Unidades Miller (U.M.) de cultivos de la cepa CM11 (*gshB-lacZ*) crecidos en medio GTS y suplementados con diferentes concentraciones de metilglioxal (MG) a tiempo cero.

—●— control    ○— MG 2,5 mM    —▲— MG 1,25 mM

Asimismo, las células de la cepa CIAT899-13T2 sufren una disminución importante de viabilidad por el agregado de peróxido de hidrógeno. Se estudió el efecto del tratamiento de  $H_2O_2$  sobre la transcripción del gen *gshB*. Se agregó  $H_2O_2$  a concentraciones 1 y 2 mM final a cultivos de la cepa CM11 (*gshB-lacZ*) crecidos en medio GTS hasta una densidad óptica de 0,3 unidades. Se extrajo muestras cada 10 minutos durante una hora y se evaluó la actividad  $\beta$ -galactosidasas de las mismas. El  $H_2O_2$  produjo una disminución en la transcripción del gen en las condiciones estudiadas, probablemente debido a que afecta directamente el crecimiento de estas bacterias a estas condiciones (Fig. 24).

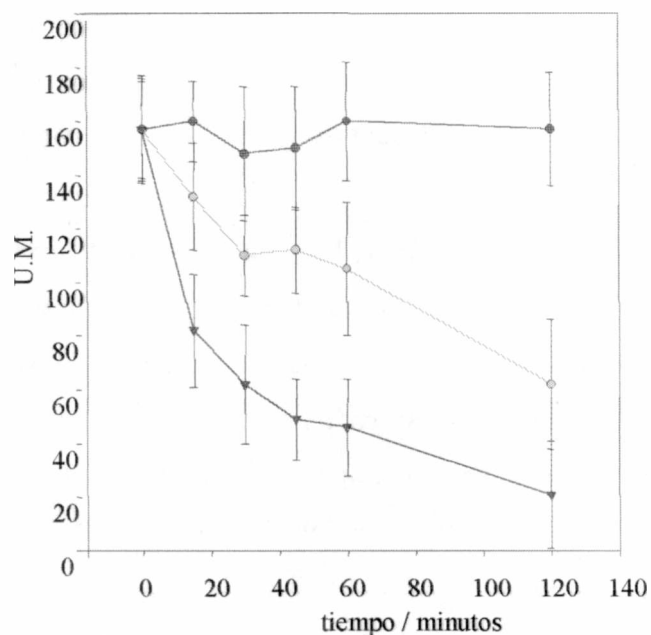


Figura 24. Efecto del peróxido de hidrógeno sobre la transcripción del gen *gshB*. Se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, en Unidades Miller (U.M.) de cultivos de la cepa CM11 (*gshB-lacZ*) crecidos en medio GTS y suplementados con diferentes concentraciones de  $H_2O_2$  a tiempo cero.

—●— control —○—  $H_2O_2$  1mM —▼—  $H_2O_2$  2mM

#### 5.1.2.8. Conclusiones

- La expresión del gen *gshB* en *Rhizobium tropici* se encuentra regulada por el nivel de glutatión.
- Rhizobium tropici* responde a la acidificación del medio aumentando la transcripción del *gshB*, lo cual es acompañado por aumentos en los niveles intracelulares de glutatión.
- La transcripción del gen *gshB* no se encuentra afectada por niveles de metilglioxal y cloruro de sodio que no afectan la viabilidad celular.
- La transcripción del gen *gshB* disminuye frente a un tratamiento con peróxido de hidrógeno, posiblemente debido a que se trata de concentraciones que afectan la viabilidad celular.

## **5.2. Estudio del rol del glutatión en la tolerancia a la acidez.**

### **5.2.1. Efecto del Ca sobre el crecimiento de la cepa CIAT899-13T2.**

Como se comentó en la Introducción, la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en el medio influye sobre los efectos de la acidez en los rizobios, aumentando la velocidad de crecimiento en medio ácido y haciendo las bacterias tolerantes a pH más ácidos. En *S. meliloti* los mutantes por inserción de Tn5 ácido sensibles han sido clasificados según el efecto de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  en: sensibles a  $\text{Ca}^{++}$ , si este revierte el efecto de la mutación, e insensibles a  $\text{Ca}^{++}$ , cuando éste no lo revierte (Foster, 2000). En condiciones de acidez, la velocidad de crecimiento de las cepas de *S. meliloti* aumenta al aumentar la concentración de Ca en el rango milimolar. Por este motivo se estudió el efecto de altas concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  sobre el crecimiento de la cepa CIAT899-13T2 en medio ácido. Para esto se crecieron réplicas de cultivos de esta cepa en medio GMS pH 4,85 con concentraciones crecientes de  $\text{Ca}^{++}$ , en un rango de 0,1 (concentración presente en el medio GMS) hasta 11 mM. El mutante no mejoró su crecimiento con respecto a la cepa salvaje en este rango de concentraciones .

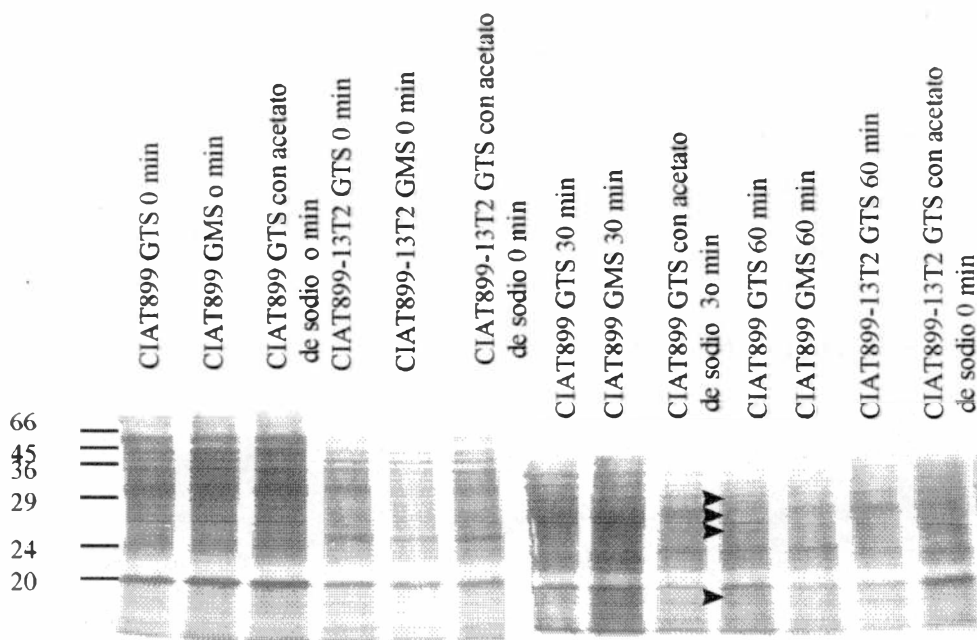
### **5.2.2. Estudio del patrón de expresión de proteínas de estrés ácido.**

#### **5.2.2.2. Análisis de las proteínas inducidas en el mutante gshB<sup>-</sup> por la acidez.**

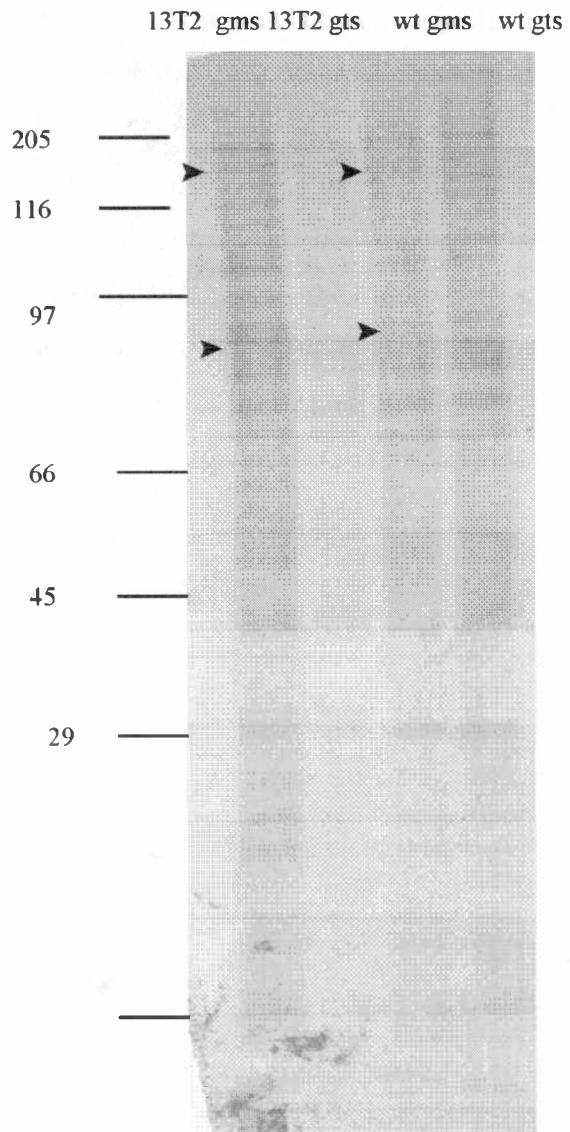
Se propuso investigar el patrón de expresión de proteínas en condiciones de pH neutro y luego de un shock ácido. Para esto se estudió el patrón de síntesis de proteínas de células de cultivos en fase exponencial de crecimiento incubados en medio mínimo GTS, GMS pH 5,5 y GTS suplementado con acetato de sodio 7 mM marcadas con un pulso de  $^{32}\text{S}$ -metionina. Se tomaron muestras cada 15 minutos durante 60 minutos de incubación. Las proteínas totales de estas muestras fueron analizadas mediante electroforesis en gel en gradiente de poliacrilamida (7% a 23%) SDS-PAGE y posteriormente revelado por autoradiografía. No se encontraron diferencias cualitativas ni cuantitativas en los patrones

de proteínas en GTS y en GTS suplementado con acetato de sodio. Por el contrario, en medio GMS se observó una disminución general en la síntesis de las proteínas con respecto a lo observado en medio GTS. Asimismo, se observó un aumento en la síntesis de proteínas de 145, 82, 52, 29, 25 y 22 kDa tal como fue descrita previamente por Aarons y col., (1991) y Peick y col. (1999). Basándonos en la hipótesis de que el mutante CIAT899-13T2 podría estar afectado en la síntesis de alguna proteína necesaria para sobrevivir en condiciones de acidez, se examinó el patrón de expresión general de las proteínas y la síntesis *de novo* de las mismas al ser sometidas a un shock ácido. En los patrones de proteínas generales no se observaron diferencias entre las cepas mutante y salvaje tanto en las muestras incubadas en GTS, GMS, como la en GTS suplementado con acetato de sodio en los tiempos ensayados, como se muestra en la figura 25.

A.



B.



C.

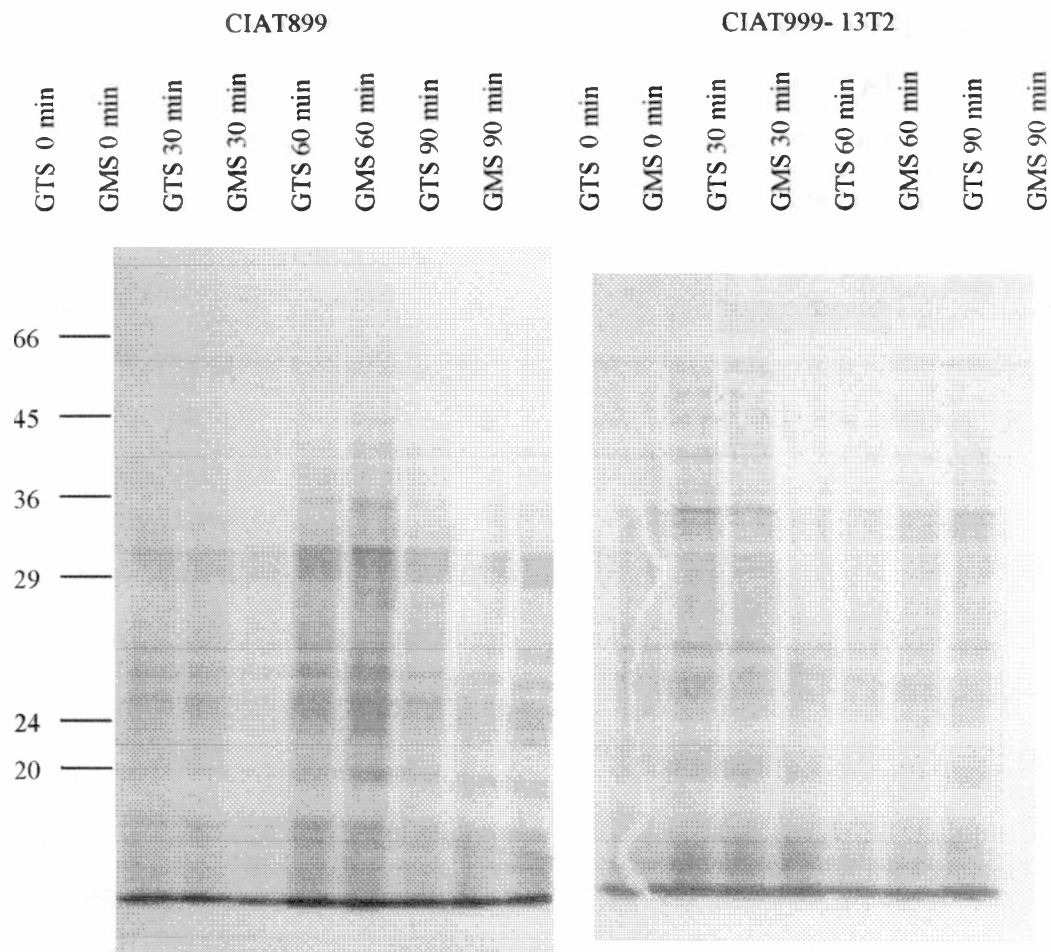


Figura 25. A. Patrón de expresión de proteínas de las cepas salvaje y mutante CIAT899-13T2 en GTS, en medio ácido GMS y en GTS suplementado con acetato de sodio. B Patrón de expresión de proteínas de las cepas salvaje y mutante 30 minutos después de ser resuspendidas en medio GMS y GTS, según indique la figura. A la izquierda se indican los pesos moleculares aproximados según el patrón incluido. Las flechas indican las diferencias en los perfiles encontradas. C. Patrón de expresión de proteínas en GTS y GMS de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2.

### 5.2.3. Relación entre el glutatión y los niveles de potasio intracelulares.

#### 5.2.3.1. Estudio del efecto de la acidificación de células de *R. tropici* CIAT899 sobre el nivel de $K^+$ intracelular (Ki).

Por estudios previos (Ricciolo *et al*, 2000) se conocía que luego de una hora de ser acidificado el medio de cultivo las células de *R. tropici* aumentan su nivel de  $K_i$ , mientras que las células del mutante mantienen el nivel basal. Esto sugirió que la carencia de glutatión del mutante CIAT899-13T2 podría afectar el funcionamiento de algún canal de eflujo de potasio de tipo Kef, los cuales son regulados negativamente por el glutatión, lo que estaría relacionado con su fenotipo de sensibilidad a la acidez, al metilglioxal y al CINa.

En este trabajo se estudió el efecto de la acidificación del medio de cultivo sobre el nivel de  $K_i$  a distintos tiempos, para determinar si el aumento en el nivel de glutatión observado se correspondía con el aumento en los niveles de potasio. Se creció cultivos de la cepa CIAT899 GTS hasta 0,5 unidades de densidad óptica, luego se los resuspendió en medio GMS y se continuó con la incubación. Se extrajo muestras a tiempo cero y cada diez minutos durante una hora, a las que se les determinó el contenido de potasio y glutatión. Se observó que el aumento en los niveles de potasio coincide temporalmente con el aumento en el nivel de glutatión observado, como se muestra en la figura 26.

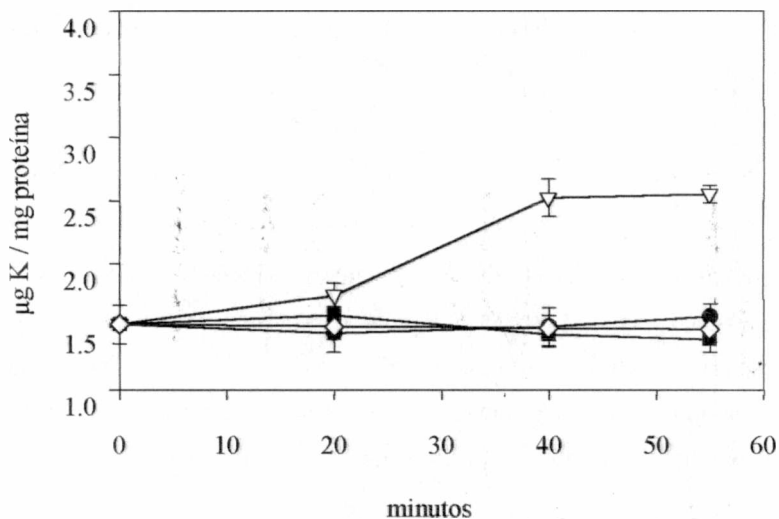


Figura 26. Estudio del efecto de la acidificación del medio de cultivo sobre los niveles de potasio interno de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. Cultivos de ambas cepas fueron crecidos en medio GTS y resuspendidos en medio GMS a tiempo cero. Se extrajeron muestras, a las que se les determinó el contenido de potasio. Cepas: CIAT899 —●— —△— y CIAT899-13T2 —■— —◇—. Los cultivo fueron centrifugados y resuspendidos en medio GTS (símbolos llenos) o GMS (símbolos huecos).

### 5.2.3.2. Obtención de mutantes en un gen *kef* derivado de *R. tropici* CIAT899.

Se exploró la presencia de secuencias de genes tipo *kef* en *R. tropici*. Se han descrito en distintos organismos diferente número de canales Kef. En *E. coli* se han clonado tres de ellos: KefA (relacionado con el mantenimiento de la presión osmótica celular) (McLaggan *et al*, 2002), el KefB y KefC, que son canales regulados por el glutatión y por aductos de éste con electrófilos. En el genoma de *S. meliloti* se han identificado por secuencia dos canales de este tipo, uno de los cuales presenta mayor homología con el resto de los genes *kef* secuenciados, y que nosotros usamos para el diseño de oligonucleótidos. Se diseñaron oligonucleótidos a partir regiones conservadas de las secuencias de genes *kef* presentes en el banco de secuencias (fig. 27) que amplificaran un fragmento de interno del gen de 600 pares de bases. Estos oligonucleótidos fueron usados para amplificar ADN total de *R. tropici* resultando un único fragmento del tamaño esperado, el cual fue clonado en el sitio EcoRI del vector suicida pSUP102, generándose el plásmido pCM23, que fue usado en la transferencia conjugativa en las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. De esta manera se obtuvieron los mutantes CM23 y CM24 respectivamente, que fueron confirmados por análisis de Southern blot usando como sonda el fragmento amplificado por PCR (fig. 27).

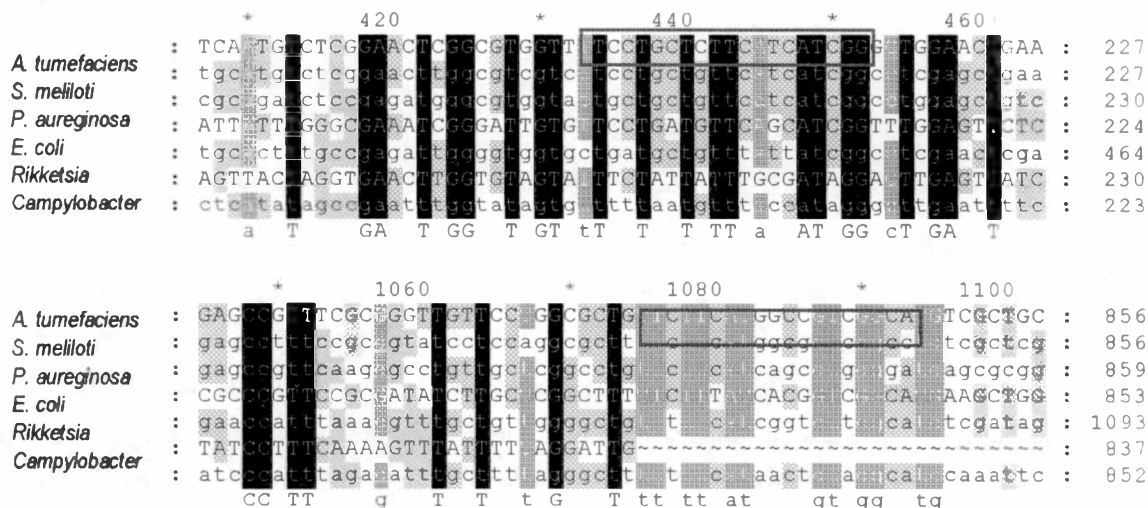


Figura 27. Diseño de oligonucleótidos usados para amplificar el gen *kef*. La figura muestra el apilamiento de las dos regiones de genes *kef* de distintos organismos encontradas en la base de datos y usados para identificar secuencias de consenso para el diseño de los oligonucleótidos (indicados mediante un rectángulo azul) Faltan citas.



DNA fago Lambda digerido con EcoRI-HindIII  
Fragmento kef amplificado de DNA cromosomal de *R. tropici*



*R. tropici* CIAT899  
*R. tropici* CIAT899-CM22  
*R. tropici* CIAT899-CM23  
*S. meliloti* 1021

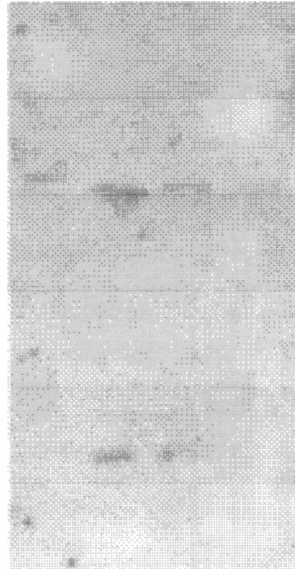


Figura 28. Obtención de un fragmento interno del gen *kef*. A la izquierda se muestra electroforesis en gel de agarosa de PCR realizada para amplificar un fragmento del gen *kef*. De izquierda a derecha: en la primera calle se muestra el patrón de peso molecular  $\lambda$ -EcoRI-HindIII (Promega), en la segunda: resultado de la amplificación de ADN de *R. tropici* con los oligonucleótidos diseñados, se evidencia la amplificación de un único fragmento. A la derecha se muestra análisis por Southern blot de células transconjugantes con el plásmido pCM23. Se revela la integración del plásmido mediante un único evento de recombinación. Calles, de derecha a izquierda: 1- control de ADN de cepa CIAT899 digerido con EcoRI; 2- y 3- ADN de transconjugantes digerido con EcoRI, se ven dos fragmentos, lo cual indica que ha ocurrido un único evento de recombinación; 4- control de ADN de cepa *S. meliloti* 1021 digerido con EcoRI.

### 5.2.3.3. Determinación de los niveles de Ki de los mutantes en el gen *kef*

Se determinó el nivel de potasio interno de células de las cepas CM23 y CM24 crecidas en medio GTS y GMS en fase logarítmica. Se encontró que el nivel de Ki de la cepa CM23 es superior en un 50% al de células de la cepa CIAT899 a pH neutro y ácido. El nivel de Ki de la cepa CM24 es similar al de la cepa CIAT899-13T2, como se muestra en la figura 29. Este resultado sugiere que una mutación en un gen *kef* no alcanza para aumentar el nivel de Ki de esta cepa, debido a la carencia de glutatión.

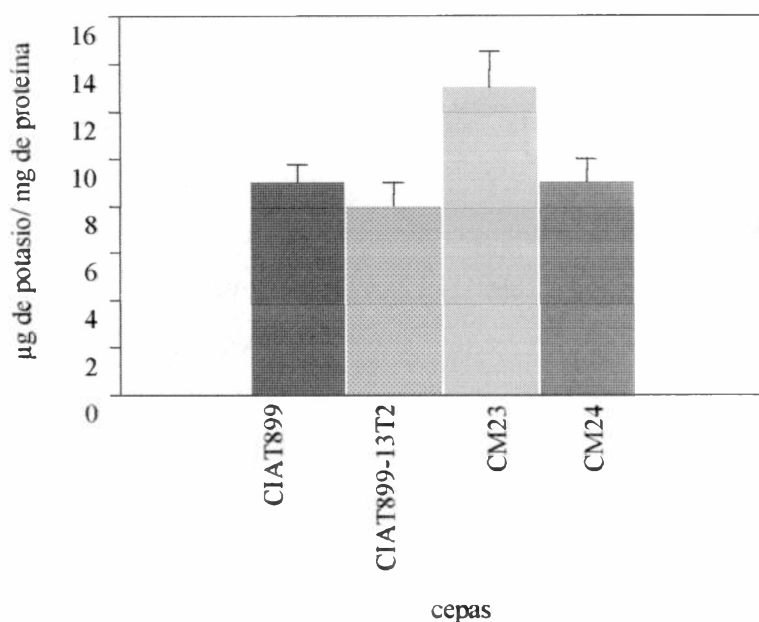


Figura 29. Niveles de Ki de células de cepas mutantes en un gen *kef*. Se determinó el contenido de potasio interno de células de las cepas salvaje, mutantes CIAT899-13T2, CM23 (*kef*) y CM24 (*gshB::Tn5, kef*) crecidas en medio GTS.

### 5.2.3.4. Efecto del metilglioxal y CDNB sobre los niveles de Ki de la cepa salvaje y mutantes.

La funcionalidad de canales KEF se determina midiendo o el contenido celular de potasio o el potasio liberado por células tratadas con distintos agentes electrófilos, como el NEM (N-etilmaleimida), metilglioxal o CDNB, que forman aductos con el glutatión y se unen específicamente a sitios de regulación de estas proteínas (cita). Con el objeto de estudiar funcionalmente el efecto de la mutación introducida en el gen *kef* de *R. tropici*, se determinaron los niveles de potasio de células de las cepas salvaje, CIAT899-13T2, CM23

(*kef*)y CM24 (*gshB::Tn5, kef*) en presencia de los agentes electrófilos metilglioxal y CDNB.

Se incubó estas cepas en medio GTS hasta una densidad óptica de 0,5 unidades, luego de lo cual se les adicionó metilglioxal en concentración 1,25 y 2,5 mM final, o CDNB 0,15 y 0,25 mM final. Se extrajo muestras a distintos tiempos durante una hora, y se les determinó contenido de potasio interno.

El metilglioxal provocó en la cepa CIAT899 una rápida disminución de los niveles de  $K_i$ , como se muestra en la figura 30. La cepas CIAT899-13T2 y CM24 no modifican su nivel de  $K_i$ , lo que concuerda con el requerimiento de glutación para la apertura de los canales de tipo KEF mediada por conjugados de éste con electrófilos. El metilglioxal no provocó un descenso del  $K_i$  en la cepa CM23, lo cual estaría de acuerdo con una mutación en el gen *kef*.

El CDNB provocó un descenso del contenido intracelular de K en las cepas CIAT899 y CM23 (Fig. 31). Las cepas CIAT899-13T2 y su derivado CM24, no disminuyeron su nivel de  $K_i$ , lo cual era esperable, ya que al carecer de *gsh* el CDNB no puede ser conjugado con este y activar el canal. Esto sugiere que el CDNB actuaría a través de un canal de tipo KEF alternativo, que no está mutado, de menor sensibilidad al efecto de compuestos conjugados con metilglioxal, más sensible a conjugados de glutación con CDNB.

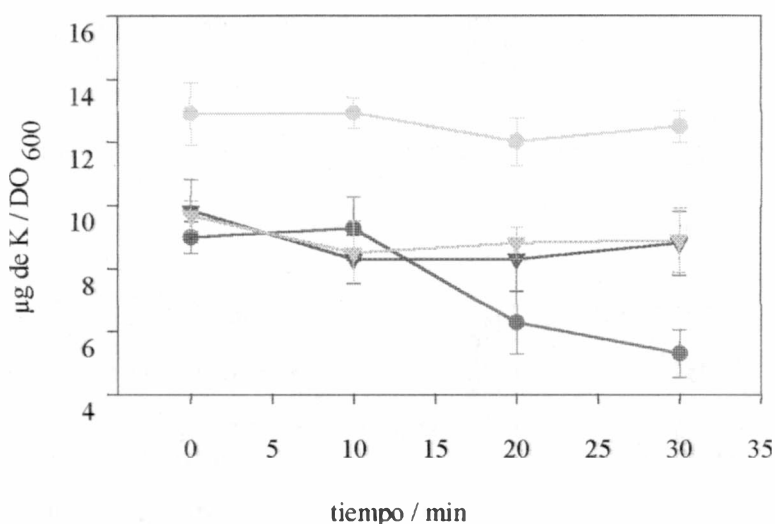


Figura 30. Efecto del metilglioxal sobre el contenido de potasio interno de las cepas CIAT899, CIAT899-13T2, CM23 (*kef*) y CM24 (*gshB::Tn5, kef*) luego del tratamiento con metilglioxal. Se cultivaron las distintas cepas hasta una densidad óptica de 600 nm, luego de lo cual se suplementó el medio con metilglioxal 0,25 mM. Se continuó con la incubación, extrayéndose muestras a distintos tiempos, a las que se les determinó niveles de potasio. El contenido de potasio se indica como  $\mu\text{g}$  de potasio por densidad óptica a 600 nm de los cultivos.

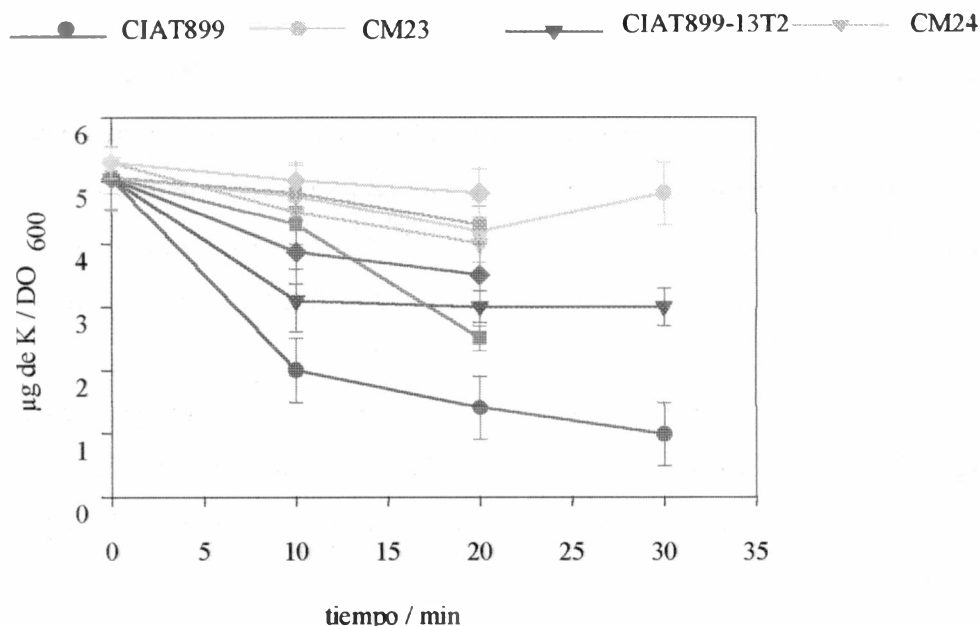
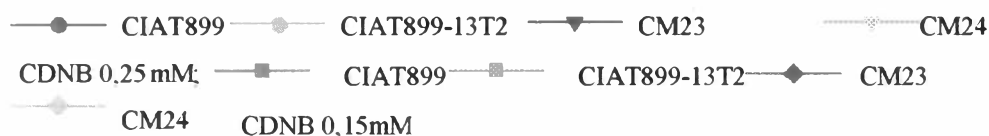


Figura 31. Estudio del efecto del CDNB sobre el contenido de potasio interno de las cepas CIAT899, CIAT899-13T2, CM23 (*kef*) y CM24 (*gshB::Tn5, kef*). Se cultivaron las distintas cepas hasta una densidad óptica de 600 nm, luego de lo cual se suplementó el medio con CDNB 0,25 ó 0,15 mM. Se continuó con la incubación, extrayéndose muestras a distintos tiempos, a las que se les determinó niveles de potasio. El contenido de potasio se indica como  $\mu\text{g}$  de potasio por densidad óptica a 600 nm de los cultivos.



#### 5.2.3.6. Efecto de una mutación en el gen *kef* sobre el crecimiento de las cepas CM23 y CM24 en condiciones de pH neutro y ácido.

La deficiencia en la biosíntesis de glutatión, provocada por la presencia de una mutación en el gen *gshA* determina en *E. coli* la apertura en forma constitutiva de canales de tipo KEF, con la consiguiente salida excesiva de K de la célula y entrada de contraiones,

predominantemente protones (Meury *et al*, 1982). Un efecto similar podría ser determinante de la sensibilidad a la acidez observada en el mutante CIAT899-13T2. Si se anula el canal *kef* a través de la mutación del gen podría mejorar el crecimiento del mutante en medio ácido. Con el objeto de corroborar esta hipótesis se estudió el crecimiento células de las cepas CM23 (*kef*) y CM24 (*gshB::Tn5, kef*) en medio GTS y GMS. Sin embargo, la presencia de una mutación en el gen *kef* no mejoró el crecimiento de estas cepas a pH neutro y ácido con respecto al de sus respectivas cepas parenterales, como se muestra en la figura 32, lo cual podría deberse a la presencia de algún otro canal de tipo Kef, como sugirió el experimento anterior, abierto debido a la carencia de glutatión del mutante.

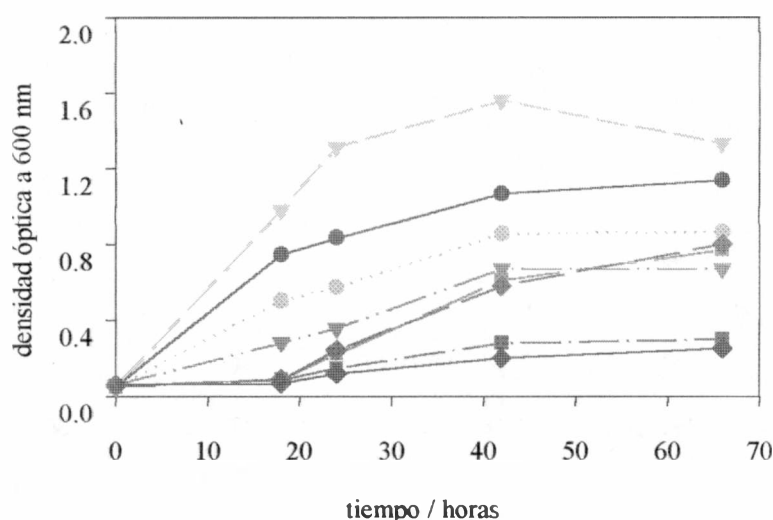


Figura 32. Efecto de la acidez sobre el crecimiento de mutantes *kef*. Se estudió el crecimiento, evaluando la densidad óptica de los cultivos a 600 nm, de las cepas CM23 (*kef*) y CM24 (*gshB::Tn5, kef*) en medio GTS y GMS pH 4,8. Como control se incluyeron las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2.

● CIAT899 GTS    ● CIAT899 GMS    ▼ CM23 GTS    ▼ CM23 GMS  
 ■ CIAT899-13T2 GTS    ■ CIAT899-13T2 GMS    ◆ CM24 GTS  
 ◆ CM24 GMS

#### 5.2.3.7. Efecto de la acidez sobre el contenido de potasio de los mutantes KEF.

Se estudió el efecto de la acidificación del medio sobre el nivel de Ki de células de las cepas CM23 (*kef*) y CM24 (*gshB::Tn5, kef*) en comparación con sus respectivas cepas parenterales. Para esto se cultivaron estas cepas en medio GTS hasta una densidad óptica de 0,5 unidades. Luego se centrifugaron y resuspendieron en medio GMS pH 5,3. Se

determinaron los niveles intracelulares de K a distintos tiempos. El resultado se muestra en la figura 33. En condiciones de acidez, la cepa CM23, a diferencia de la CIAT899 no aumenta su nivel de Ki. La cepa CM24 tiene un comportamiento similar a la cepa CIAT899-13T2.

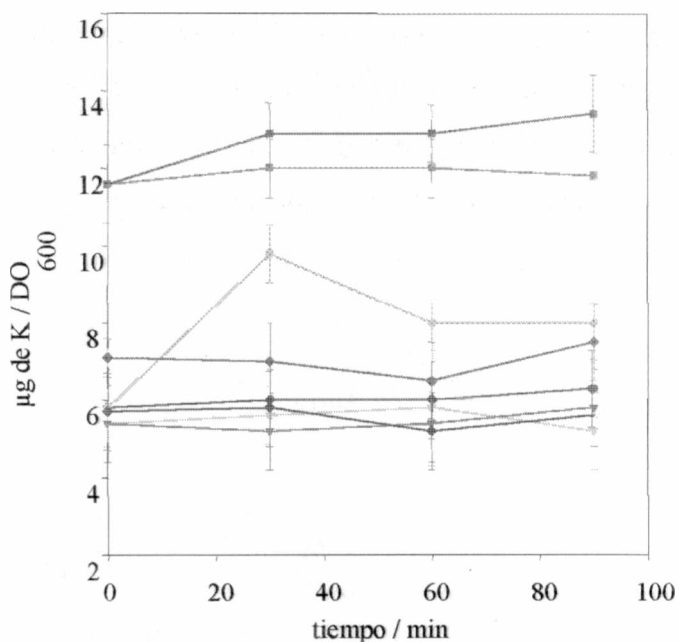


Figura 33. Efecto de la acidificación del medio de cultivo sobre los niveles de Ki de las cepas mutantes CM23 (*kef*) y CM24 (*gshB::Tn5, kef*). Se determinó el contenido de K interno de células de las cepas CM23 y CM24 crecidas en medio GTS luego de ser centrifugadas y resuspendidas en medio ácido GMS pH 5,3. Se incluyó a las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2 como controles.

- CIAT899 en GTS y GMS respectivamente
- CIAT899-13T2 en GTS y GMS respectivamente
- CM23 en GTS y GMS respectivamente
- ◆— CM24 en GTS y GMS respectivamente

#### 5.2.3.8. Conclusiones.

-El efecto de la mutación en el gen *gshB* no revierte aumentando la concentración de calcio del medio de cultivo.

-La mutación en el gen *gshB* no afecta la síntesis de proteínas de shock ácido en las condiciones estudiadas.

-*Rhizobium tropici* responde a la acidificación del medio aumentando la transcripción del *gshB*, lo cual es acompañado por aumentos en los niveles intracelulares de glutatión y potasio.

-Los estudios fisiológicos parecen indicar que en *R. tropici* existen al menos dos canales de tipo KEF que se diferencian entre sí por la sensibilidad a conjugados con metilglioxal y CDNB, respectivamente.

### 5.3. Estudio de los efectos de la mutación del gen *gshB* sobre *S. meliloti* 1021.

#### 5.3.1. Construcción de un mutante GshB<sup>-</sup> derivado de *Sinorhizobium meliloti* 1021

*Rhizobium tropici* CIAT899 es una cepa intrínsecamente resistente a estreses ambientales que tolera condiciones de acidez de hasta pH 4,5. Por el contrario la cepa *S. meliloti* 1021 es muy sensible a los diferentes estreses, no crece a pH menor a 5,5, por lo que nos propusimos estudiar el efecto de una mutación en el gen *gshB* sobre la tolerancia a los estreses ambientales. Con este fin se diseñaron oligonucleótidos específicos para el gen *gshB* (también llamado *gsh2*) a partir de la secuencia disponible en la base de datos del genoma de *S. meliloti*. Estos oligonucleótidos se utilizaron para amplificar un fragmento interno de la región codificante de este gen. Este fragmento fue clonado en el sitio EcoRI del vector pSUP102 y transferido a *S. meliloti* mediante conjugación. Los transconjugantes fueron seleccionados por resistencia al antibiótico tetraciclina y cuatro de los candidatos confirmados mediante Southern blot, como se muestra en la figura 34. La cepa resultante se denominó 1021-CM25.

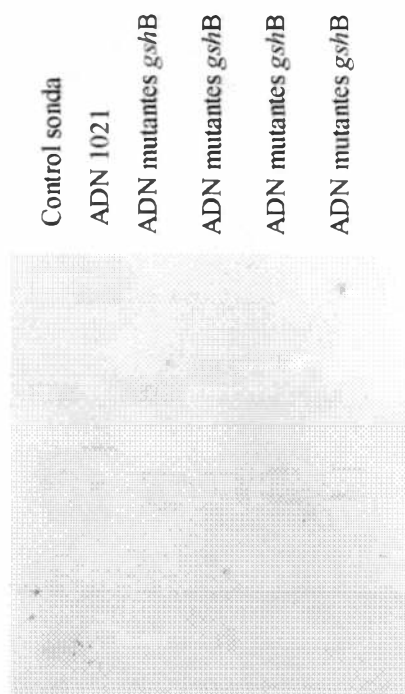




Figura 34. Análisis de Southern blot de posibles mutantes en el gen *gshB* de *S. meliloti* 1021. La figura muestra análisis por Southern blot de células transconjugantes con el plásmido pCM25. Se revela la integración del plásmido mediante un único evento de recombinación. Calles, de derecha a izquierda: 1- control de sonda, 2- control de ADN de cepa CIAT899 digerido con EcoRI; 2-, 3- y 4- ADN de transconjugantes digerido con EcoRI, se ven dos fragmentos, lo cual indica que ha ocurrido un único evento de recombinación; 4- control de ADN de cepa *S. meliloti* 1021 digerido con EcoRI.

### 5.3.2. Efecto de la mutación sobre el crecimiento de *S. meliloti*.

Con el propósito de determinar el efecto sobre el crecimiento de una mutación en el gen *gshB* en la cepa *S. meliloti* 1021, se estudió el crecimiento de la cepa 1021-CM25 (*gshB*-) en condiciones de acidez, en comparación con la cepa salvaje. Se cultivó a las cepas 1021 y 1021-CM25 en medio GMS a diferentes pH. Asimismo se estudió el crecimiento de ambas cepas en medio GTS. Los resultados se muestran en la figura 35. Los cultivos de la cepa 1021-CM25 presentan en medio neutro una fase lag aumentada con respecto a la cepa salvaje. En medio ácido el mutante se encuentra afectado, disminuyendo significativamente su crecimiento a pH menores a 6,7.

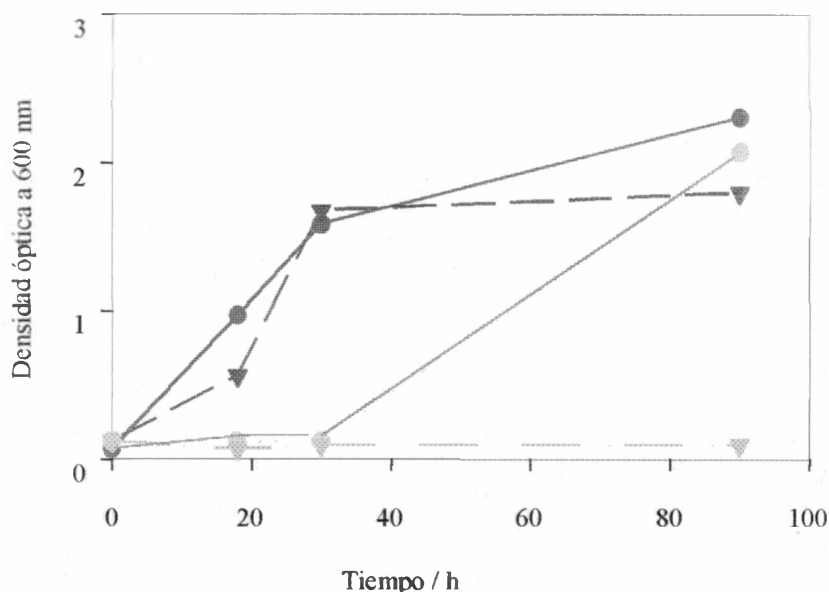


Figura 35. Estudio del crecimiento de las cepa 1021-CM25 (*gshB*-) en condiciones de acidez. Se evaluó el crecimiento de la cepa mutante 1021-CM25, como densidad óptica a 600 nm, en condiciones de pH neutro

(medio GTS) y de acidez (medio GMS pH 6,6).

● Control 1021 en GTS    ○ Control 1021 en GMS  
 ▼ 1021-CM23 en GTS    ▽ 1021-CM23 en GMS

Se estudió el efecto del metilglioxal sobre el crecimiento de la cepa 1021-CM25. Con este objetivo se cultivaron células de las cepas 1021 y 1021-CM25 en medio GTS y en GTS suplementado con metilglioxal 1,75, 1,25, 0,625, 0,25, 0,125 y 0,05 mM. La cepa 1021 resulta afectada, observándose una disminución en su velocidad de crecimiento a concentraciones de metilglioxal mayores a 1 mM. A las concentraciones más bajas estudiadas (0,625 mM y menores) la cepa 1021-CM25 resultó afectada en su crecimiento, pero no así la cepa salvaje, como se muestra en la figura 36.

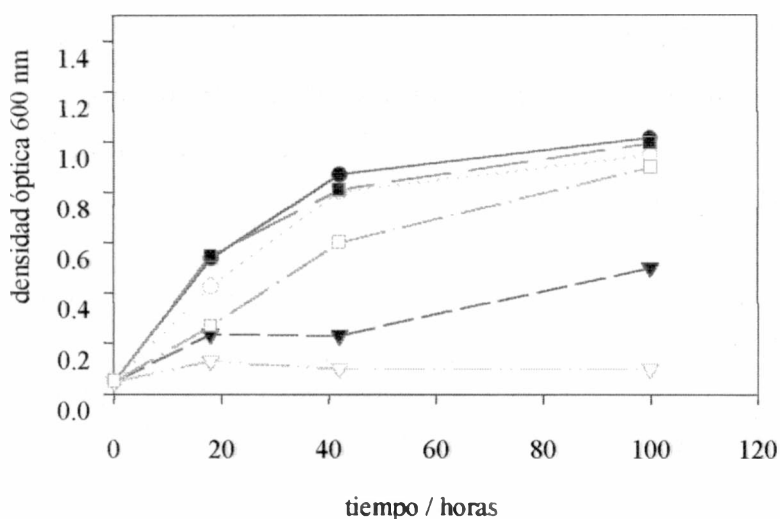


Figura. 36. Estudio del crecimiento de la cepa 1021-CM25 (*gshB*) con el agregado de metilglioxal. Se evaluó el crecimiento de la cepa mutante 1021-CM25, como densidad óptica a 600 nm, en medio GTS suplementado con diferentes concentraciones de metilglioxal.

● 1021    ○ 1021-CM25    ▼ 1021 con MG 1,25 mM    ▽ 1021-CM25 con MG 1,25 mM  
 ■ 1021 con MG 0,625 mM    □ 1021-CM25 con MG 1,25 mM

### 5.3.3. Estudio de la capacidad de nodulación del mutante *gsh2* de *R. meliloti* 1021.

Se evaluó la cepa mutante 1021-CM25 en su capacidad de nodulación en *Medicago sativa*. Se observó que forma nódulos de aspecto similar a los de la cepa salvaje, por lo que

se concluye que la presencia de esta mutación no afecta la producción de nódulos efectivos en este hospedante.

#### 5.3.4. Conclusiones.

-Mutantes GshB<sup>-</sup> de la cepa intrínsecamente sensible estreses *S. meliloti* 1021 son altamente sensibles a la acidez (pH 6,6) y al metilglioxal (0,625 mM), por lo que el gsh actuaría como protector frente a estas dos condiciones.

-La ausencia de glutatión no modifica la capacidad de formar nódulos de *S. meliloti* 1021.

#### 5.4. Protección del glutatión frente a estreses diversos: estrés oxidativo, osmótico y ayuno de nutrientes.

##### 5.4.1 Rol del glutatión en la protección frente al estrés oxidativo.

###### 5.4.1.1. Efecto del ditioneitol sobre el crecimiento del mutante GshB<sup>-</sup> de *R. tropici*.

El mutante CIAT899-13T2 es más sensible al peróxido de hidrógeno que la cepa salvaje (Ricillo *et al*, 2000). Se estudió el efecto de un agente reductor, ditioneitol (2,3-dihidroxi butano-1,4-ditiol, DTT), sobre el crecimiento de la cepa mutante. Para esto se cultivaron células de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2 en medio GTS suplementado con DTT en concentraciones 0,1, 0,2 y 0,4 mM. El crecimiento de los cultivos se evaluó mediante la determinación de su densidad óptica a 600 nm. Se encontró que la cepa mutante, a diferencia de la cepa salvaje, no es capaz de crecer cuando el medio de cultivo es suplementado con DTT 0,4 mM, como se muestra en la figura 37.

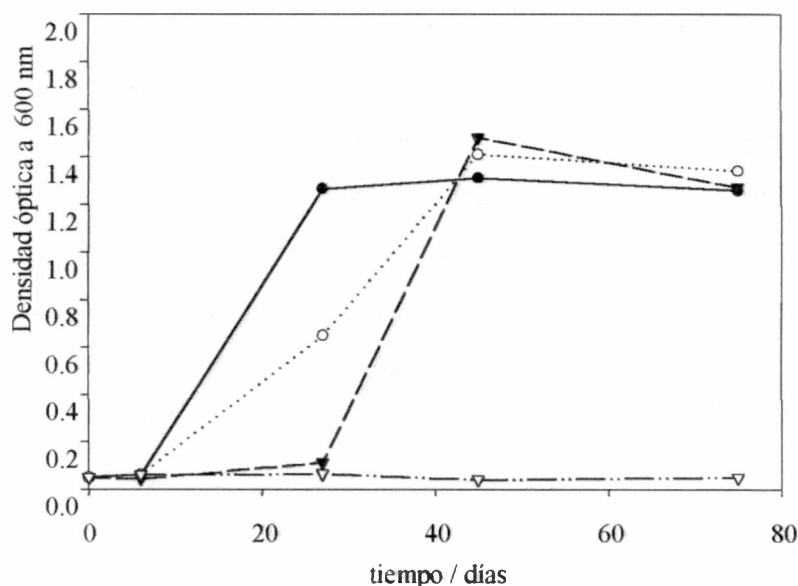


Figura 37. Estudio del efecto del DTT sobre el crecimiento de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. Se evaluó el crecimiento, determinando la densidad óptica a 600 nm, de cultivos de las cepas salvaje y mutante CIAT899 en medio de cultivo GTS suplementado con 0,4 mM de DTT metilgloxal.

—●— CIAT899 ···○··· CIAT899-13T2 —▼— CIAT899 en medio GTS suplementado con DTT 0,4 mM  
—▽··· CIAT899-13T2 en medio GTS suplementado con DTT 0,4 mM

#### 5.4.1.2. Estudio de inducción de la catalasa en células del mutante CIAT899-13T2 por peróxido de hidrógeno.

En *S. meliloti*, la detoxificación de peróxidos ocurre fundamentalmente a través de dos catalasas monofuncionales (KatA y KatC) y una de actividad bifuncional, la catalasa-peroxidasa (KatB) (Herouart *et al*, 1996). El tratamiento con peróxido de hidrógeno aumenta la actividad de KatA, mientras que la inducción de KatC se observa luego de un estrés térmico, salino o por tratamiento con etanol. *E. coli* activa frente al estrés oxidativo el regulón *oxyR* (inducible por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), aumentando la expresión de numerosos genes, entre ellos *katG*, que codifica para la catalasa-peroxidasa HPI. Como se describió en la Introducción, la desactivación de OxyR ocurre mediante la reducción catalizada por la tioredoxina 1 a expensas del glutatión. Se han encontrado secuencias homólogas a *oxyR* en los genomas completos de *S. meliloti* y *M. loti*, localizados respectivamente río arriba de *katA* y *katB*, en forma divergente de éstos (Jamet *et al*, 2003).

La sensibilidad del mutante CIAT899-13T2 frente a los agente oxidantes sugirió un defecto en la vía de protección frente a peróxido de hidrógeno dependiente de OxyR. Por este motivo se determinó la actividad catalasa de cultivos de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2 crecidas en medio GTS, en fase logarítmica. El estudio se realizó en condiciones basales y luego de realizar un tratamiento de dos horas en el mismo medio suplementado con peróxido de hidrógeno 1mM. Los niveles de catalasa basales son ligeramente inferiores para el mutante en comparación con la cepa salvaje. Asimismo se determinó que la cepa salvaje induce un aumento de actividad catalasa de unas 8 veces, mientras que el mutante sólo la duplica, como se muestra en la figura 38.

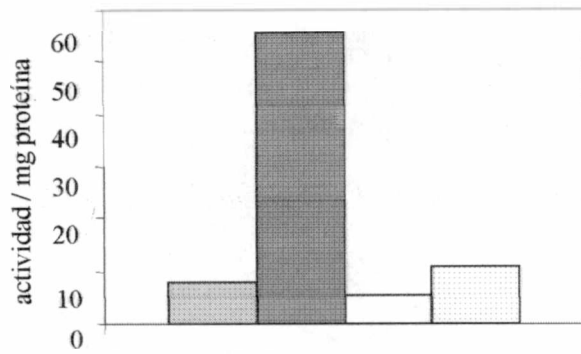


Figura 38. Estudio del efecto de la inducción con agua oxigenada sobre la actividad catalasa de cultivos de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. Se determinó la actividad catalasa de células de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2 luego del tratamiento con 1 mM de peróxido de hidrógeno durante 90 minutos.

■ CIAT899 ■ CIAT899 inducida □ CIAT899-13T2 □ CIAT899-13T2 inducida

#### 5.4.1.3. Efecto del glutatión sobre la tolerancia al ayuno de nutrientes en *R. tropici*.

Se estudió el efecto de reducir la concentración de hidratos de carbono sobre la cepa mutante CIAT899-13T2. Para esto se crecieron estas cepas en medio GTS modificado, en el cual la concentración de glucosa y succinato de sodio se redujeron en un 50 % con respecto a los del medio GTS. El crecimiento de la cepa salvaje se ve afectado al reducir la fuente de C, observándose una disminución de la velocidad de crecimiento y la densidad óptica máxima que alcanzan los cultivos es menor al de cultivos controles. El comportamiento de la cepa mutante CIAT899-13T2 es similar al de la cepa CIAT899, como se muestra en la figura 39.

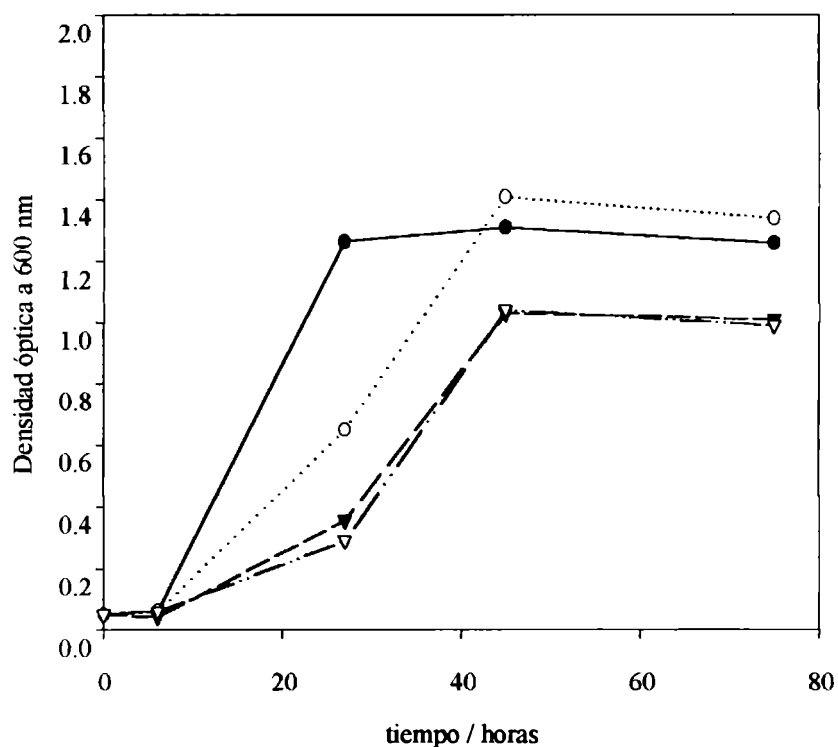


Figura 39. Efecto de la limitación de la fuente de C sobre el crecimiento de la cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. Se estudió el crecimiento de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2 en medio GTS modificado, con un 50% del contenido de fuente de C que normalmente contiene este medio. Los símbolos llenos corresponden a la cepa salvaje, los vacíos representan al mutante. Los círculos representan crecimiento en medio GTS (control), los triángulos crecimiento con un déficit de C.

De igual forma se estudió el efecto de una disminución de la fuente de nitrógeno sobre la cepa CIAT899 y CIAT899-13T2. Para esto se crecieron en medio GTS modificado, en el cual la concentración de cloruro de amonio se redujo a un 5 % con respecto a la del medio GTS. El crecimiento de la cepa salvaje se ve afectado al reducir la fuente de C. Se produce una disminución de la velocidad de crecimiento y la densidad óptica máxima que alcanzan los cultivos es menor a la de cultivos controles. El crecimiento de la cepa mutante CIAT899-13T2 se ve afectado de la misma manera. (Fig. 40).

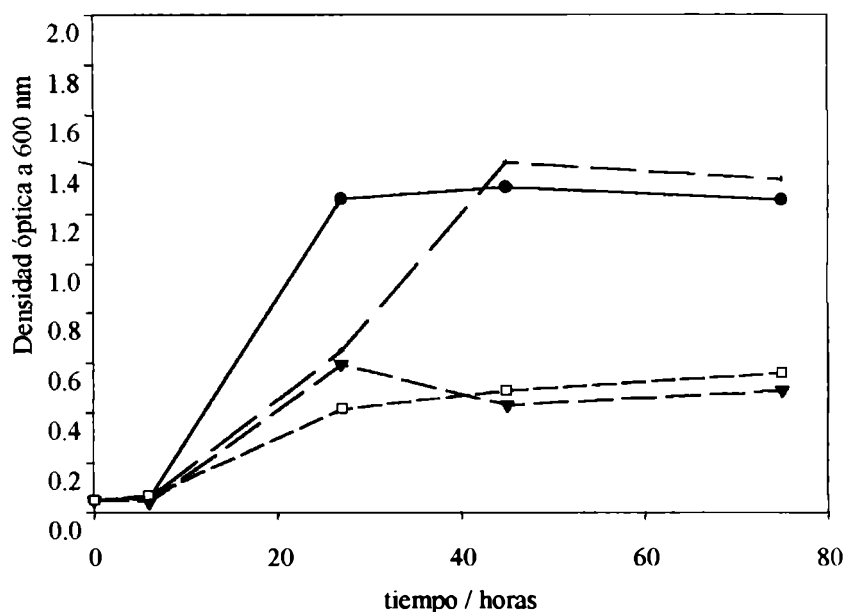


Figura 40. Efecto de la limitación de la fuente de N sobre el crecimiento de la cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. Se estudió el crecimiento de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2 en medio GTS modificado, con un 5% del de cloruro de amonio que normalmente contiene este medio. Los símbolos llenos corresponden a la cepa salvaje, los vacíos representan al mutante. Los círculos representan crecimiento en medio GTS (control), los triángulos crecimiento con un déficit de N.

● CIAT899 control en GTS    —●— CIAT899-13T2 control en GTS    —▲— CIAT899 en GTS con baja concentración de N  
 —□— CIAT899-13T2 en GTS con baja concentración de N

#### 5.4.1.4. Conclusiones

-El glutatión es en *R. tropici* importante para el mantenimiento del equilibrio redox celular, protegiendo del efecto de agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno) y reductores (DTT).

-El glutatión es importante para la inducción de la catalasa en respuesta al estrés oxidativo en esta bacteria.

-El glutatión no se haya implicado en la protección frente al ayuno de nutrientes carbonados ni nitrogenados.



## **5.5. Importancia del glutatión en la fijación simbiótica de nitrógeno.**

### 5.5.1. Estudios de la influencia de la mutación en el gen *gshB* sobre la nodulación en *Phaseolus vulgaris*.

Con el objeto de evaluar la importancia del glutatión en la prevención del daño oxidativo y otros efectos relacionados con la senescencia se estudiaron las características de la nodulación de la cepa CIAT899-13T2. Por estudios anteriores se conocía que plantas de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con este mutante presentaban nódulos efectivos 20 días después de la inoculación (Riccillo *et al*, 2000). Sin embargo, las raíces inoculadas con el mutante presentan mayor número de nódulos, que son más pequeños que los presentes en las plantas inoculadas en la cepa salvaje, y que se encuentran distribuidos por toda la raíz. En las plantas inoculadas con la cepa salvaje los nódulos se localizan en la raíz principal cercanas al tallo. Los nódulos presentes en plantas inoculadas con la cepa mutante no presentan el aspecto típico de los nódulos de la cepa CIAT899: rosados y con segmentos similares a costillas (Fig. 41). 30 días luego de la inoculación los nódulos de plantas inoculadas con el mutante presentan signos de envejecimiento: presencia de un alto porcentaje (50%) de nódulos verdes o marrones y blandos, con aspecto de tejido muerto. Esto se ve en plantas inoculadas con la cepa salvaje más tardíamente, luego de 50 días de inoculación.

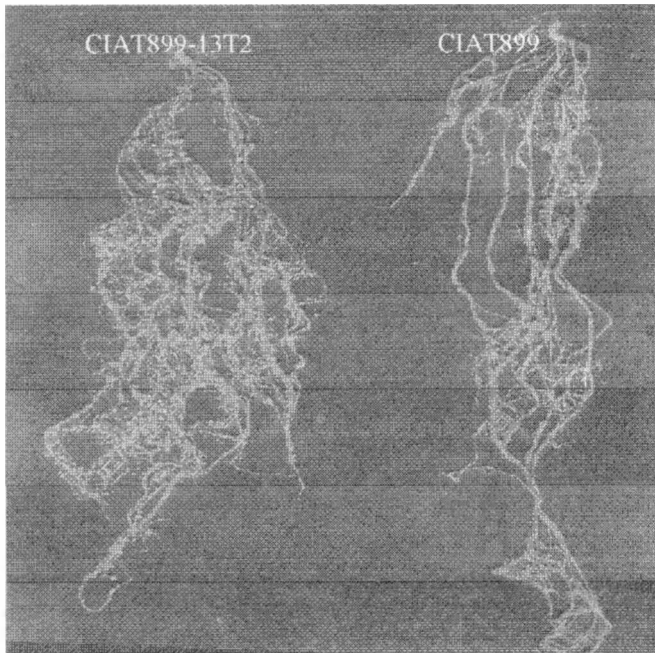


Figura 41. Raíces de *Phaseolus vulgaris* inoculadas con las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2. Se evidencia la mayor superficie que presentan las raíces inoculadas con la cepa mutante, la ubicación todo a lo largo de la raíz y el menor tamaño de los nódulos.

#### 5.5.2. Medida de marcadores moleculares senescencia de nódulos inducidos por la cepa CIAT899-13T2.

Con el objeto de hacer una medida cuantitativa de la senescencia temprana observada de nódulos inducidos por la cepa CIAT899-13T2 se evaluaron distintas enzimas que se utilizan como marcadores moleculares de este proceso. Se determinaron los niveles de catalasa, ascorbato peroxidasa y de proteasas. Se ha demostrado que los niveles de catalasa correlacionan positivamente con la actividad nitrogenasa (Becana *et al*, 1986). Los niveles de catalasa en nódulos de la cepa mutante disminuyeron antes de los de la cepa salvaje, lo cual es evidente en la determinación de los 30 días. Se determinaron los niveles de ascorbato peroxidasa, enzima involucrada en el ciclo del ascorbato-glutación (u homoglutación, ver Introducción). Se ha reportado que los niveles de esta enzima decaen durante la senescencia normal e inducida. La actividad de ascorbato peroxidasa disminuyó antes en la cepa salvaje que en la cepa mutante, como se muestra en la figura 42. La actividad proteasa aumenta con la edad de los nódulos. Se determinó que este aumento ocurre antes en la cepa mutante que en la salvaje (Fig. 43).

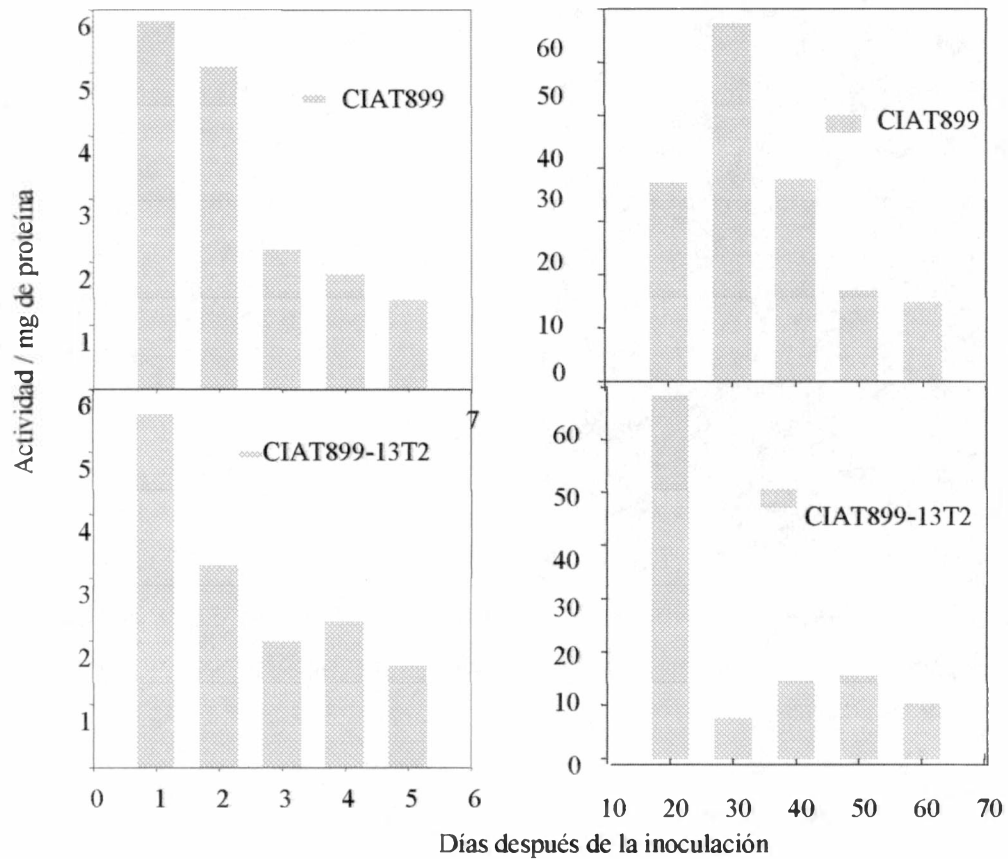


Figura 42. Actividad enzimática en nódulos inoculados con células de CIAT899 y CIAT899-13T2. A la izquierda se muestran los niveles de actividad catalasa determinada luego de la inoculación con estas cepas. A la derecha, se muestran los niveles de actividad ascorbato peroxidasa luego de la inoculación..

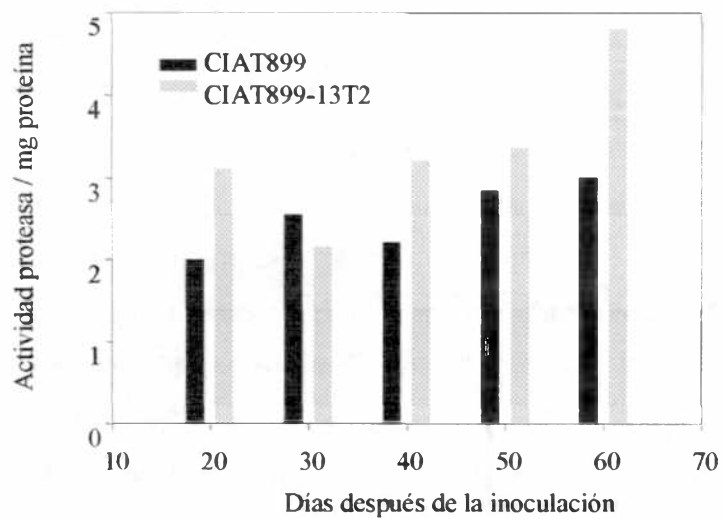


Figura 43. Actividad proteasa en nódulos inoculados con células de CIAT899 y CIAT899-13T2. En el gráfico se muestran los valores de actividad proteasa determinada a diferentes tiempos, después de la inoculación con estas cepas.

### 5.5.3. Conclusiones

-El glutatión es importante para el mantenimiento en el tiempo de una simbiosis efectiva entre *R. tropici* y poroto común.

## 6. DISCUSIÓN

Los rizobios deben enfrentar situaciones ambientales extremas tales como altas temperaturas, acidez, estrés oxidativo, estrés salino y limitación de nutrientes. Estos factores adversos afectan la supervivencia de las bacterias y la efectividad de la simbiosis con las leguminosas. La acidez de los suelos es un factor adverso de amplia distribución a nivel mundial, que afecta los diferentes estadios de la simbiosis rizobio-leguminosa. Los distintos rizobios presentan diferentes rangos de tolerancia a la acidez. *R. tropici*, bacteria intrínsecamente tolerante a diferentes estreses, es capaz de crecer hasta pH 4. Sin embargo, poco se conoce acerca de los mecanismos puestos en juego en esta tolerancia.

Se han asignado diferentes funciones al glutatión. En las células generaría un buffer de puentes disulfuro, promoviendo la formación de tioles en las proteínas. Actúa en catálisis, metabolismo y transporte y forma aductos con compuesto tóxicos, favoreciendo su detoxificación. Asimismo se lo asocia en la protección frente al estrés oxidativo. Riccillo *et al*, (2000), demostró que el glutatión, en *R. tropici*, es importante para la protección frente a la acidez, estrés oxidativo, osmótico y frente a electrófilos como el metilglioxal.

En el presente trabajo de tesis se estudió la regulación del gen *gshB*. Éste se transcribe en forma constante en fase exponencial, y disminuyendo en fase logarítmica. Sin embargo, este resultado concuerda con los niveles de glutatión que hemos determinado y con los encontrados en *S. meliloti* 1021 (Frendo, comunicación personal). La transcripción del gen probablemente se encuentra regulada positivamente por acumulación del sustrato, como surge de los estudios comparativos de la cepas CM11 y CM15, y del efecto del agregado de gsh sobre la transcripción. Asimismo demostramos que el gen *gshB* es regulado positivamente por la acidez. Frente a una acidificación, ya sea del medio o interna, *R. tropici* responde en forma rápida con un aumento transitorio de la expresión del gen *gshB*. Un comportamiento similar se observa en el nivel de glutatión celular. En condiciones de alta concentración de gsh, ya sea de origen endógeno o exógeno, este aumento en la transcripción no se observa luego de una acidificación. Esto sugiere que existe una concentración mínima de este agente requerida por la células para la tolerancia a la acidez. Por otra parte, este aumento transitorio en los niveles de transcripción del gen *gshB* y en el glutatión interno en condiciones de acidez tampoco se observa en cultivos que

entran en fase estacionaria. Este último resultado concuerda con que cultivos de la cepa CIAT899-13T2 crecidos hasta fase logarítmica tardía, al ser centrifugados y resuspendidos en medio ácido no muestran mayor sensibilidad a la acidez que la cepa salvaje. Se puede suponer que en este estado fisiológico entrarían en juego otros mecanismos de protección frente a la acidez, tal vez dependientes del factor de transcripción  $\sigma^S$ .

La resistencia a la acidez se ha encontrado que se correlaciona con la composición de los lipopolisacáridos. Se ha clasificado a los diferentes mutante ácido sensibles por su capacidad de restaurar el fenotipo salvaje aumentando la concentración de  $Ca^{++}$  en el medio de cultivo (Foster *et al*, 2000; Vinuesa *et al*, 2003). El efecto de la mutación en la cepa CIAT899-13T2 no es reparable aumentando la concentración de  $Ca^{++}$  del medio en el rango de 0,1 a 11 mM. Asimismo se ha estudiado la síntesis de proteínas de shock ácido (ASP) en *R. tropici* CIAT899. Aarons *et al* (1991) encontró que esta bacteria aumenta la síntesis de cuatro proteínas (de 55, 60, 82 y 145 kDa) y disminuye la síntesis de otras cuatro proteínas (de 43, 48, 50 y 200 kDa) a pH 4,5. Por tratamiento a pH 5,2, Peick *et al* (1999) encontró, en geles bidimensionales de poliacrilamida, un aumento en la síntesis de cinco proteínas (de 25, 22, 28, 48 y 56 kDa) y disminución en la síntesis de cuatro proteínas (de 29, 52, 105 y 85 kDa). En este trabajo identificamos seis proteínas de shock ácido, de 145, 82, 52, 29 y 25 kDa. Estas proteínas se encontraron en la cepa salvaje y en la mutante CIAT899-13T2, por lo que la deficiencia de glutatión del mutante no afecta la síntesis de estas ASP.

No se conoce con certeza los mecanismos implicados en la homeostasis de pH en las bacterias. Se ha demostrado que los rizobios responden frente a la acidez acumulando diferentes compuestos como poliaminas, glutamato y potasio, que actuaría como contraión de este último. La cepa CIAT899-13T2, sensible a la acidez, no es capaz de regular en forma eficiente su pH<sub>i</sub> en condiciones de acidez, ni aumenta su concentración de potasio en condiciones de acidez (Ricciolo *et al*, 2000). Por otra parte el aumento en los niveles de potasio luego de una acidificación en la cepa salvaje se corresponden temporalmente con el aumento en la transcripción del gen *gshB* y con el aumento de glutatión intracelular. En *E. coli* los canales de eflujo de potasio KefB y KefC son regulados negativamente por el *gsh*, y en ausencia de glutatión, se produce una pérdida de potasio. La cepa CIAT899-13T2 presenta niveles de potasio similares a los de la cepa salvaje en medio neutro. Una

mutación en un canal *kef* en la cepa CIAT899-13T2 no es suficiente para que la cepa aumente su concentración de potasio interno en condiciones de acidez. La cepa CM24 (*gshB::Tn5-lux, kef*) presenta niveles de potasio similares a la cepa CIAT899-13T2 por lo que se puede deducir que una mutación en este gen no alcanza para revertir los efectos de la falta de *gsh* de la cepa CIAT899-13T2. La presencia de esta mutación no restaura en la cepa CIAT899-13T2 el fenotipo salvaje en medio ácido. Probablemente exista otro canal de eflujo de potasio regulado por glutatión que no ha sido mutado, en estas cepas, como sugiere el efecto del CDNB sobre la cepa CM23 (*kef*). Esta hipótesis concuerda con el hecho de que en el genoma completo de *S. meliloti*, filogenéticamente cercano a *R. tropici*, se han identificado secuencias de dos posibles genes *kef*. De cualquier manera, posiblemente la sensibilidad al pH de las cepa CIAT899-13T2 no sea únicamente atribuible a la apertura de canales de tipo *Kef*, ya que el mutante no se restablece aumentando la concentración de potasio externo ni con el agregado del análogo del glutatión ácido oftálmico (Riccillo, comunicación personal). Se ha demostrado que el ácido oftálmico en *E. coli* actúa en forma similar al *gsh* sobre los canales *Kef*.

Se ha relacionado al glutatión con la protección frente al estrés oxidativo. El glutatión puede actuar en forma directa, reaccionando con HO• para reducirlo a H<sub>2</sub>O. Puede asimismo actuar como donador de electrones para la glutatión peroxidasa, que cataliza la reducción del peróxido de hidrógeno y de los peróxidos lipídicos a agua y el alcohol correspondiente (Sugiyama *et al*, 2000). Se ha estudiado en *E. coli* el regulón *oxyR*, inducible por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que activa la expresión de numerosos genes, entre ellos La expresión de numerosos genes es inducida por *OxyR*, entre ellos la hidroperoxidasa I (*katG*) (Visik, 1997). La proteína *OxyR* frente a un aumento de la concentración de peróxidos se oxida a su forma activa, se une a las al ADN de las regiones promotoras de diferentes genes. La desactivación de *OxyR* ocurre por reducción a expensas del glutatión (Zheng, 1998).

El glutatión está implicado en la resistencia a otros estreses como el salino y el oxidativo y el generado por el metilglioxal (Riccillo *et al*, 2000). No ocurre así con el déficit de nutrientes, a diferencia de lo que ocurre en *Saccharomyces cerevisiae* (Murray *et al*, 1999). Se demostró ahora que también es sensible al desbalance redox generado por agentes reductores como el ditiotreitól. Sin embargo, el efecto protector en estos casos no es atribuible a un aumento de la transcripción del gen *gshB*. *E. coli*, frente a un estrés por

aumento en la concentración de peróxidos, responde activando al sistema sensor/ regulador OxyR/ SoxR. El censor OxyR frente a un aumento en la concentración de peróxidos es oxidado a su forma activa, aumentando la transcripción de diferentes genes, entre los que se incluyen los de síntesis de la catalasa (HPI). Se restaura a su forma inactiva por reducción a expensas del glutatión. En la secuencia de *S. meliloti* se ha identificado un marco de lectura con alta homología con el gen *oxyR*, por lo que podría suponerse que un sistema similar podría estar actuando en *R. tropici*. La carencia de glutatión podría afectar el normal funcionamiento de este sistema, y por lo tanto la resistencia frente al estrés oxidativo. En esta tesis se demuestra que la actividad catalasa se induce en menor medida en el mutante CIAT899-13T2 en comparación con la cepa salvaje, frente al tratamiento con peróxido de hidrógeno. Esto nos permite sugerir que podría existir una afectación de un sistema activador de esta enzima, sensible a peróxidos, dada por el déficit de gsh. El sistema OxyR en *E. coli* se haya además implicado en la regulación de la síntesis de proteínas que tienen que ver con el mantenimiento de los puentes disulfuro intraproteicos, como por ejemplo la proteína Dps. Se ha propuesto que el glutatión actuaría como un sistema buffer del estado redox celular, lo cual podría relacionarse con la sensibilidad del mutante CIAT899-13T2 al efecto de un agente reductor como el DTT. Resulta llamativo que mutantes en el gen *dps* de *E. coli* OH157 sean sensibles a la acidez, lo cual sugeriría que uno de los efectos de la acidez es generar daño oxidativo (Choi *et al*, 2000).

El efecto protector frente a los estreses que ejerce el glutatión parece ser generalizado entre los rizobios. El mutante GshB<sup>-</sup> de *S. meliloti* 1021, cepa intrínsecamente sensible a la acidez, presenta una curva de crecimiento similar a la cepa salvaje en condiciones de neutralidad pero es altamente sensible a condiciones de acidez. Por otro lado esta cepa es, al igual que el mutante de *R. tropici*, más sensible que la cepa salvaje al metilglioxal. Al igual que en el caso del mutante CIAT899-13T2 en poroto, esta cepa es capaz de formar nódulos efectivos en alfalfa. Esto nos permite especular que el glutatión ejerce un efecto protector frente a los estreses en estas bacterias, aún cuando no es indispensable para su crecimiento. En condiciones normales, parte de sus funciones podrían ser realizadas por el dipéptido gama-glutamilcisteína.

Se conocía por estudios previos que el mutante de *R. tropici* GshB<sup>-</sup> forma nódulos efectivos en poroto y leucaena (Ricciolo, 2000). El pH del nódulo de poroto probablemente



se encuentre por encima de 4,9, como lo sugieren los estudios de Vinuesa (2003), por lo que desde el punto de vista de la acidez el mutante CIAT899-13T2 no debería encontrarse afectado. Sin embargo se conoce que ya en el hilo de infección las bacterias sufren estrés oxidativo (Santos *et al*, 2000). En los nódulos de poroto, el tiol predominante es el homoglutación, proveniente de la planta, que actuaría en el ciclo del ascorbato captando peróxidos. El homoglutación puede ser importado a la bacteria, que a su vez produce glutatión, que no es exportado. Con el paso del tiempo, disminuyen las defensas contra la oxidación nodulares y ya sea como causa o como consecuencia de esto se produce la senescencia. Las plantas de poroto inoculadas con la cepa CIAT899-13T2 formaron nódulos que sufrieron una senescencia precoz, como se evaluó mediante las determinaciones de actividad catalasa, ascorbato peroxidasa y proteasas. Estos resultados demuestran que el glutatión proveniente de la bacteria es importante para el mantenimiento de una simbiosis efectiva, protegiendo a los nódulos de la senescencia, probablemente actuando frente al estrés oxidativo.

## **7. CONCLUSIONES**

En el presente trabajo de tesis se logró:

- se clonó el gen *gshB* salvaje, y se demostró que se transcribe en forma independiente de los marcos de lectura aledaños;
- se estudió la regulación de la transcripción de este gen, determinándose que esta es constante a lo largo del crecimiento y disminuye en fase estacionaria, y posiblemente sufre activación por sustrato;
- se demostró que la transcripción se activa transitoriamente con la acidez, y que los niveles de glutatión intracelulares acompañan este aumento;
- se obtuvo mutantes de las cepas CIAT899 y CIAT899-13T2 en un gen *kef*, demostrando la existencia de estos genes en *R. tropici*;

-se demostró que la mutación en este gen no alcanza para restaurar el fenotipo salvaje en la mutante GshB<sup>-</sup>, por lo que se sugiere que existiría más de un canal KEF funcional en *R. tropici*;

-se demostró que el efecto protector del gsh frente a los estreses sería común a otros rizobios, como se puede inferir de los estudios en el mutante *gshB* de *S. meliloti* 1021;

-se determinó que el gsh podría actuar en la protección frente al daño oxidativo a través de un sistema análogo al OxyR de *E. coli*;

-se demostró que el glutatión es fundamental para el mantenimiento de una simbiosis efectiva con poroto, evitando la senescencia temprana de los nódulos.

UBIACION.....  
A.....  
Fecha 11-12-2008.....  
Inv. R..... B. 58908

## **8. BIBLIOGRAFÍA.**

- Aarons, S. y Graham, P.** Response of *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* to acidity. *Plant and Soil*. 1991. 134: 145-151.
- Aguilar, O. M., and D. H. Grasso.** The product of the *Rhizobium meliloti* *ilvC* gene is required for isoleucine and valine synthesis and nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* 1991. 173: 7756-7764.
- Altuvia S, Almiron M, Huisman G, Kolter R, Storz G.** The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol Microbiol* 1994 Jul;13(2):265-72
- Anderson, M. E.** Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. *Methods Enzymol.* 113: 548-555.
- Apontoweil, P. y Berends, W.** Glutathione biosynthesis in *Escherichia coli* K12 properties of the enzymes and regulation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1985. 1975. 399: 1-9.
- Arikado, E., Ishihara, H., Ehara, T., Shibata, C., Saito, H., Kakegawa, T., Igarashi, K., Aslund, F. y Beckwith, J.** The Thioredoxin Superfamily: Redundancy, Specificity and Gray Area Genomics. 1999. *J. of Bacteriology*. 181 (5): 1375-1379.
- Asund, F y Beckwith, J.** The Thioredoxin Superfamily: redundancy, specificity, and gray-area genomics. *Journal of Bacteriology*. 1999. 181 (5): 1375-1379.
- Bang, I., Audia, J., Park, Y. y Foster, J.** Autoinduction of the *ompR* response regulator by acid shock and control of the *Salmonella enterica* acid tolerance response. *Molecular Microbiology*. 2002. 44 (5): 1235-1250.
- Bang, I, Kim, B., Foster, J. y Park, Y.** OmpR regulates the stationary-phase acid tolerance response of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 2000. 182: 2245-2252.
- Becana, M.** N<sub>2</sub> Fixation, Carbon metabolism, and Oxidative Damage in Nodules of Dark-Stressed Common Bean Plants. *Plant Physiology*. 1997. 113: 1193-1201.
- Bergey, 1974.** *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ed. 1974.
- Birnboim, H. C. and Doly, J.** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 1979. 7: 1513-1523.
- Brewin, N.** Development of the Legume Root Nodule. *Annual Reviews in Cell Biology*. 1991. 7: 191-226.
- Booth, I. R.** The regulation of intracellular pH in bacteria. *Bacterial responses to pH*. 1999. Wiley, Chichester, Novartis Foundation Symposium 221). p: 19-37.
- Booth, I. R., Jones, M., McLaggan, D., Nikolaev, Y., Ness, L., Wood, C., Miller, S., Totemeyer, S. y Ferguson, G.** Bacterial ion channels. en *Handbook of Biological Physics*. 1996. Elsevier Science B.V. p: 693-729.
- Booth, I. R.** Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological. Reviews*. 1985. 49:359-378.
- Brockwell, J., A. Pilka, and R. A. Holliday.** Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soils of New South Wales. *Aust. J. Exp. Agric.* 1991. 31: 211-219.
- Buikema, W. J., Long, S. R., Brown, S. E., van den Bos, R. C., Earl, C., & Ausubel F. M.** *J. of Mol. and Appl. Gen* 1983. 2: 249-260.
- Caetano-Anollés, G., D. K. Crist-Estes, and W. D. Bauer.** Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. of Bacteriol.* 1988. 170: 3164-3169.

- Calcutt, M., Lewis, S. y Eisentark, A.** The OxyR gene from *Erwinia carotorova*: cloning, sequence analysis and expression in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Letters. 1998. 167: 295-301.
- Castanie-Cornet, M. y Foster, J.** *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein an a 20 bp *cis*-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamae cecarboxilase genes. Journal of Bacteriology. 2001. 147: 709-715.
- Castanie-Cornet, M., Penfound, T., Smith, D., Elliot, J., y Foster, J.** Control of acid resistance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. 1999. 181: 3525-3535.
- Chandler, M., Date, R. y Rouhley, R.** Infection and root nodule development in *Sylosanthes* species by *Rhizobium*. Journal Experimental Botany. 1982. 33: 47-57.
- Chesney, J. A., J. W. Eaton, J. R. Mahoney, Jr.** Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds. J. Bacteriol. 1996.178: 2131-2135.
- Choi SH, Baumlér DJ, Kaspar CW.** Contribution of *dps* to acid stress tolerance and oxidative stress tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. Appl Environ Microbiol 2000 Sep;66(9):3911-6
- Cochrane, T.** An ongoing appraisal of the savanna ecosystems of tropical America for beaf and cattle production. En Pasture Production in Acid Solis in the Tropic. CIAT, Call, Colombia, p. 1-2.
- Dalton, D., Joyner, S., Becana, M., Iturbe-Ormaexte, I. y Chatfield, M.** Antioxidante defenses in the peripheral cell layers of legume root nodules. Plant Physiology. 1998. 116: 37-43.
- Dalton, D., Russel, S., Hanus, F., Pascoe, G., y Evans, H.** Enzymatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. Proceedings of the National Academy of Sciences. 1986. 83: 3811-3815.
- Date, R. A. and Halliday, J.** Nature. 1979. 277: 62-64.
- Dazzo, F., Kijne, J., Haatela, K y Korhonen, T.** Fimbriae, lectins, and agglutinins of nitrogen fixing bacteria. En Microbial Lectins and Agglutinins. 1986. Mirelman, D., ed. John Wiley & Sons, New York. p. 237
- Dazzo, F., Truchet, G., Sherwood, J., Hrabak, E., Abe, M., y Pankratz, S.** Specific phases or root hair attachment in *Rhizobium fredii*-clover symbiosis. Applied and Environmental Microbiology. 1981. 48: 1140-1145
- Dazzo, F., Truchet, G.** Interactions of lectins and their saccharide receptors in *Rhizobium*-legume symbiosis. Journal of Membrane Biology. 1983. 73: 1-5
- Dilworth, M., Rynne, F., Castelli, J., Vivas-Marfisi, A., y Glenn, A.** Survival and xoplisacharide production in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 are affected by calcium and low pH. Microbiology. 1999. 145: 1585-1593.
- Eckhardt, T.** A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. Plasmid. 1978.1: 584-588.
- Elmore, M., Lamb, A., Ritchie, G. Douglas, R., Munro, A., Gajewska, A., y Booth, I.** Activation of potassium efflux from *Escherichia coli* by glutathione metabolites. Molecular Microbiology. 1990. 4 (3): 405-412.
- Epstein, W.** Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. FEMS Microbial. Rev. 1986. 39: 73-78.
- Errington, J.** *Bacillus subtilis* sporulation: regulation of gene expression and control of morphogenesis. Microbiol. Rev. 1993. 57:1-33.

- Escudero, P., Minchi, F., Gogorcena, Y., Iturbe-Ormaeche, I., Klucas, R. y Becana, M.** Involvement of activated oxygen in nitrate-induced senescence of pea root nodules. *Plant Physiology*. 1996. 110: 1187-1195.
- Evans, G., Ferguson, G., Booth, I., y Vuilleumier, S.** Growth inhibition of *Escherichia coli* by dichloromethane in cells expressing dichloro methane dehalogenase/glutathione *S*-transferase. *Microbiology*. 2000. 146: 2967-2975.
- Fahey, R., Brown, W., Adams, W y Worsham, M.** Occurrence of glutathione in bacteria. *Journal of Bacteriology*. 1978. 133 (3): 1126-1129.
- Ferguson, G., Munro, A., Douglas, R., McLaggan, D. y Booth, I.** Activation of potassium channels during metabolite detoxification in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 1993. 9 (6): 1297-1303.
- Ferguson, G. P., D. McLaggan, and I. R. Booth.** Potassium channel activation by glutathione-S-conjugates in *Escherichia coli*: protection against methylglyoxal is mediated by cytoplasmic acidification. *Mol. Microbiol.* 1995.17: 1025–1033.
- Ferguson, S.J.** Nitrogen cycle enzymology. *Current Opinion in Chemical Biology*. 1998. 2: 182-193.
- Foster, J. y Hall, H.** Inducible pH homeostasis and acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. 1991. *J. of Bacteriology*. 173: 5129-5135.
- Foster, J.** Microbial Responses to Acid Stress. *Microbial Stress Responses*. 2000. ASM Press, Washington DC. 99-115.
- Freiberg, C., Fellay, R., Balroch, A, Brought, W., Rosenthal, A y Perret, X.** Molecular basis of symbiosis between *Rhizobium* and legumes. *Nature*. 1997. 387: 394-401.
- Fujihara, S., and T. Yoneyama.** Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* p220 and *Bradyrhizobium japonicum* A 1017. *Appl. Environ. Microbiol.* 1993. 59: 1104-1109.
- Givskov, M., L. Eberl, and S. Molin.** Responses to nutrient starvation in *Pseudomonas putida* KT2442L two-dimensional electrophoretic analysis of starvation- and stress-induced proteins. *J. Bacteriol.* 1994. 176:4816–4824.
- Glenn, A., Reeve, W., Tiwari, R., y Dilworth, M.** Acid tolerance in root nodule bacteria. *En Bacterial Responses to pH*. 1999. Novartis Foundation Symposium. pag. 112-130.
- Glenn, A. y Dilworth, M.** The life of root nodule bacteria in the acidic underground. *FEMS Microbiology Letters*. 1994. 123: 1-10.
- Graham, P. H., Draeger, M. L. Ferrey, M. J. Conroy, B. E. Hammer, E. Martinez, S. R. Aarons, and C. Quinto.** Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Canadian Journal of Microbiology*. 1994. 40: 198-207.
- Graham, P.** Stress in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, nodulation under adverse soli conditions. *Canadian Journal of Microbiology*. 1991. 38: 475-484.
- Graham, P..H., S.E. Viteri, F. Mackie, A. and A. Palacios.** Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 1982. 5: 121-128.
- Gogorcena, Y., Gordon, A., Escudero, P., Minchin, F., Winchin, J., Morán, J., y Graham, P., Viteri, S., Mackie, F., Vargas, A y Palacios, A.** Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Research*. 1982. 5:0000 121-128
- Graham, P. H., S. E. Viteri, F. Mackie, A. T. Vargas, and A. Palacios..** Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 1982. 5: 121-128.

- Hanahan, D.** Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* 1983. 166: 557-580.
- Hanahan, D.** En DNA cloning vol. I, a practical approach. D M Glover (ed) IRL. 1985.
- Hengge-Aronis, R.** The general stress response in *Escherichia coli*. En *Bacterial Stress Responses*. 2000. ASM Press, Washington D.C.
- Hernández-Lucas, I., L. Segovia, E. Martínez Romero, and S.G. Pueppke.** Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* sp. that nodulate *Phaseolus vulgaris*. *Plant Soil.* 1995. 149: 103-109.
- Herourart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frendo, P., Touati, D., y Puppo, A.** Cloning and characterization of the katA gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J Bacteriol* 1996 Dec;178(23):6802-9
- Ho, S., Wang, J., y Schindler, M.** Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum* I. Saccharide specific inhibition of homotypic and heterotypic adhesion. *J. Cell. Biol.* 1990. 111: 1639-1643.
- Ho, S., Schindler, M. y Wang, J.** Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum* II. Isolation and characterization of a galactose lectin. *J. Cell. Biol.* 111: 1639-1643.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M., Rubio, M., Dalton, D. y Becana, M.** The antioxidants of legume root nodule mitochondria. *Moleculas Plant and Microbe Interactions*. 2001. 14: 1189-1196.
- Jamet, A., Sigaud, S., Van de Sype, G., Puppo, A y Herourart, D.** Ver en acrbat wriqwter
- Jigashe, M. y Ishima, A.** ARegulation of RNA polimerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracelular levels of  $\sigma^{70}$  and  $\sigma^{38}$ . 1995. *Journal of Bacteriology*. 177: 6832-6835.
- Kannenber, E., Brewin, N.** Expression of a cell surface antigen from *R. leguminosarum* 3841 is regulated by oxygen and pH. *Journal of Bacteriology*, 1989. 171: 4543-4548.
- Kashket, E.** Bioenergetics of lactic acid bacteria : cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiological Reviews*. 1987. 46: 233-244.
- Kim, J., y Mayfield, J.** Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression. *Journal of Bacteriology*. 2000. 182 (19): 5631-5633.
- Kiss, G. B., E.; Vincze, Z. Kálman, T. Forrai, and A . Kondorosi.** Genetic and biochemical analysis of mutants affects nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* 1979.113: 105-118.
- Kjelleberg, S.** Starvation in bacteria. 1993. Plenum Press, New York, N.Y.
- Kobayashi, H.** Enzyme level of of enterococcal F1F0-ATP-ase is regulated by pH at the step of assembly. 1999. *Eur. J. Biochem.* 259: 262-268.
- Kobayashi, H., Murakami, N. y Unemoto, T.** Regulation of the cytoplasmic pH in *Streptococcus faecalis*. *J. Biological Chem.* 1982. 158: 1157-1160.
- Kragelund, L., B. Christoffersen, O. Nybroe, and F. J. de Bruijn.** Isolation of *lux* reporter gene fusions in *Pseudomonas fluorescens* DF57 inducible by nitrogen or phosphorus starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 1995. 17:95-106.
- Lodeiro, A., González, P., Hernandez, A., Blagué, L y Favelukes, G.** Comparison of drought tolerance in nitrogen-fixing and inorganic nitrogen-grown common beans. *Plant Science*. 2000. 154: 31-34.

- Lodeiro, A. R., and Favelukes, G.** Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. *Soil. Biol. Biochem.* 1999. 31: 1405-1411.
- Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A., y Randall, R. J.** *Biological Chemistry.* 1951. 193: 265-275.
- Mandel, M. O and Higa, D.,** *J. Mol. Biol.* 1970. 53: 159.
- Marsh, J., Erfle, M. y Wykes, E.** *Gene.* 1984. 32: 481-485.
- Matamoros, M., Baird, L., Escudero, P., Dalton, D., Minchin, F., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M., Morán, J., Gordon, A., y Becana, M.** Stress-Induced Legume Root Nodule Senescence. Physiological, Biochemical and Structural Alterations. *Plant Physiology.* 1999. 121: 97-111.
- Martinez-Romero, E., L. Segovia, F. Martins Mercante, A.A. franco, P. Graham and M.A. Pardo.** *Rhizobium tropici*, a Novel Species Nodulating *Phaseolus vulgaris* L. Beans and *Leucaena* sp. Trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1991. 41: 417-426.
- McLaggan, D., Rufino, H., Jaspars, M. y Booth, I.** Glutathione conversion of N-ethylmaleimide to the maleamic acid by *Escherichia coli*: an intracellular detoxification process. *Applied and Environmental Microbiology.* 2000. 66 (3): 1393-1399.
- McLaggan, D. J., Naprstek, E. T. Buurman, and W. Epstein.** Interdependence of K<sup>+</sup> and glutamate accumulation during osmotic adaptation of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry.* 1994. 269: 1911-1917.
- Meade, H., Long, S., Ruvkun, G., Brown, S., y Ausubel, F.** *Journal of Bacteriology.* 1982. 149: 114-122.
- Meister, A.** Glutathione metabolism and its selective modification. *The Journal of Biological Chemistry.* 1988. 263: 17205-17208.
- Mellor, R.** Bacteroids in the Rhizobium-legume symbiosis inhabit a plant internal lytic compartment. *Journal of Experimental Botany.* 1989. 40: 831-839.
- Meury, J y Kepes, A.** Glutathione and the gated potassium channels of *Escherichia coli*. *The EMBO Journal.* 1982. 1 (3): 339-343.
- Milcamps, A., and F. J. de Bruijn.** Identification of a novel nutrient-deprivation induced *Sinorhizobium meliloti* gene (*hmgA*) involved in the degradation of tyrosine. *Microbiology.* 1999. 145:935-947.
- Milcamps, A., D. M. Ragatz, P. Lim, K. A. Berger, and F. J. de Bruijn.** Isolation of carbon- and nitrogen-deprivation induced loci of *Sinorhizobium meliloti* 1021 by Tn5-*luxAB* mutagenesis. *Microbiology.* 1998. 144:3205-3218.
- Miller, J.** *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, NY, USA. 1972.
- Munns, D. N.** Acid solis tolerance in legumes and rhizobia. *Adv. Plant Nutr.* 1986. 2: 63-91.
- Munro, A., Ritchie, G., Lamb, A., Douglas, R i Booth, I.** The cloning and DNA sequence of the gene for the glutathione-regulated potassium –efflux system KefC of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology.* 1991. 5 (3): 607-616.
- Ness, L., Ferguson, G., Nikolaev, Y y Booth, I.** Survival of *Escherichia coli* cells exposed to iodoacetate and chlorodinitrobenzene is independent of the glutathione-gated K efflux systems KefB and KefC. *Applied and Environmental Microbiology.* 1997. 63 (10): 4083-4086.
- O'Hara, G., y Glenn, A.** The adaptative acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Archives Microbiology.* 1994. 161: 286-292.

- O'Hara, G., T. Gross, M. Dilworth, and A. Glenn.** Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Applied Environmental Microbiology*. 1989. 55: 1870-1876.
- Oke, V y Long, S.** Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Current Opinion in Microbiology*. 2: 641-646.
- Okumura, N., K. Masamoto, and H. Wada.** The *gshB* gene in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7942 encodes a functional glutathione synthetase. *Microbiology* 1997. 143: 2883-2890.
- Peick, B., Graumann, P., Schmid, R., Marahiel, M. y Werner, D.** Differential pH induced proteins in *Rhizobium tropici* CIAT899 and *Rhizobium etli* CIAT611. *Soil Biology & Biochemistry*. 1999. 31: 189-194.
- Penninckx, M y Elskens, M.** Metabolism and functions of glutathione in micro-organisms. 1993. *Advances in Microbial Physiology*. 34: 239-301.
- Perez-Galdona, R., and M. L. Kahn.** Effects of organic acids and low pH on *Rhizobium meliloti* 104A14. *Microbiology*. 1994. 140: 1231-1235.
- Pueppke, S.** The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by Rhizobia. *Critical Reviews in Biotechnology*. 1996. 16 (1): 1-51.
- Reeve, W. Tiwari, R., Wong, C., Dilworth, M., y Glenn, A.** The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is upregulated by low pH and other stresses. *Microbiology*. 1998.
- Riccilo, P., Muglia, C., De Bruijn, F, Roe, A., Booth, I. y Aguilar, M.** Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology*. 2000. 182 (6): 1748-1753.
- Rolfe, B., y Greeshoff.** Genetic analysis of legume nodule initiation. *Annual Reviews of Plant Physiology*. 1998. 39: 297-319.
- Rowbury, J., y Goodson, M.** Glucose induced acid tolerance appearing at neutral pH in log phase *Escherichia coli* and its reversal by cyclic AMP. *Journal of Applied and Microbiology*. 1998. 85: 615-620.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T.,** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, CSH, New York. 1989.
- Santos, R., Herourart, D., Puppo, A., y Touati, D.** Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Molecular Microbiology*. 2000. 38 (4): 750-759.
- Sevier, Carolyn y Kaiser, C.** Formation and transfer of disulphide bonds in living cells. *Nature Reviews*. 2002. (3): 836-845.
- Sigaud, S., Becquet, V., Frendo, P., Puppo, A. y Herouart, D.** Differential Regulation of Two Divergent *Sinorhizobium meliloti* Genes for HPII-Like Catalases during Free-Living Growth and Protective Role of Both Catalases during Symbiosis. *Journal of Bacteriology*. 1999. 181 (8): 2634-2639.
- Simon, R.** *An Advanced Molecular Genetics*. Pühler, A. & Timmis, K. N.(eds). -Springer-Verlag. 1984. pp125-139.
- Simon, R., Preifer, U., y Puhler, A.** *Biotechnology*. 1983. 1: 784.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. y Kijne, J.** Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Molecular Microbiology*. 1992. 6: 2897
- Smit, G., Longman, T., Boerrigter, M., Kijne, J. y Lugtenberg, B.** Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca<sup>2+</sup> dependent