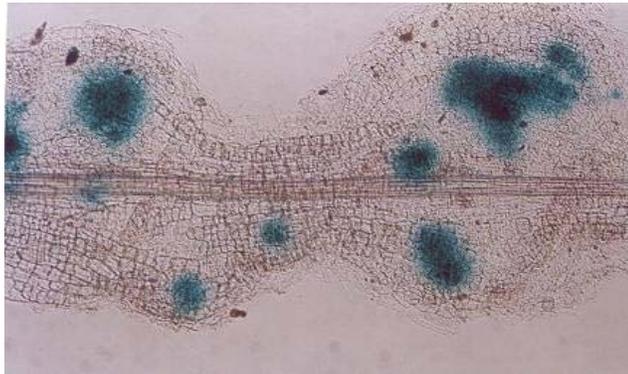


Tesis Doctoral
Mónica Collavino

Estudios sobre el significado del gen *guaB* de *R. tropici* en vida libre y en su interacción simbiótica con leguminosas hospedadoras



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Año 2005



Tesis Doctoral
Mónica Collavino

**Estudios sobre el significado del gen *guaB* de
R. tropici en vida libre y en su interacción
simbiótica con leguminosas hospedadoras**

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Año 2005



El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido desarrollado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Profesor Dr. Orlando Mario Aguilar.

Parte del siguiente trabajo de tesis fue publicado en las siguientes revistas científicas:

A *guaB* mutant strain of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis. Riccillo, P.M., Collavino, M.M., Grasso, D.H., England, R., de Bruijn, F.J. y O.M. Aguilar. Mol. Plant-Microbe Interact 2000. 13 (11): 1228-1236.

GuaB activity is required in *Rhizobium tropici* during the early stages of nodulation of determinate nodules but dispensable for the *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction. Collavino, M. M, Riccillo, P.M., Grasso, D.H., Crespi, M. y O.M. Aguilar. 2005. Mol. Plant-Microbe-Interact. En prensa

Mi reconocimiento

A la facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata, por haberme brindado el espacio físico y los equipos necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste y al Fondo para el Mejoramiento de la calidad educativa (FOMECE) por el soporte financiero.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por el otorgamiento de la beca que hizo posible mi dedicación exclusiva a la investigación.

Mi agradecimiento

Al Dr. Mario Aguilar, por su dirección crítica, sus enseñanzas y su estímulo durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Daniel Grasso por los aportes constantes que orientaron este trabajo.

Al Dr. Alejandro Viale de la Universidad Nacional de Rosario, por proveerme gentilmente de los anticuerpos anti-DnaK y anti-GroEL de *Chromatium vinosum*.

A los Dres Tony Lagares, Daniela Hozbor y Anibal Lodeiro, por compartir los equipos, reactivos y sobre todo su tiempo.

A la Dra. Alicia Chávez del CIDCA, que gentilmente nos permitió usar el cromatógrafo en fase gaseosa.

Al Dr. Pablo Pérez por permitirme utilizar los equipos de microscopía del CIDCA.

Al Dr. Alberto Capparelli, por su atenta predisposición durante el cursado de la materia Fisicoquímica.

A la Dra. Hebe Rey que me brinda su apoyo y es una fuerza siempre positiva en todas las circunstancias.

A mis compañeros de R4, Verónica, Daniel, Juan Carlos, Cecilia, Adriana, Katy, Pedro, Omar, Marcelo, Eitel, por ser compañeros, con la extensión académica y social de esta palabra, en especial a Pablo Riccillo por su participación en el capítulo cinco y por su ayuda en la última etapa de esta tesis.

A los chicos del IBBM, a todos los que se encuentran actualmente y a los que se fueron distribuyendo en otras latitudes, por compartir su tiempo y experiencias.

A los integrantes de la Cátedra de Microbiología de Suelo, Facultad de Cs. Agrarias, UNNE por su buena disposición durante la etapa final de edición de esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Fisiología Vegetal, Facultad de Cs. Agrarias, UNNE, por su colaboración, apoyo y amistad; en especial a Ernestina por su compañía y ayuda durante la escritura.

A mis suegros, por su ayuda y apoyo en el momento preciso.

A mi familia, mis viejos y mis hermanos, por su confianza y apoyo emocional, en especial a mi hermana Mara.

A Germán y a mis hijos, por comprender mucho y quejarse solo un poco.

Índice Temático

Abreviaturas y siglas

Capítulo I. Introducción general y objetivos

Introducción general

Fijación de nitrógeno.....	1
Importancia del nitrógeno en la agricultura.....	1
Ganancia de nitrógeno inorgánico en el suelo.....	1
Fijación biológica del nitrógeno.....	2
Características generales de la fijación biológica.....	2
Sistemas biológicos fijadores de nitrógeno.....	3
Simbiosis rizobio-leguminosa.....	5
Familia Rhizobiaceae.....	5
La estructura genómica en los rizobios.....	6
Familia Leguminosae.....	8
<i>Phaseolus vulgaris</i> : Importancia del cultivo en la Argentina.....	8
Especificidad de reconocimiento mutuo en la interacción rizobio-leguminosa.....	9
<i>Rhizobium tropici</i>	11
El proceso simbiótico.....	13
El intercambio de señales moleculares entre la planta y la bacteria inicia el proceso simbiótico.....	13
La percepción y traducción del factor Nod.....	15
Infección y formación del nódulo.....	16
Nódulos de crecimiento determinado e indeterminado.....	17
Endocitosis y diferenciación de la bacteria.....	20
Funcionamiento del nódulo.....	22
Fijación de nitrógeno.....	23
Metabolismo del carbono.....	23
Oxígeno: mecanismos de protección.....	24
El nitrógeno como regulador de la fijación.....	25
Exportación de nitrógeno.....	25
Genes participantes en la interacción simbiótica.....	27
Nodulinas de la planta.....	27
Genes simbióticos de la bacteria.....	29
Las purinas en el proceso simbiótico.....	32

La síntesis <i>de novo</i> de purinas en bacterias.....	32
Vías de salvataje y catabolismo de purinas.....	34
Relación entre la síntesis de purinas y el proceso de infección en la simbiosis	36
La síntesis de guanina es esencial para la tolerancia térmica y la nodulación efectiva en <i>R. tropici</i>	37
Objetivos del presente trabajo	
Objetivos generales.....	39
Objetivos particulares.....	39

Capítulo II. Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y plásmidos.....	41
Medios de cultivo.....	44
Procedimientos microbiológicos.....	44
Transformación de <i>E. coli</i>	44
Conjugación bacteriana.....	44
Curvas de crecimiento en medio mínimo.....	46
Ensayos de tolerancia a estrés térmico en medio agarizado.....	46
Determinación de la actividad metalobetalactámica en <i>R. tropici</i>	46
Técnicas de Biología molecular.....	47
Extracción y purificación de ADN.....	47
Extracción de ADN total.....	47
Extracción de ADN plasmídico.....	48
Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	48
Técnicas de modificación y análisis de ADN.....	48
Condiciones de digestión y ligación de ADN.....	48
Separación de ADN en geles de agarosa.....	49
Visualización de plásmidos en geles de agarosa (Eckhardt).....	49
Condiciones de amplificación (PCR) de ADN.....	49
Ensayos de hibridación de ADN (Southern blot)	50
Análisis informático de las secuencias.....	51
Clonado de la región cromosomal que contiene al gen <i>guaB</i>	51
Construcción de una biblioteca parcial de <i>R. tropici</i>	51
Detección por PCR del gen <i>guaB</i> salvaje de <i>R. tropici</i>	52
Obtención de la cepa <i>guaB</i> de <i>S. meliloti</i>	52
Enriquecimiento en auxótrofos para guanina.....	52

Análisis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	53
Extracción y separación por electroforesis de las proteínas.....	53
Marcación <i>in vivo</i> de proteínas con ³⁵ S metionina.....	54
Transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot).....	55
Determinaciones enzimáticas.....	55
Actividad IMPd y Xdh en geles nativos.....	55
Medidas de actividad β-galactosidasa.....	56
Medidas de actividad β-glucuronidasa.....	57
Determinación de la actividad nitrogenasa.....	58
Ensayos de nodulación.....	59
Esterilización y germinación de semillas.....	59
Condiciones de cultivo.....	59
Preparación de los cultivos bacterianos e inoculación de las plantas.....	59
Cinética de nodulación de alfalfa.....	60
Determinación del peso seco de plantas de siratro.....	60
Aislamiento y recuento de bacterias de los nódulos.....	60
Observación de cortes de nódulos por microscopía.....	60

Capítulo III. Estudio de la organización y la expresión del gen *guaB*

Introducción.....	63
Organización de los genes de síntesis de guanina.....	63
Regulación de la expresión de los genes <i>gua</i>	63
Resultados.....	65
Clonación de la región cromosomal que contiene al gen <i>guaB</i>	65
Organización génica de la región <i>guaB</i> de <i>R. tropici</i>	68
Análisis de la actividad betalactámica en <i>R. tropici</i>	69
Los genes <i>guaA</i> y <i>guaB</i> de <i>R. tropici</i> no están asociados físicamente.....	72
Secuencias conservadas en la región 5' adyacente al gen <i>guaB</i> de los rizobios.....	73
El gen <i>guaB</i> salvaje complementa la cepa mutante CIAT899.10T.....	75
El rol de los intermediarios de purinas en la simbiosis de <i>R. tropici</i> con poroto.....	79
Análisis de la expresión génica del gen <i>guaB</i>	81
Actividad transcripcional de los marcos de lectura identificados en la región	
<i>guaB</i>	81
Las purinas exógenas afectan negativamente la expresión del gen <i>guaB</i> de <i>R.</i>	
<i>tropici</i>	86
Análisis de la expresión de la región 5' adyacente al gen <i>guaB</i>	88

Estudios de complementación celular entre los mutantes NifD ⁻ y GuaB ⁻	91
Discusión.....	95

Capítulo IV. La capacidad de síntesis de proteínas de estrés térmico en el mutante *guaB* de *R. tropici*

Introducción.....	99
Mecanismos de respuesta al estrés de temperatura en bacterias.....	99
Mecanismos de estrés térmico en los rizobios.....	100
El estrés de temperatura en la simbiosis <i>Rhizobium</i> -leguminosas.....	102
Resultados.....	104
Perfil de las proteínas generales durante el estrés térmico.....	104
Síntesis de las proteínas de estrés térmico (HSPs) en <i>R. tropici</i>	104
Discusión.....	111

Capítulo V. La expresión del gen *guaB* se requiere desde las etapas tempranas de la simbiosis

Introducción.....	115
Resultados.....	117
Clonación del gen <i>guaB</i> bajo la dirección de los promotores simbióticos.....	117
Patrón de expresión del gen <i>guaB</i> dirigido por los promotores simbióticos en condiciones de vida libre.....	120
Actividad de los promotores simbióticos en el nódulo.....	121
Propiedades simbióticas de la cepa mutante CIAT899-10.T expresando el gen <i>guaB</i> en las distintas etapas de la simbiosis.....	125
Discusión.....	128

Capítulo VI. El rol del gen *guaB* en otras asociaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno

Introducción.....	132
Autótrofos de purinas en <i>S. meliloti</i> 1021.....	132
Las purinas en las plantas.....	134
Resultados.....	135
El rol del gen <i>guaB</i> en la interacción simbiótica <i>S. meliloti</i> -alfalfa.....	135

Obtención de un mutante <i>guaB</i> derivado de la cepa <i>S. meliloti</i> 1021.....	135
El mutante <i>guaB</i> de <i>S. meliloti</i> 1021 es auxótrofo para guanina.....	139
<i>S. meliloti</i> utiliza la ruta alternativa de síntesis de de guanina vía la enzima Xdh.....	139
Determinación de la actividad xantina.....	140
La suplementación del medio con hipoxantina y adenina restauran el crecimiento del mutante <i>GuaB</i>	140
<i>S. meliloti</i> <i>GuaB</i> ⁻ induce la formación de nódulos efectivos en alfalfa.....	144
Requerimiento del gen <i>guaB</i> de <i>R. tropici</i> en la interacción con siratro.....	147
Discusión.....	150
Conclusiones Generales	154
Referencias Bibliográficas	158

Abreviaturas y siglas

ADN	Ácido <u>D</u> esoxirribo <u>n</u> ucleico
ADNr	ADN ribosomal
ARN	Ácido <u>R</u> ibo <u>n</u> ucleico
ATP	Adenosina 5' trifosfato
AMP	Adenosina 5' monofosfato
cAMP	Adenosina-3', 5'-monofosfato o AMP cíclico
dATP	2'-deoxiadenosina 5'-trifostato
dNTPs	2'-deoxirribonucleósidos 5-trifosfato
DO	<u>D</u> ensidad <u>Ó</u> ptica
EDTA	Ácido etilendiamino tetracético
ENOD	Nodulinas de expresión temprana (Early nodulins)
FBN	<u>F</u> ijación <u>B</u> iológica del <u>N</u> itrógeno
g	Gramo(s)
GMP	Guanosina monofosfato
HSPs	Proteínas de estrés térmico (<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> roteins)
IMP	Inosina monofosfato
IMPd	Inosina monofosfato deshidrogenasa
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LB	Medio de cultivo <u>L</u> uria <u>B</u> ertoni
M	Molar
mM	Milimolar
mg	Miligramo(s)
min	Minuto(s)
ml	Mililitro(s)
nmol	Nanomol
nt	Nucleótido(s)
ONPG	O-nitrofenilgalactopiranósido
ORF	Marco de lectura abierto (<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame)
pM	picomolar
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<u>P</u> oly <u>a</u> crilamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
pb	Pares de bases nucleotídicas

p-NPG	p-nitrofenil β -D-glucuronido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
pr.	Promotor
PY	Medio de cultivo (<u>P</u> eptone <u>Y</u> east <u>E</u> xtract)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio (<u>S</u> odium <u>D</u> odecil <u>S</u> ulfate)
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
TY Extract)	Medio de cultivo triptona y extracto de levadura (<u>T</u> ripton <u>Y</u> east Extract)
UV	Luz ultravioleta
μ g	Microgramo(s)
μ l	Microlitro(s)
μ M	Micromolar
μ M	Micromolar
V	Volts
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -galactopiranosido
X-glucA	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido
XMP	xantosina monofosfato
Xdh	xantina deshidrogenasa
YEM	Medio de cultivo (<u>Y</u> east <u>E</u> xtract <u>M</u> annitol)
% p/v	Porcentaje peso en volumen
% v/v	Porcentaje volumen en volumen

CAPÍTULO I

Introducción General

LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO

Importancia del nitrógeno en la agricultura

El nitrógeno es uno de los constituyentes esenciales de los seres vivos, siendo un elemento clave en la composición de las proteínas y los ácidos nucleicos. El nitrógeno fijado en compuestos inorgánicos del suelo se encuentra generalmente en niveles bajos, lo cual sumado a la remoción constante por el cultivo intensivo resultan en un factor limitante del crecimiento de las plantas. La mayor parte del nitrógeno en el suelo se encuentra formando compuestos orgánicos, solo una fracción pequeña, menos del 10% del nitrógeno total, esta presente en combinaciones inorgánicas como amonio o nitratos, las cuales representan las únicas fuentes disponibles para los vegetales adquiriendo mayor importancia los nitratos. Por otro lado, existen diversas formas bajo las cuales se puede perder el nitrógeno inorgánico del suelo. La relativa buena solubilidad de los nitratos facilita su movilidad que los coloca mayoritariamente debajo del área de penetración radicular (lixiviación de nitratos). En suelos calcáreos y en ambientes de altas temperaturas es importante la pérdida debido a la volatilización del amonio. Asimismo, la desnitrificación es la fuga biológica de nitrógeno más importante, ya que los productos finales de esta respiración anaerobia, N_2 y N_2O , son liberados a la atmósfera (Alexander, 1980). Estas consideraciones apuntan a resaltar la variabilidad que experimenta el nivel de nitrógeno en el suelo, el cual puede alcanzar niveles limitantes para el crecimiento vegetal. En el párrafo siguiente describiremos algunos procesos biológicos que representan contribuciones positivas al balance de nitrógeno fijado en la biosfera.

Ganancia de nitrógeno inorgánico en el suelo

La pérdida constante de nitrógeno a la atmósfera es compensada por la fijación de nitrógeno, reacción que comprende la oxidación o reducción de este elemento para dar óxidos o amonio. La gran energía requerida para la ruptura del triple enlace de la molécula de nitrógeno proviene de las siguientes tres fuentes principales: la fijación espontánea, la transformación antrópica y la fijación biológica. En la fijación espontánea, la actividad natural de descargas eléctricas provoca la transformación del nitrógeno del aire en óxidos de

nitrógeno o amonio que son arrastrados al suelo por la lluvia. Se estima que el aporte de nitrógeno fijado por este proceso es menos del 10% del total. En forma sintética, la fijación industrial se realiza por el método de Haber-Bosch, que combina nitrógeno del aire con hidrogeno en condiciones de altas de presión y temperatura. La energía necesaria para la obtención del hidrógeno procede de los combustibles fósiles, gas y petróleo, representando el 1 % de la energía total consumida a nivel mundial. Este proceso representa directamente el origen de los fertilizantes nitrogenados y aporta, en comparación con la fijación biológica, cantidades casi equivalentes de nitrógeno anual fijado (Postgate, 1998). Además del gasto de energía en la producción y transporte del producto, el uso abusivo de fertilizantes nitrogenados tiene un impacto negativo sobre el medio ambiente ya que provoca la eutroficación de los cursos de agua, la contaminación de las napas freáticas, así como también la contaminación de la atmósfera por los gases generados por la actividad de las bacterias del suelo sobre los nitratos (Vitousek *et al.*, 1997). Estas consideraciones ponen de relieve la importancia de limitar el uso de fertilizantes nitrogenados de origen químico, favoreciendo las fuentes biológicas o el aporte biológico (Sprent y Sprent, 1990).

FIJACIÓN BIOLÓGICA DE NITRÓGENO

Características generales de la fijación biológica

La fijación biológica (FBN) del nitrógeno consiste en la conversión del nitrógeno atmosférico a amonio y su incorporación a la biosfera. Este proceso contribuye globalmente con 150×10^6 T por año, cerca de la mitad del nitrógeno utilizado en el cultivo de las plantas (Peoples *et al.*, 1995; Postgate, 1998). En los sistemas de FBN la reducción del nitrógeno es catalizada por el complejo enzimático denominado nitrogenasa. La forma mas estudiada de esta enzima es el sistema dependiente de molibdeno, compuesto por dos metaloproteínas (Rees y Howard, 2000), la proteína MoFe dinitrogenasa o componente I y la proteína de Fe dinitrogenasa reductasa o componente II. Las dos enzimas funcionan conjuntamente, el componente II transfiere los electrones a la dinitrogenasa, mientras que esta última posee el sitio catalítico para reducir el nitrógeno. Se han aislado nitrogenasas homólogas al sistema descrito, en las que el molibdeno es sustituido por vanadio, como la nitrogenasa-2 sintetizada por

Azotobacter vinelandii y *A. chroococcum*, o por hierro, como la nitrogenasa-3, Fe-Fe proteína, presente en *Azotobacter vinelandii* (Bishop *et al.*, 1982; Eady, 1996). Todas las nitrogenasas purificadas hasta la fecha se inhiben irreversiblemente en presencia de O₂ y requieren para su actividad gran cantidad de energía (Postgate, 1998).

Sistemas biológicos fijadores de nitrógeno

La capacidad de fijar nitrógeno se encuentra restringida a un grupo limitado de organismos procarióticos, denominados diazótrofos. Estos organismos pertenecientes a diversos grupos taxonómicos, tienen en común la propiedad de síntesis y regulación de la nitrogenasa. De acuerdo a su relación con las plantas, los diazótrofos se pueden clasificar en fijadores libres, asociados y simbióticos.

Entre los organismos capaces de fijar nitrógeno en vida libre se encuentran aerobios estrictos como *Azotobacter*, anaerobios facultativos, como los géneros *Bacillus*, *Klebsiella* y *Enterobacter*, microaerófilos, como *Thiobacillus*, *Nicobacterium* y *Acetobacter* y anaerobios estrictos como los géneros *Clostridium*, *Desulfobrio*, *Desulfotomaculum* y *Methanobacillus*. Si bien estos géneros poseen los mecanismos que les permiten expresar la enzima nitrogenasa sin requerir la asociación con otros organismos, su eficiencia puede ser favorecida por los nutrientes provenientes de la planta y la baja tensión de oxígeno que le ofrece la rizósfera.

La FBN puede encontrarse en asociaciones bacteria-planta que no implican la formación de estructuras especializadas en la raíz. Ejemplos de estos sistemas, denominados rizocenosis asociativas, se encuentran en la interacción entre plantas C₄ del tipo maíz o caña de azúcar y bacterias de los géneros *Gluconacetobacter*, *Azoarcus*, *Herbaspirillum* o *Azospirillum*. En este sistema se puede encontrar a la bacteria asociada fuertemente a la superficie de la raíz o en los espacios intercelulares del córtex, fijando nitrógeno a expensas del exudado radical. Si bien estas asociaciones contribuyen en general a la mayor producción vegetal, no necesariamente esa respuesta está causada por la fijación de nitrógeno. En el caso de *Azospirillum*, género que se asocia con gramíneas y cereales de todo el mundo, el efecto beneficioso de la asociación parece deberse

principalmente a la capacidad de la bacteria de producir auxinas, fitohormonas que determinan un mayor desarrollo del sistema radical y, por lo tanto, mejora la posibilidad de captar agua y nutrientes del suelo. Con relación a la fijación, la ausencia de transferencia directa del nitrógeno fijado a la planta representa una ineficiencia del diazótrofo libre. Si bien estas bacterias no pueden ser utilizadas como fijadoras eficientes, se ha demostrado su utilidad en co-inoculación con *Rhizobium*, o solas, actuando como rizobacterias que promueven el crecimiento vegetal (PGPRs), siendo además un sistema modelo de estudio de la interacción microorganismo-planta, para las monocotiledóneas (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

Las cianobacterias conforman un segundo sistema de asociación fijadora. Estos diazótrofos pueden asociarse con hongos, hepáticas, pteridofitas, gimnospermas y algunas angiospermas. Dado que el oxígeno inactiva en forma irreversible a la nitrogenasa, estos organismos fotosintéticos han desarrollado estrategias especiales para separar los procesos de fotosíntesis y fijación. En las bacterias filamentosas *Anabaena* y *Nostoc*, la ausencia de nitrógeno combinado provoca la diferenciación de algunas células vegetativas en los llamados heterocistes. Estas estructuras carecen del fotosistema II, el sistema productor de oxígeno, esta circunstancia unida a la fotorespiración activa, permite generar en estas células el ambiente anaeróbico necesario para la fijación. Las bacterias heterocísticas en general son responsables del nitrógeno fijado en áreas marinas y en lagos, mientras que las bacterias que no poseen estas estructuras son importantes fijadoras en aguas con baja tensión de oxígeno, como lagos eutróficos y aguas estancadas. En campos de arroz, las cianobacterias *Anabaena* y *Nostoc* fijan de 30 a 70 Kg de N_2 /ha/año, permitiendo que este cultivo tenga una producción sostenible a largo plazo sin el uso de fertilizantes nitrogenados (Knowles y Barraquio, 1994).

Finalmente, el sistema de fijación de nitrógeno más estudiado es la asociación simbiótica entre plantas superiores y bacterias con la formación de nódulos, esto es estructuras especializadas para el proceso de fijación. En esta interacción mutualista, la planta recibe, por transporte directo, el nitrógeno fijado por la bacteria, a cambio, le proporciona al microsimbionte los compuestos carbonados necesarios para el proceso de fijación, así como un

ambiente aislado de los factores externos (competencia con otras rizobacterias, estreses abióticos y la difusión libre de oxígeno). En este sistema, las interacciones más representativas son los nódulos actinorrhizales, importantes a nivel de la reforestación, y la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas, que juega un papel primordial en los sistemas de cultivos.

Los actinomicetos del género *Frankia* son bacterias promiscuas que forman nódulos en 25 géneros de plantas leñosas dicotiledóneas (Huss-Danell, 1997). Las plantas actinorrhizales, si bien predominan en zonas templadas, tienen amplia distribución encontrándose en ambientes muy disímiles, desde los trópicos a las áreas subárticas. Algunas se adaptan a condiciones limitantes de humedad y pH siendo especies colonizadoras en estos ambientes, por lo que la importancia ecológica del género radica en el aporte de nitrógeno en zonas áridas y suelos alcalinos (Myrold, 1994).

La simbiosis entre *Rhizobium* y las leguminosas representa aproximadamente el 40% de FBN. Esta interacción es de vital importancia para los sistemas agrícolas. Si bien se estima el aporte total del nitrógeno fijado en 50 a 600 Kg por ha/año, el aporte específico de cada leguminosa es muy variable, y depende principalmente del tipo de cultivo, la tasa de crecimiento de las plantas y las condiciones ambientales de producción (Peoples *et al.*, 1995).

Simbiosis rizobio-leguminosa

Familia *Rhizobiaceae*

Tradicionalmente, la familia *Rhizobiaceae* se define en base a la capacidad de sus integrantes para inducir nódulos en plantas leguminosas (Jordan, 1984). La clasificación de esta familia se ha revisado en numerosas ocasiones, teniendo en cuenta los avances realizados en cuanto a aspectos morfológicos, fisiológicos bioquímicos y el análisis de secuencias nucleotídicas de las bacterias (Broughton, 2003). De acuerdo a la clasificación actual, la familia se encuentra integrada por bacterias de la subdivisión α -proteobacteria agrupadas en 7 géneros, *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium* (ICSBI, 2003). Recientemente se ha propuesto unir los géneros *Agrobacterium*, *Allorhizobium* y *Rhizobium* en un único género debido a la similitud observada en las secuencias del ADNr 16S

(Young *et al.*, 2001). Por otra parte, se han identificado al menos 50 β -proteobacterias pertenecientes a los géneros *Burkholderia* y *Ralstonia* capaces de nodular leguminosas, proponiéndose los términos α y β -rizobia, para distinguir los rizobios pertenecientes a las correspondientes subdivisiones (Moulin *et al.*, 2001; Vandamme *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2001; 2003).

La estructura genómica en los rizobios

El secuenciamiento completo de los genomas de *Mesorhizobium loti* (Kaneko *et al.*, 2000), *S. meliloti* (Galibert *et al.*, 2001), y *Bradyrhizobium japonicum* (Kaneko *et al.*, 2002) así como los proyectos en proceso de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (www.sanger.ac.uk/Projects/R_leguminosarum/) y *R. etli* CFN42 (www.cifn.unam.mx/) permiten investigar la asociación *Rhizobium*-leguminosa desde el punto de vista del análisis genómico (Weidner *et al.*, 2003). Estos genomas difieren bastante en cuanto a su estructura (Tabla 1). En *M. loti* el genoma comprende un cromosoma y dos grandes plásmidos, en esta especie los genes simbióticos se localizan en una “isla” cromosómica de 611 kb. En *S. meliloti*, el genoma consiste en un cromosoma y dos megaplásmidos, denominados pSymA y pSymB, donde se encuentran la mayoría de los genes simbióticos (Hirsch *et al.*, 2001), mientras que en *Bradyrhizobium* solo hay un cromosoma de gran tamaño (9.1 Mb), y los genes de nodulación y fijación se encuentran en una región de 680 kb con bajo contenido G+C (Pühler *et al.*, 2004).

Las secuencias genómicas revelan una gran diversidad en los genes de fijación, el 35% de las proteínas predecibles en *M. loti* no tienen secuencias ortólogas en *S. meliloti*, mas aún la región de mayor diferencia entre los marcos de lectura identificados en *M. loti* y *S. meliloti* se encuentran en la isla simbiótica. Estos resultados sugieren que si bien existen genes conservados en el proceso de fijación, gran cantidad de genes se requieren específicamente para la interacción con diferentes hospedantes. Por otra parte, la distribución de los elementos de inserción (IS), la presencia de los elementos mosaicos intergénicos (RIMEs) y los porcentajes de G+C, permiten suponer que los dos megaplasmidos de *S. meliloti* fueron incorporados en forma independiente, siendo pSymA, el elemento adquirido, en términos evolutivos, mas recientemente (Galibert *et al.*,

2001). Estos datos acerca de la reestructuración del genoma de *S. meliloti*, al igual que el gran número de secuencias codificantes para transposasas encontradas en la región simbiótica del genoma de *Bradyrhizobium*, demuestran la gran plasticidad y dinámica de los genomas de los rizobios (Pühler *et al.*, 2004).

Tabla 1: Estructura genómica de las especies del género *Rhizobium*. Se presentan las especies de rizobios en las que se dispone la secuencia genómica completa.

Organismo	Genoma total (Mb)	Estructura genómica	tamaño(bp)
<i>B. japonicum</i> USDA110	9,1	Cromosoma	9 105 828
<i>M. loti</i> MAFF303099	7,6	Cromosoma	7 036 074
		Plásmido (pMLa)	351 911
		Plásmido (pMLb)	208 315
<i>S. meliloti</i> 1021	6,7	Cromosoma	3 654 135
		Megaplasmiendo pSymA	1 354 226
		Megaplasmiendo pSymB	1 683 333

A partir del secuenciamiento completo de los genomas, las técnicas de genómica funcional permiten identificar RNAm, proteínas y metabolitos que se expresan en forma diferencial en los procesos de infección y simbiosis (Weidner *et al.*, 2003). En *S. meliloti* se realizaron transcriptomas comparativos, usando macro y micro-arrays, en condiciones de vida libre vs. simbiosis y en condiciones de baja tensión de oxígeno (Becker *et al.*, 2004). En la misma especie, el análisis proteómico de nódulos, raíces, cultivos de bacterias y bacteroides, permitió identificar varias proteínas que se expresan en forma diferencial durante la interacción entre *S. meliloti* y *Melilotus alba*. Los resultados de estos análisis indican que existe una profunda alteración de la expresión genómica, tanto a nivel transcripcional como de proteínas, durante la diferenciación de la bacteria (Natera *et al.*, 2000; Becker *et al.*, 2004).

Familia Leguminosae

Los rizobios se asocian, casi en forma exclusiva, con especies de la familia Leguminosae, con excepción de la simbiosis entre *Rhizobium* y el arbusto *Parasponia* perteneciente a la familia Ulmaceae (Davey *et al.*, 1973).

Las leguminosas representan la tercera familia más numerosa de las angiospermas. Si bien se encuentra ampliamente distribuida, desde el trópico a zonas desérticas frías, su mayor diversidad se observa en áreas de topografía variada con climas estacionales (Polhill *et al.*, 1981). Es una familia de gran importancia económica tanto por su aporte a la FBN como por constituir el tercer grupo productor de alimentos luego de los cereales y las llamadas plantas tuberosas (FAO, 1998). Incluye especies cultivables como maní, poroto, alfalfa, soja, tréboles, así como plantas ornamentales y especies arbóreas utilizadas en la forestación en suelos degradados. Leguminosae se encuentra dividida en tres subfamilias, las plantas de la subfamilia basal, Caesalpinioideae, no son noduladoras en su mayoría, mientras que el 90% de las especies pertenecientes a las subfamilias restantes, Mimosoideae y Papilionoideae, forman nódulos. De acuerdo a la distribución del evento, la nodulación se pudo originar múltiples veces en forma independiente dentro de la familia o alternativamente existe un único origen con múltiples pérdidas posteriores (Doyle, 1998; Hirsch *et al.*, 2001). De acuerdo con estudios filogenéticos basados en el gen cloroplástico *rbc*, las plantas actinorrhizas y las leguminosas pertenecen a un linaje común, el grupo Rosid I (Soltis *et al.*, 1995), lo que afianza la teoría de un origen común para la predisposición a nodular. Existen además conexiones en las etapas tempranas de los procesos de micorrización y nodulación, como es el caso de la expresión de los genes ENOD en ambos simbiosites, que llevan a suponer que la nodulación pudo haber evolucionado a partir de un único ancestro endomicorrízico (Hirsch *et al.*, 2001).

Phaseolus vulgaris: Importancia del cultivo en la Argentina

La tribu de las leguminosas *Phaseoleae* comprende el mayor número de géneros y a las leguminosas económicamente más importantes (Polhill, 1981). Dentro del género *Phaseolus* se conocen cerca de 50 especies de las cuales muy pocas, *P. vulgaris*, *P. coccineus*, *P. acutifolius*, *P. polyanthus*, y *P. lunatus* son

especies domesticadas (Martínez-Romero, 2003). *P. vulgaris* (poroto común) es una de las especies más cultivadas dentro del género, y la de mayor importancia para el consumo humano. Su producción total mundial excede los 23 millones de toneladas métricas, de las cuales siete millones corresponden a la producción en América del Sur y África. La importancia del cultivo se pone de relieve en la formación reciente de un consorcio internacional denominados “Phaseomics”, tendiente a combinar técnicas de genómica estructural y funcional, caracterización de variedades seleccionadas y estudios de genética evolutiva del cultivo, con el objeto final de lograr variedades de poroto más resistentes a diferentes estreses ambientales así como con mayor capacidad productiva (Broughton *et al.*, 2003).

El poroto es originario de América, con dos centros independientes de domesticación situados en Mesoamérica y la región andina de América del Sur, norte de Perú, Ecuador y el Noroeste de la Argentina (Gepts y Debouck, 1991). El noroeste argentino es uno de los reservorios de variedades silvestres de poroto, constituyendo además, la región productora de 90% del cultivo en nuestro país. Actualmente, los rendimientos en la región se encuentran por debajo de su potencial, no más de 1100 Kg por hectárea (FAO, 2004), lo que se atribuye en mayor medida a los suelos poco fertilizados.

La asociación simbiótica con los rizobios es un recurso utilizado ampliamente para mejorar la producción del poroto (Martínez-Romero, 2003). Debido que la nodulación por cepas nativas es poco eficiente, se ha intentado mejorar la producción utilizando la práctica de inoculación con rizobios, encontrándose que las cepas nativas son altamente competitivas (Aguilar *et al.*, 2001).

Especificidad de reconocimiento mutuo en la interacción rizobios-leguminosas

El sistema clásico para definir las asociaciones características entre rizobios y leguminosas es el de grupos de inoculación cruzada, consistente en agrupar a los rizobios por su capacidad de nodular un cierto grupo de plantas leguminosas (tabla 2). Existen cepas de rizobios adaptadas a un cultivar en particular, como es el caso de la cepa *R. leguminosarum* bv. *trifolii* TA1 capaz de nodular únicamente *T. subterraneum* cv Woogenellup (Lewis-Henderson y

Djordjevic, 1991). Por el contrario, en algunas especies el rango de hospedante no es acotado, un ejemplo es la cepa *Rhizobium* NGR234 capaz de nodular 112 géneros de leguminosas (Pueppke y Broughton, 1999). Si bien la promiscuidad simbiótica existe en diversas leguminosas, el mayor grado se observa en enredaderas anuales de la tribu Phaseolae, incluyendo las especies *Macroptilium atropurpureum*, *Lablab purpureus* y *P. vulgaris* (Perret *et al.*, 2000).

Tabla 2: Grupos de inoculación cruzada (adaptado de Perret *et al.*, 2000)

Especies Bacterianas	Leguminosas hospedantes
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Neptunia natans</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i> , <i>S. punctata</i>
<i>B. elkani</i> , <i>B. japonicum</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>Glicine max</i> , <i>G. soja</i> , <i>Vigna</i>
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus</i> spp.
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus</i> spp.
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Mimosa affinis</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega</i> spp.
<i>Rhizobium gallicum</i> , <i>R. giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium hainanense</i>	<i>Stylosanthes</i> , <i>Centrosema</i> , <i>Desmodium</i> , <i>Tephrosia</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
bv. <i>phaseolus</i>	<i>Phaseolus</i> spp.
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.
bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Lathyrus</i> spp., <i>Vicia</i> spp.
<i>Rhizobium mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>P. vulgaris</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Macroptilium</i> spp., <i>Vigna unguiculata</i> , <i>Medicago ruthenica</i> .
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glicine max</i> , <i>Vigna</i>
<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Medicago</i> spp.
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> , <i>Trigonella</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Sesbania</i> spp.
<i>Sinorhizobium terangaie</i>	<i>Sesbania</i> , <i>Acacia</i>

Rhizobium tropici

Hasta la fecha, se han descrito cinco especies nodulantes de poroto pertenecientes al género *Rhizobium*: *Phaseolus vulgaris*- *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Jordan, 1984), *R. tropici* (Martínez-Romero *et al.*, 1991) *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993), *R. gallicum* y *R. giardini* (Amarger *et al.*, 1997). Los simbiosomas de poroto componen un grupo taxonómicamente heterogéneo, integrado por dos linajes de ADN ribosomal 16S, con distintos rangos de hospedantes y características genéticas diferentes en los genes *Sym* (Amarger *et al.*, 1997). Sin embargo, de acuerdo con la filogenia basada en el análisis de los genes *nodC* y *nifH*, la capacidad de nodular poroto parece estar determinada por un grupo de genes de nodulación muy relacionados entre sí (Laguerre *et al.*, 2001).

La especie *Rhizobium tropici*, originaria de las regiones tropicales de América del Sur, fue propuesta como una nueva especie, en base a sus características distintivas a nivel molecular y a nivel fisiológico, a partir de la reclasificación del grupo II de *R. leguminosarum viciae*. Los aislamientos pertenecientes a este grupo se distinguen del tipo I por presentar las siguientes características: poseen una copia única del gen *nifH*, sus plásmidos simbióticos son genéticamente estables en condiciones de estrés y confieren la capacidad de fijar nitrógeno al ser transferidos a *Agrobacterium tumefaciens*, su rango de hospedante incluye *Leucaena leucocephala*, no hibridan con el gen *psi* (inhibición polisacárido) y poseen exopolisacáridos con estructura y composición química diferente.

Dentro del grupo II, *R. tropici*, se distingue claramente del resto de las especies nodulantes de poroto de acuerdo a los resultados del análisis de homología DNA-DNA total, el patrón de electroforesis de multilocus enzimático y la secuencia parcial de los genes ribosomales 16S. Son bacterias resistentes al ácido nalidíxico, capaces de crecer en suelos ácidos (pH hasta 4.5) y a temperaturas de hasta 40°C. De acuerdo a la filogenia construida a partir de las características fenotípicas generales (Tabla 3), las cepas de la especie se agrupan en dos clados, tipo IIA y tipo IIB (Martínez-Romero *et al.*, 1991).

Tabla 3: Características fenotípicas de los clados A y B definidos para la especie *R. tropici* (adaptado de Martínez-Romero, 2003)

Características	tipo A	tipo B
Morfología de la colonia en medio YEM	blancas y opacas	traslúcidas
Crecimiento en medio PY	requiere calcio	no requiere calcio
crecimiento en LB	-	+
motilidad	-	+
máxima temperatura de crecimiento	37°C	40°C
tolerancia a la acidez (pH 4.5)	+	+
tolerancia a metales pesados y a concentraciones salinas altas	-	+
Inducción del factor Nod por genisteína	+	-
Presencia de un plásmido de 200 kb	+	-
Presencia de los genes <i>teu</i> (asimilación de exudados de poroto) en plásmidos pSym	+	-

La cepa modelo del grupo IIB, *R. tropici* CIAT 899, fue originalmente aislada de suelos ácidos de Brasil y Colombia (Martínez-Romero *et al.*, 1991). Esta cepa, además de compartir las características descritas anteriormente para la especie, es intrínsecamente tolerante a metales pesados (Ni, Pb, Co, Cu, Ar y Cr), a concentraciones altas de sales, así como a diversos antibióticos como cloramfenicol, espectinomicina, carbenicilina y estreptomina (Graham *et al.*, 1982). Posee un amplio rango de hospedantes, siendo capaz de nodular, con diferentes grados de efectividad, tanto plantas leñosas (*Albizia lebbbeck*, *Gliricidia maculata*, *Gliricidia sepium*, *Leucaena leucocephala* y *Sesbania exaltata*) como herbáceas de distintos hábitos: forrajeras rastreras (*Desmodium canadense*), trepadoras (*haseolus vulgaris*, *Vigna vexillata* y *Macroptillum atropurpureum*), de hábito semi-erecto (*Vigna umbellata*, *Desmanthus illinoensis*, *Lotus corniculatus*), y plantas herbáceas erectas (*Crotalaria sericia* y *Vigna unguiculata*)

(Hernandez-Lucas *et al.*, 1995). Por otra parte, esta especie es capaz de asociarse endofíticamente actuando como bacteria PGPR no fijadora de nitrógeno. Así, las bacterias de *R. tropici* inoculadas en plantas de maíz, colonizan la corteza interna de la raíz en forma muy competitiva al igual que algunas cepas de *R. etli*, especie naturalmente endofítica de este cultivo. La inoculación con rizobios produce un aumento en la altura de las plantas de maíz hasta en un 50%, no encontrándose sin embargo actividad de reducción de acetileno en las plantas inoculadas (Rosenblueth y Martinez-Romero, 2004).

EL PROCESO SIMBIÓTICO

La interacción entre *Rhizobium* y las leguminosas es un proceso complejo, que requiere la inducción coordinada de nuevos programas de desarrollo por parte de los simbioses. La asociación se inicia con un reconocimiento específico, por parte de la bacteria y la planta, basado en el intercambio y percepción de señales que tiene lugar en la rizósfera (Niner y Hirsch, 1998). Este reconocimiento es el primero de los múltiples pasos que involucra el proceso de simbiosis, el cual culmina con la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en la raíz de la planta.

El intercambio de señales moleculares entre la planta y la bacteria inicia el proceso simbiótico

En los estadios iniciales del proceso infectivo los rizobios reconocen la presencia del hospedante sensando diversos compuestos del exudado radicular: aminoácidos, azúcares, ácidos orgánicos, y compuestos fenólicos como flavonoides e isoflavonoides. Estos compuestos actúan como quimioattractantes y estimulan la multiplicación de la población rizobiana (Sadowsky y Graham, 1998). Los flavonoides son específicamente reconocidos por el factor de transcripción NodD de la bacteria, el cual induce la transcripción de los operones *nod*. Los productos de estos genes sintetizan y transportan la molécula clave en la señalización de la interacción simbiótica, el factor Nod (Spaink y Lugtenberg, 1994). El reconocimiento de esta molécula por la planta induce la formación de las estructuras de infección y los primeros estadios de formación del nódulo (Figura 1). Además, este factor es capaz de inducir la vía de síntesis

de flavonoides en la planta estableciendo un sistema de retroalimentación positivo (Bladergroen y Spaink, 1998).

Los factores Nod son quitooligosacaridos de bajo peso molecular constituidos por una sucesión de residuos (3-5) de β -1,4 N-acetil-D-glucosamina, los cuales portan un ácido graso en el extremo no reducido (Figura 1). Cada especie de *Rhizobium* produce un conjunto de factores Nod con diferentes modificaciones (acetilación, fucosilación, sulfatación) en los extremos de la molécula. La especificidad de la interacción rizobio-leguminosa esta determinada por el reconocimiento específico de dicha estructura y por la naturaleza de la señal fenólica de la planta (Schultze y Kondorosi, 1998). En las especies *R. tropici*, *R. etli* y *R. gallicum* bv. *phaseoli* la actividad de los transportadores ABC específicos para la asimilación de los exudados de poroto es importante para el reconocimiento temprano en la interacción con esta leguminosa (Rosenblueth *et al.*, 1998). Se han comparado los diferentes factores Nod de los rizobios nodulantes de poroto, encontrándose una población de moléculas muy heterogénea (Laeremans y Vanderleyden, 1998). La especie *R. tropici* sintetiza factores pentaoligosacáridos metilados, agrupados como hidrofílicos, los que contienen un grupo sulfato, o factores neutrales por carecer de esta modificación (Poupot *et al.*, 1993). La metilación del factor, mediada por la actividad de la proteína NodS, es determinante en el rango de hospedante de *R. tropici*, observándose que los mutantes NodS⁻ de esta especie son deficientes en la nodulación de las leguminosas *Phaseolus vulgaris* y *Leucaena leucocephala* (Waelkens *et al.*, 1995).

A nivel genómico, se ha caracterizado la región del plásmido pSym que contiene los genes comunes de nodulación *nodABC* y uno de los alelos *nodD* en *R. tropici*. La especie posee cuatro copias de este gen, si bien solo en uno se observa la actividad de inducción de la transcripción (van Rhijn *et al.*, 1993). Por otra parte, el gen *nodA* considerado como funcionalmente conservado entre los rizobios (Kondorosi *et al.*, 1984) no es funcionalmente equivalente entre las especies *S. meliloti* y *R. tropici* y la variación alélica observada en esta ultima especie contribuye al reconocimiento en los diferentes hospedantes (Debellé *et al.*, 1996).

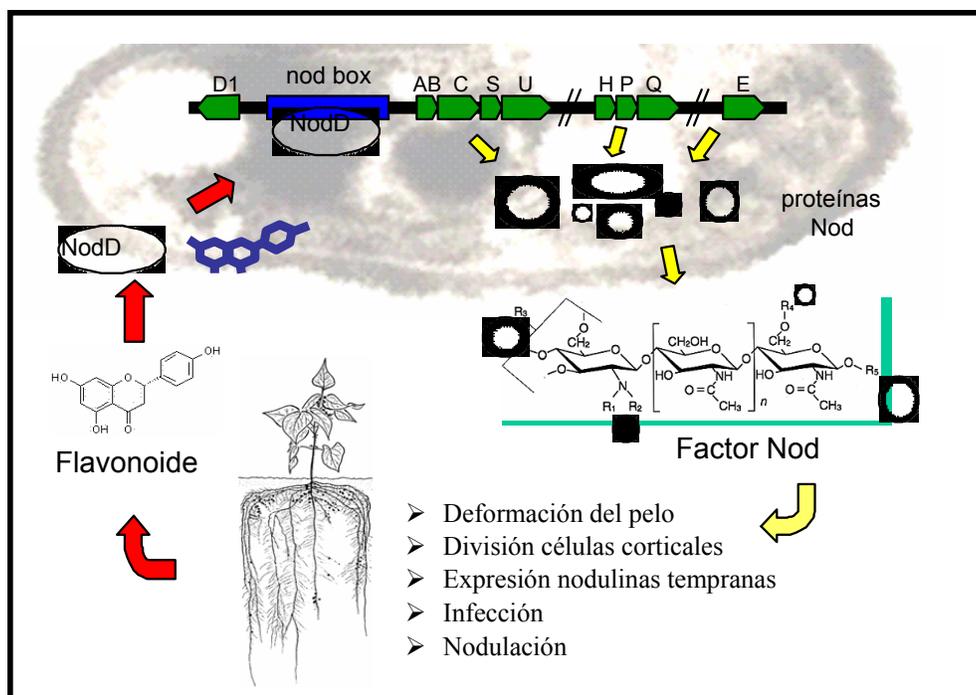


Figura 1: Intercambio de señales durante la interacción simbiótica. Los flavonoides presentes en el exudado radicular en conjunción con el activador transcripcional NodD inducen la expresión de los genes *nod*, los cuales codifican para las proteínas responsables de la síntesis y transporte del factor Nod. En la planta, la percepción de esta molécula señal induce una serie de respuestas que inician el proceso de infección y la formación del nódulo.

La percepción y traducción del factor Nod

La presencia del factor Nod es percibida en primera instancia por las células epidérmicas en la región de los pelos emergentes, esto es, en la zona susceptible a la infección. Los estudios de electrofisiología y microscopía demuestran que el factor induce en pocos segundos, la entrada de Ca^{2+} y la depolarización transiente de la membrana asociada a la salida de Cl^- y K^+ . Estos cambios son seguidos por la alcalinización del citoplasma y, luego de unos pocos minutos, de la oscilación periódica de Ca^{2+} en la región perinuclear (Ehrhardt *et al.*, 1996). En forma subsiguiente, se observa el rearrreglo de los filamentos de actina que originan el engrosamiento y la redirección del crecimiento en la punta del pelo radicular, la inducción de los denominados genes de expresión temprana

(ENOD, early nodulin genes) y la reactivación de la división mitótica de las células corticales (Truchet *et al.*, 1991).

Estudios genéticos y fisiológicos sugieren que existen dos niveles de percepción del factor Nod, una entrada específica que reconoce las modificaciones de cada especie de factor, permitiendo la invasión de las bacterias en el pelo radicular, y un segundo nivel de reconocimiento menos específico que media la deformación del pelo radicular y la división de las células corticales (Ardourel *et al.*, 1994). Si bien actualmente no se conoce la naturaleza exacta y el número de los receptores involucrados en estos reconocimientos, el análisis de mutantes en las leguminosas *Medicago truncatula*, *M. sativa*, *Lotus japonicus* y *Pisum sativa* ha permitido la identificación de una familia de receptores, capaces de iniciar las respuestas mediadas por la presencia del factor Nod. (Stracke *et al.*, 2002; Endre *et al.*, 2002; Radutoiu *et al.*, 2003; Ané, 2004; Lévy, 2004). Varios de los componentes descriptos para la vía de traducción del factor Nod controlan además la señalización en el proceso de micorrización. De acuerdo a los modelos de regulación propuestos actualmente, ambos procesos parecen estar regulados por múltiples componentes que incluyen entre otros, proteínas con dominios extracelulares LysM de unión a peptidoglicanos posiblemente responsables del reconocimiento directo del factor NoD (NFR1 y NFR5), serina/treonina kinasas que activan la cascada de señalización de la nodulación en las células (SyRM, NOR, DMI2), proteínas de canales iónicos (DMI1), proteínas de unión a Calmodulina (DMI3), y las proteínas G y fosfolipasa C, probablemente implicadas en la oscilación de calcio (Riely *et al.*, 2004).

Infección y formación del nódulo

En los rizobios, los procesos de infección y formación del nódulo ocurren en forma simultánea. Teniendo en cuenta la gran variedad de mecanismos de infección que existen (Sprent, 1992), se describe a continuación la vía de infección más común en las leguminosas y los eventos tempranos de formación del nódulo.

En la mayoría de los sistemas de nodulación estudiados, la entrada de los rizobios se realiza a través de los pelos radiculares. La adhesión de los rizobios a

la raíz, consta de dos etapas, primeramente se observa una unión lábil mediada por las ricadesinas bacterianas (Smit *et al.*, 1989). Mas tarde, la unión se torna específica principalmente por la intervención de dos tipos de proteínas, las lectinas, sintetizadas por las leguminosas, que parecen tener un papel importante en el contacto inicial y en el reconocimiento específico del huésped (Hirsh, 1999), y las fibrinas de celulosa bacterianas que conforman un biofilm alrededor del pelo radicular (Gage, 2004).

En respuesta a la adhesión bacteriana se produce la curvatura de los pelos en la región de la raíz susceptible a la infección (Figura 2). En esta cavidad, en la cual quedan atrapados los rizobios, la pared de la célula comienza a degradarse, originando una entrada para la infección, mientras una nueva estructura tubular, denominada hilo de infección, se origina por la invaginación de la membrana plasmática y crece por la deposición de pared celular dada por el aporte coordinado de ambos simbioses (Gage, 2004). El hilo, conteniendo las bacterias, crece hacia la base del pelo, y subsecuentemente se ramifica, en diferentes grados, a medida que se dirige al córtex radicular (Stougaard, 2000). Previo a la llegada del hilo, en la región opuesta al protoxilema, las células corticales se desdiferencian y se reactiva la división celular, formándose de esta manera el primordio nodular. Posteriormente, las bacterias presentes en el hilo son liberadas por un proceso de endocitosis en las células del primordio, comenzando el proceso de diferenciación bacteriana (Oke y Long, 1999^a).

Nódulos de crecimiento determinado e indeterminado

Actualmente, se asume que las características de infección y el patrón de formación del nódulo esta determinado por la planta hospedante (Kijne, 1992). Si bien las estructuras nodulares comparten características anatómicas e histológicas básicas, existen dos sistemas diferentes de organogénesis, los nódulos determinado e indeterminado. Las principales diferencias entre estos sistemas se encuentran relacionadas con el origen de las células que reasumen las divisiones celulares y con la diferenciación en el nódulo maduro.

En la figura 2 se presenta un esquema comparativo del proceso de organogénesis en ambos tipos de nódulos.

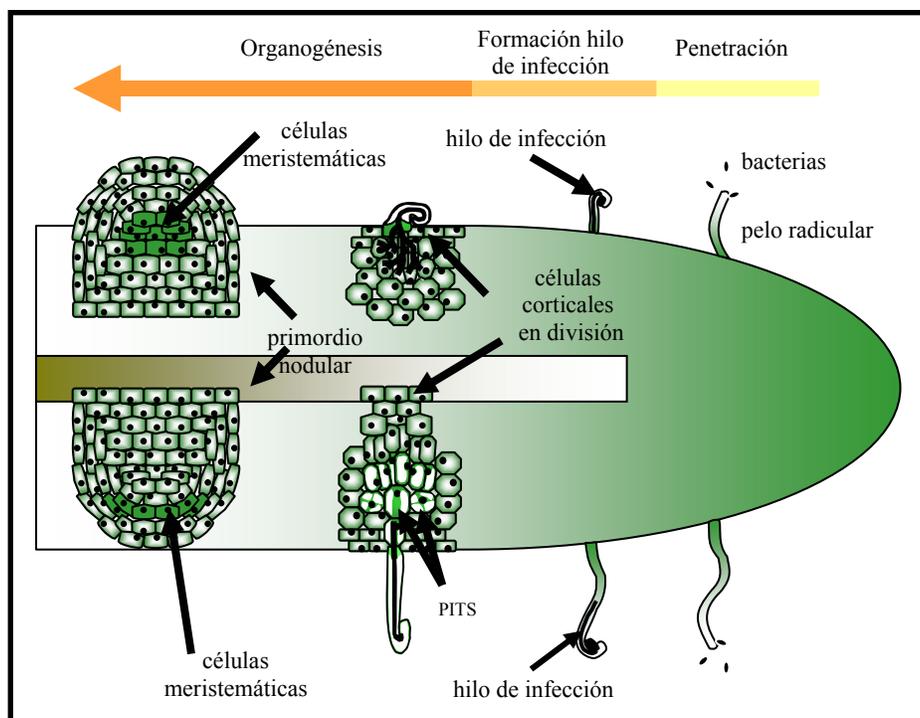


Figura 2: Principales eventos de infección y organogénesis. Se esquematizan los diferentes cambios morfológicos que se observan en la raíz y que conducen a la formación del nódulo determinado (panel superior) e indeterminado (panel inferior).

En los nódulos indeterminados, el primordio inicia su formación por la reactivación de las células corticales internas y el nódulo maduro se caracteriza por tener un meristema apical persistente que da origen a tejidos con diferentes grados de desarrollo (Hadri *et al.*, 1998). En este sistema, las células corticales externas también se activan, formando estructuras pre-infectivas, denominadas puentes citoplasmáticos o hilos preinfectivos (PITS) (Figura 2 panel inferior). Estas estructuras consisten en columnas de forma cónica radialmente orientadas en el citoplasma y su formación es esencial para la nodulación efectiva en los nódulos indeterminados (Kijne, 1992). Para llegar al primordio, el hilo de infección, atraviesa estas células avanzando a través del eje de los puentes y su crecimiento es acompañado por modificaciones de la pared celular (van Spronsen *et al.*, 2001). En los eventos de inicio y crecimiento del hilo infectivo, los componentes de membrana bacteriana como lipopolisacáridos, exopolisacáridos y polisacáridos capsulares cumplen un rol activo, si bien el

mecanismo de acción en algunos casos no está dilucidado (Gage, 2004). Al llegar al primordio nodular, el hilo de infección se localiza en la zona contigua al meristema, y forma una red ramificada que penetra las células en la zona de infección (Gage, 2004).

Las plantas que forman este tipo de nódulos, son principalmente leguminosas de clima templado, como los géneros *Medicago*, *Trifolium* y *Vicia*. A nivel molecular, los factores Nod que inducen la nodulación en estas plantas se distinguen por presentar ácidos grasos poli-insaturados, mientras que los rizobios que inducen nódulos determinados portan ácidos grasos saturados o monoinsaturados (Kamst *et al.*, 1998). Recientemente se encontró que la adición de ácido salicílico, el cual interfiere en la señalización de las oxilipinas, inhibe la nodulación en los sistemas indeterminados por lo que se especula que los ácidos grasos poli-insaturados actúan como moléculas de reconocimiento mediante la conversión a oxilipinas (van Spronsen, 2003).

En el sistema determinado el nódulo se caracteriza por poseer un meristema esférico central que origina una estructura globosa. En el nódulo maduro el meristema no es evidente y las divisiones celulares cesan, por lo que el crecimiento se produce a expensas de la expansión celular. Las plantas que originan estos nódulos pertenecen a géneros de clima sub-tropical a tropical, tales como *Phaseolus*, *Glicine*, *Sesbania* y *Lotus*. En estas plantas, la presencia del rizobio, induce el encurvamiento del pelo apenas este emerge, por lo que el hilo de infección se inicia en la base del mismo (Hadri *et al.*, 1998). En forma simultánea se produce la división en células de la corteza externa, ubicadas en la vecindad de la región infectiva, para iniciar la formación del primordio nodular (Figura 2 panel superior). Mas tarde, la actividad de las células del periciclo y de la corteza se reactiva, originando los haces vasculares del nódulo (van Spronsen, 2001). El centro del primordio es infectado rápidamente por el hilo de infección principal. De acuerdo con observaciones citológicas recientes, se propone que el mecanismo de invasión continúa con el crecimiento del hilo y la ramificación del mismo, primero en ramas intercelulares y posteriormente en ramas intracelulares que penetran las células de la periferia del nódulo en múltiples direcciones (Cermola *et al.*, 2000).

Endocitosis y diferenciación de la bacteria

Los rizobios que colonizan el nódulo se diferencian a un tipo diferente de célula, denominado bacteroide, el cual es capaz de fijar nitrógeno. La transformación comienza luego de la liberación de las bacterias en el citoplasma celular por un proceso semejante a la endocitosis (Oke y Long, 1999^a). La ultraestructura de este proceso ha sido estudiado en numerosos rizobios (Figura 3.). El hilo de infección crece hasta alcanzar las células del primordio, en este momento la síntesis de la pared celular del hilo de infección se detiene, y el extremo del hilo queda rodeado por la membrana plasmática. Esta región se agranda por la continua fusión de vesículas derivadas del Golgi. Las bacterias en el interior son envueltas por la membrana de la célula vegetal y mas tarde esta estructura se independiza formando una unidad peribacteroidal o simbiosoma (Verma y Hong, 1996).

Luego de la liberación, la diferenciación de la bacteria puede seguir dos patrones de desarrollo diferentes entre si. En los nódulos indeterminados, los bacteroides son liberados a células de la región infectiva las cuales han detenido su división y por ende las bacterias liberadas al citoplasma se dividen una o dos veces antes de la diferenciación. En estos nódulos los simbiosomas son en general unibacteroidales, si bien incrementan varias veces su tamaño (*S. meliloti*) y sufren cambios de morfología, asumiendo formas distorsionadas (*R. leguminosarum trifolii*) (Vasse *et al.*, 1990). En contraste, en los nódulos determinados las células infectadas se encuentran en división activa, por lo cual las bacterias liberadas sufren varios ciclos de división antes de la diferenciación (Oke y Long, 1999^a). En estos nódulos, los simbiosomas multibacteroidales son frecuentes, y los bacteroides conservan su tamaño original. Se ha observado que uno de los mecanismos de origen de estas estructuras múltiples es la fusión de simbiosomas jóvenes (Cermola *et al.*, 2000).

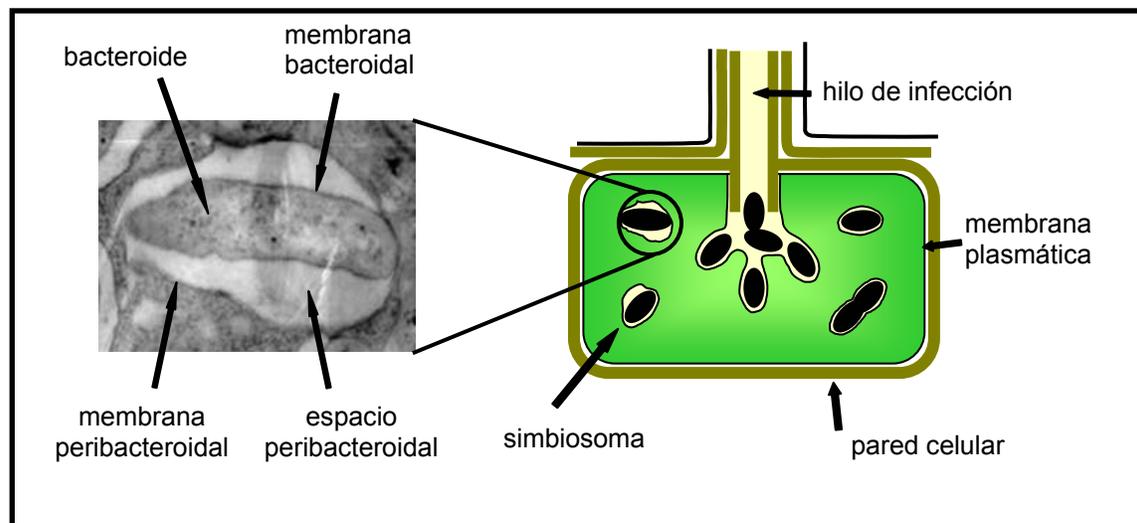


Figura 3: Endocitosis de las bacterias en las células del nódulo. Las bacterias presentes en el hilo de infección son liberadas al citoplasma vegetal en un proceso similar a la endocitosis. Luego de la liberación al interior de la célula, los bacteroides conforman una unidad bacteroidal o simbiosoma, el cual puede estar formado por uno o mas bacteroides. En el panel de la izquierda se presenta la micrografía electrónica de un simbiosoma de *R. tropici*.

Durante el desarrollo del nódulo, las células infectadas incrementan su volumen, lo que permite que el número de simbiosomas aumente, ocupando la mayoría del citoplasma celular. (Verma y Hong, 1996). La estructura nodular presenta, acorde a estudios de ultraestructura, zonas con distintos grados de desarrollo en las cuales los bacteroides se encuentran en progresivos estados de diferenciación: jóvenes en división, en proceso de diferenciación, fijadores y finalmente senescentes (Figura 4). En los nódulos indeterminados de forma alargada, las regiones presentan grados de desarrollo mas avanzado a medida que se alejan del ápice meristemático (Vasse *et al.*, 1990). Recientemente se ha determinado, mediante observaciones histológicas, que en los nódulos determinados existe un componente espacial de desarrollo. Durante la organogénesis se observan dos regiones con diferentes grados de diferenciación, la región periférica y la central. En la región periférica se localizan, principalmente, células pequeñas con pocos simbiosomas los cuales presentan

en general bacteroides no diferenciados. Desde la periferia al centro se observa un gradiente de células en progresivo desarrollo. La región central del nódulo en desarrollo se encuentra formada por células completamente infectadas, con simbiosomas diferenciados y en general multibacteroidales. Finalmente, los primeros signos de senescencia, evidenciados por la lisis de las células infectivas, se observan en la región central del nódulo maduro (Patriarca *et al.*, 2002).

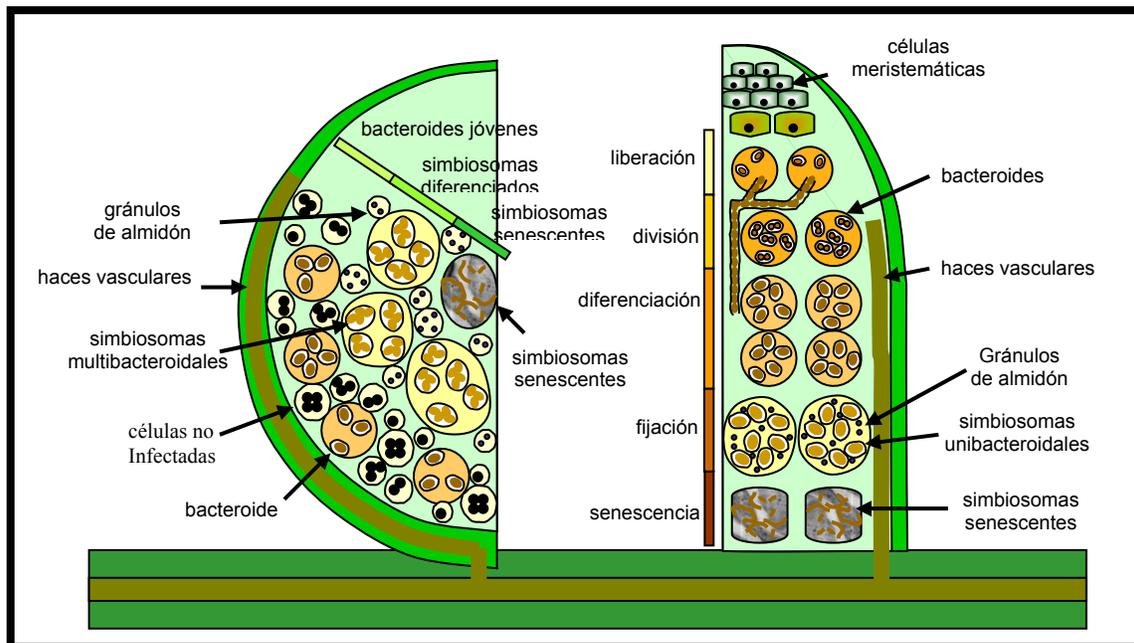


Figura 4: Estructura general de un nódulo maduro. Se indican las zonas con diferentes grados de desarrollo descritas en los nódulos determinados (panel de la izquierda) e indeterminados (panel de la derecha). Modificado de Patriarca *et al.*, 2002.

Funcionamiento del nódulo

El proceso de diferenciación descrito anteriormente, culmina con la formación de bacterias que detienen su división y son capaces de sintetizar los componentes necesarios para la fijación y exportación del nitrógeno a la célula

vegetal. A continuación se describen los componentes principales implicados en el proceso y algunos de los procesos metabólicos lo condicionan.

Fijación de nitrógeno

En párrafos anteriores se describió estructuralmente el complejo nitrogenasa. Esta enzima cataliza la reducción del nitrógeno atmosférico a amonio, acoplada a la hidrólisis de ATP. Si bien algunos autores proponen que la estequiometría de la reacción no está determinada en forma concluyente (Rees y Howard, 2000), en la actualidad se expresa según la siguiente ecuación:



El inicio del proceso de fijación es diferente acorde al tipo de nódulo formado. La reducción de nitrógeno en el sistema indeterminado se inicia cuando los bacteroides se encuentran completamente diferenciados, por lo cual la actividad de la enzima es evidente en la región III del nódulo (Soupene *et al.*, 1995). En el sistema determinado la fijación se observa en etapas tempranas de la liberación. Así, en nódulos de soja, la actividad nitrogenasa se detecta en nódulos jóvenes en los cuales la mayoría de los bacteroides se encuentran en división activa (Patriarca *et al.*, 2002).

El complejo nitrogenasa es capaz de reducir sustratos alternativos que presentan triples enlaces en posición terminal, moléculas pequeñas como el acetileno, el cianuro y azidas, los cuales actúan como inhibidores no competitivos de la reducción de nitrógeno. La reducción de acetileno a etileno se utiliza comúnmente como medida de la actividad de la enzima (Turner y Gibson, 1980).

Metabolismo de carbono

La reducción de nitrógeno requiere gran cantidad de energía la cual es aportada por los productos de la fotosíntesis de la planta. Por lo tanto, la asimilación del carbono es un elemento central en el proceso de fijación. Los fotosintatos entran al nódulo en forma de sacarosa, la cual es metabolizada por la enzima fosfoenolpiruvato decarboxilasa (PEPC) en ácidos dicarboxílicos

(fumarato, succinato o L-malato) para poder ser utilizados por las enzimas del ciclo de Krebs. Estos ácidos son incorporados al bacteroide mediante el sistema de transporte *dct* presente en la membrana bacteroidal. Dentro del bacteroide, el malato es oxidado a piruvato, el cual puede ser aminado a alanina o convertido a acetil-CoA. La coenzima ingresa al ciclo del ácido tricarboxílico para generar poder reductor o alternativamente se utiliza para la síntesis de polihidroxitiratos (Poole y Allaway, 2000). La presencia de gránulos de reserva como polihidroxitiratos o de glicógenos es numerosa en los nódulos determinados (Patriarca *et al.*, 2002). Los mutantes de las especies *R. etli* y *R. tropici* afectados en la síntesis de estos gránulos de reserva muestran una actividad de nitrogenasa aumentada, lo que indica una competencia por el poder reductor entre la nitrogenasa y las estructuras de reserva (Cevallos *et al.*, 1996, Marroqui *et al.*, 2001).

Oxígeno: mecanismos de protección

La actividad de la nitrogenasa es altamente sensible a la presencia de oxígeno. El control estricto de la tensión de oxígeno en el nódulo permite, por una parte, mantener el flujo energético a través de la respiración, aerobia en los rizobios, protegiendo además la actividad enzimática. Este control comprende varios mecanismos, uno de los principales es la barrera física en la corteza interna del nódulo que impide la difusión de oxígeno al interior del mismo manteniendo una concentración no mayor de 30nM. Otro elemento de control de la disposición de oxígeno es la proteína hémica leghemoglobina. Esta nodulina tardía, abundante en las regiones fijadoras del nódulo, es responsable de mantener los niveles bajos de oxígeno libre y posibilitar el transporte de este elemento a los bacteroides diferenciados (Hunt y Layzell, 1993; Crespi y Galvez, 2000).

Como resultado de los mecanismos de control, la tensión de oxígeno en el bacteroide es baja, por ende la simbiosis requiere una cadena respiratoria de alta afinidad. La citocromo terminal oxidasa *cbb3*, codificada por el operón bacteriano *fixNOQP*, es descrita como una de las citocromos oxidasas que actúan en la simbiosis (Soberon *et al.*, 1997).

El nitrógeno como regulador de la fijación

El nitrógeno es a la vez el producto y el regulador principal en el proceso de fijación. En vida libre, los rizobios son capaces de asimilar este elemento en diferentes formas: amonio, nitratos, nitritos y aminoácidos. Durante la simbiosis, la presencia de nitrógeno combinado en bajas concentraciones favorece el proceso, aumentando la velocidad de crecimiento de las plántulas e incrementando el número y eficiencia de los nódulos. Por el contrario, la presencia de nitrógeno en concentraciones altas incide negativamente tanto en la nodulación, reduciendo el número de sitios infectivos y el desarrollo del nódulo, así como en el funcionamiento del nódulo (Zahran, 1999). El nitrógeno combinado inhibe la actividad de la nitrogenasa, esta acción puede ser indirecta a través de la conversión a glutamina o mediante la regulación del aporte de oxígeno o carbono por la planta (Streeter, 1988). Asimismo, el amonio o nitrato actúan disminuyendo la síntesis de la enzima. La proteína NifA activa la transcripción de los genes *nif* encargados de la síntesis de la nitrogenasa. En la especie *S. meliloti*, la expresión del gen *nifA* depende del sistema de dos componentes FixL-FixJ y es regulado negativamente por el amonio a través del sensor FixL (Noonan *et al.*, 1992).

Por ende, en los rizobios la fijación y asimilación de nitrógeno no son procesos simultáneos, siendo esencial la regulación negativa de la asimilación de nitrógeno durante la diferenciación del bacteroide, previo o durante el comienzo del proceso de fijación (Patriarca *et al.*, 2002). Por otra parte, el amonio producido en los nódulos normales actúa como señal sistémica que inhibe el inicio de nuevos sitios de infección en la raíz (Streeter, 1988). Así, se ha observado en diferentes especies bacterianas que los mutantes afectados en su capacidad de fijar efectivamente (Fix⁻), presentan mayor número de nódulos comparado con una nodulación normal (Hirsch *et al.*, 1983; Newman *et al.*, 1994; Djordjevic *et al.*, 1996; Riccillo *et al.*, 2002).

Exportación de Nitrógeno

A diferencia de los diazotrofos libres, los rizobios liberan la mayor parte del nitrógeno fijado para ser utilizado por las células de la planta. La forma de exportación, orgánica o inorgánica, y el mecanismo de transporte es discutido

actualmente. Los ensayos *in vitro* realizados con simbiosomas aislados difieren en los productos exportados. Los compuestos nitrogenados secretados son principalmente el amonio y/o el aminoácido alanina, dependiendo de las condiciones del ensayo (ej. concentración de amonio, densidad de bacteroides) y de la especie bacteriana en estudio (Waters *et al.*, 1998; Poole y Allaway, 2000). Por otra parte, se propone que el glutamato integra un ciclo de intercambio de aminoácidos entre la bacteria y las células vegetales en nódulos de arveja (Lodwig *et al.*, 2003). De acuerdo con esta hipótesis, la planta provee al bacteroide de glutamato, junto a los dicarboxilatos. El glutamato induce la transaminación del oxalacetato o piruvato para la producción de aspartato y alanina respectivamente. Estos aminoácidos son exportados junto al amonio para la síntesis de asparagina en la célula vegetal.

Con respecto a los mecanismos de transporte, se ha propuesto que los nitratos difunden pasivamente a través de la membrana peribacteroidal para ser convertidos a amonio en el espacio peribacteroidal (Udvardi y Day, 1997). Los compuestos nitrogenados, amonio o nitrato, son secretados fuera del simbiosoma por canales específicos presentes en la membrana peribacteroidal (Tyerman *et al.*, 1995; Mouritzen *et al.*, 1997). En el citoplasma celular el amonio es rápidamente asimilado por el sistema GS-GOGAT, glutamino sintetasa y glutamato sintasa, ruta principal de la asimilación de nitrógeno en la planta (Schubert, 1986).

El producto de la fijación transportado fuera del nódulo depende de la especie hospedante. En las plantas de clima templado, los productos de transporte son principalmente asparagina y glutamina. Al considerar las leguminosas de clima tropical, los mayores solutos transportados son los ureidos: alantoína y ácido alantoico. En estas plantas los aminoácidos producidos por la fijación de nitrógeno son incorporados a la síntesis *de novo* de las purinas y posteriormente degradados por la vía de oxidación mediada por la enzima xantina deshidrogenasa. Como resultado, en estos nódulos se observa la inducción de los genes de la planta implicados en el metabolismo de las purinas (Atkins *et al.*, 1997; Smith y Atkins, 2002).

Genes participantes en la interacción simbiótica

En la sección anterior se describe la secuencia de eventos que componen el proceso simbiótico y algunos mecanismos moleculares implicados. Cada uno de estos eventos es dirigido por la acción coordinada, en espacio y tiempo, de la expresión génica de ambos simbioses (Hirsch, 1992; Schultze y Kondorosi, 1998). Mediante técnicas bioquímicas y moleculares se han identificado numerosos genes que se expresan particularmente durante este proceso, a continuación se presentan algunos de los genes utilizados como marcadores moleculares de cada una de las etapas del proceso.

Nodulinas de la planta

Las nodulinas, genes de la planta que se inducen durante el proceso simbiótico, han sido identificadas en numerosas especies de leguminosas. Las mismas se clasifican de acuerdo a su expresión temporal: las nodulinas tempranas (ENOD) se expresan los primeros días de la infección, en el período previo o durante la iniciación del primordio nodular, mientras que las nodulinas tardías se activan durante el período de maduración del nódulo, en el inicio o durante el proceso de fijación (Nap y Bisseling, 1990).

Si bien estos genes fueron identificados en base a su expresión diferencial en el nódulo, actualmente se conoce que la mayoría de las nodulinas se expresan en tejidos no simbióticos (Hirsch *et al.*, 2001). La expresión de la nodulina ENOD40, por ejemplo, es crítica para la formación del primordio nodular, sin embargo la misma se encuentra como un activador de la división celular en otras regiones meristemáticas de la planta (Kouchi y Hata, 1993; Crespi *et al.*, 1994). En forma similar, los genes de hemoglobinas, nodulinas tardías conocidas como propias del nódulo, son homólogas a proteínas de plantas no leguminosas (Hirsch *et al.*, 2001).

La identificación de las nodulinas se ha realizado con la aplicación de métodos muy variados, incluyendo expresión diferencial de bibliotecas de ARN mensajeros, selección diferencial en placa, genómica funcional y mutagénesis de plantas modelos (Crespi y Gálvez, 2000). Actualmente el uso de técnicas bioinformáticas aplicadas a las secuencias de expresión, ESTs, disponibles para varias leguminosas permite una visión global de los genes activos en el proceso

simbiótico (Stougaard, 2000). En relación con la función que cumplen las nodulinas identificadas, los roles probables asignados se basan principalmente en su expresión espacio-temporal durante la diferenciación del nódulo y a la similitud de secuencia con proteínas conocidas (Crespi *et al.*, 2000). Como ejemplo, la mayor parte de las nodulinas tempranas son homólogas a glicoproteínas ricas en hidroxiprolinas (HPRG) presentes en la base de datos. Estas proteínas se asocian a la pared celular y probablemente cumplen función en la formación del hilo de infección (Hadri y Bisseling, 1998; Lhuissier *et al.*, 2001). En las etapas tardías de nodulación las nodulinas identificadas se relacionan con los procesos de: biogénesis de la membrana peribacteroidal (proteínas GTP, nodulinas 23, 24 y 26 componentes de la membrana), protección de la nitrogenasa (familia de leghemoglobina), metabolismo de carbono e incorporación de nitrógeno (sacarosa sintasa, GS-GOGAT, uricasa) (Crespi y Galvez, 2000).

En relación con el análisis de estos genes mediante técnicas de genética molecular, los estudios de análisis funcional y de mecanismos de regulación de las nodulinas son reducidos. Recientemente, el clonado de algunos de los genes simbióticos ha permitido la caracterización genética de los mismos (Schäuser *et al.*, 1999; Endre *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002). En la tabla 4 se presentan algunas nodulinas en las que se realizaron estudios funcionales, indicando las diferentes etapas simbióticas en las que participan (Crespi *et al.*, 2000; Stougaard *et al.*, 2000).

Tabla 4: Características funcionales de algunas nodulinas implicadas en las diferentes etapas de desarrollo del nódulo.

Proteína o gen	Función	Etapas del proceso	Rol en la planta, fenotipo y referencia
Lectina de soja, <i>Lel</i>	Adhesión celular	Adhesión bacteriana	Extiende el rango de huéspedes de <i>L. corniculatus</i> a <i>B. japonicum</i> formando nódulos vacíos (Van Rhijn <i>et al.</i> , 1998).
Alfalfa, <i>Enod12</i>	Síntesis de la pared celular	Infección e invasión	No requerido para la nodulación eficiente en alfalfa (Csanádi <i>et al.</i> , 1994).
<i>L. japonicus</i> . LjNin	Regulador (posible factor de transcripción)	Iniciación del primordio nodular	Mutantes <i>nin</i> presentan deformación del pelo pero no nodulan (Schauser <i>et al.</i> , 1999)
Alfalfa, <i>Enod40</i>	Activación celular en la corteza	Formación del primordio	Su sobreexpresión provoca aceleración del proceso de nodulación (Charon <i>et al.</i> , 1997)
Alfalfa, <i>ccs52</i>	Inhibidor mitótico	Diferenciación de células de la planta	La supresión disminuye el número de ciclos de división durante la diferenciación (Cebolla <i>et al.</i> , 1999)
<i>Mszpt2-1</i>	Diferenciación celular, factor de transcripción	Diferenciación de células de la planta	La supresión detiene la diferenciación en la zona central del nódulo e inhibe la liberación de las bacterias (Frugier <i>et al.</i> , 2000)
Soja, proteínas Rab	Proteínas de unión a GTP	Diferenciación del bacteroide	Rol en la biogénesis de la membrana peribacteroidal (Cheon <i>et al.</i> , 1993)
Arveja, <i>rug4</i>	Sacarosa sintasa	Fijación en el nódulo maduro	Fijación inefectiva (Gordon <i>et al.</i> , 1999)

Genes simbióticos de la bacteria

Desde el punto de vista de la bacteria, el proceso simbiótico implica la colonización de ambientes muy diversos: la multiplicación en la rizósfera, la adhesión a la raíz, el crecimiento en el hilo de infección y finalmente la vida intracelular en el simbiosoma. La adaptación en cada una de estos nichos es dirigida por la expresión diferencial de numerosos genes (Niner y Hirsch, 1998).

Los genes *nod*, *nol* y *noe*, referidos colectivamente como *nod*, se relacionan con los eventos tempranos de nodulación. Su expresión, es inducida por el activador transcripcional NodD, perteneciente a la familia *LysR*, en presencia de los exudados radiculares específicos (Spaink *et al.*, 1987). En algunas especies se han observado coactivadores como SyrM o el sistema de dos componentes NodVW (Schlaman *et al.*, 1998). Los genes *nod* son responsables de la síntesis (*nodABC*), modificación (*nodFE*, *nodHPQ*, *nodSU*, *nodH*) y secreción del factor Nod (*nodIJ*, *noIFGHI*), así como de la síntesis de algunas proteínas secretoras (*nodO*, *noIW*, *noIT*). En los bacteroides, los mecanismos de autoregulación negativa del gen *nodD* y la acción del represor NolR silencian la transcripción de los genes de nodulación (Downie, 1998).

Previo a la liberación de las bacterias al primordio nodular, la tensión baja de oxígeno induce la expresión de los genes *nif* y *fix* requeridos para la fijación de nitrógeno (Batut y Boistard, 1994). Los genes *nif* codifican para las enzimas encargadas de la síntesis (*nifHDK*), maduración (*nifE*, *nifN*, *nifB*) y actividad de la nitrogenasa. Son genes muy conservados entre los organismos diazotrofos, puntualmente el gen *nifA*, activador transcripcional de los genes *nif*, esta presente en todos los organismos fijadores (Dean y Jacobson, 1992). Los genes *fix*, por el contrario, son genes específicos de la fijación simbiótica necesarios para el proceso de reducción de nitrógeno, los productos de estos genes son proteínas involucrados en la reducción de la nitrogenasa (ferredoxinas y flavoproteínas) o en la síntesis de cadenas respiratorias simbióticas (*cbb3*) (Batut *et al.*, 1989). La expresión de los genes de fijación esta coordinada e implica la traducción de la señal mediada por el sistema sensor de oxígeno FixL-J y la inducción en cascada de la expresión génica a través de la activación de los factores transcripcionales NifA y FixK (Foussard *et al.*, 1997).

A partir del clonado de los genes *nod* y *fix*, la búsqueda de otros genes bacterianos involucrados en el proceso simbiótico se basó en la aplicación de diversas metodologías moleculares: clonado físico, identificación plasmídica, mutagénesis dirigida, y finalmente la secuenciación completa del genoma y el análisis funcional del mismo. Como resultado, se han identificado numerosos genes relacionados con las distintas etapas del proceso simbiótico (Niner y Hirsch, 1998). Asimismo, se ha encontrado que algunas vías metabólicas

relacionadas con el mantenimiento general de la bacteria son requeridas para la nodulación eficiente (Taté *et al.*, 1999^a, 1999^b).

Si bien los estudios relacionados con los determinantes genéticos en los eventos de reconocimiento y de fijación son numerosos (van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Schlaman *et al.*, 1998; Niner y Hirsch, 1998), se han identificado pocos genes involucrados con las etapas intermedias de liberación y diferenciación bacteriana. Recientemente, la identificación de promotores capaces de dirigir la expresión correcta del gen *bacA*, el cual se expresa durante la maduración del bacteroide, permitió la identificación de nuevos genes relacionados con la misma etapa (Oke y Long, 1999^b). Como se observa en la tabla 1, varios de los genes implicados en la maduración del bacteroide son requeridos en forma diferencial durante la simbiosis dependiendo de la leguminosa hospedante. Estos resultados permiten especular que la planta podría participar en el proceso de formación del bacteroide (Sutton *et al.*, 1981).

Tabla 1: Algunos genes bacterianos necesarios para la liberación, diferenciación y el mantenimiento de los bacteroides (Oke y Long, 1999^b).

Gen	Especie	Fenotipo simbiótico	Función asociada	Referencia
<i>bacA</i>	<i>S. meliloti</i>	Las bacterias senescen apenas invaden las células del nódulo	Homóloga a la proteína SbMA de <i>E. coli</i>	Glazebrook <i>et al.</i> , 1993
<i>dctA</i>	<i>S. meliloti</i>	Los bacteroides se degradan antes de madurar	Incorporación de dicarboxilatos	Engelke <i>et al.</i> , 1989
cercano a <i>ndv</i>	<i>Rhizobium</i> TAL1145	Forma nódulos Fix- en poroto. En <i>Leucaena</i> los nódulos son normales	Sin homología	Pooyan <i>et al.</i> , 1994
<i>hsfA</i>	<i>B. japonicum</i>	En caupí, nódulos Fix- con pocos bacteroides. En soja o siratro, nódulos normales	Sin homología	Chun <i>et al.</i> , 1994
<i>nolA</i>	<i>B. japonicum</i>	En caupí, simbiosomas anormales. En soja retraso en la diferenciación del bacteroide	Regulador transcripcional	García <i>et al.</i> , 1996
<i>typA</i>	<i>S. meliloti</i>	Requerido para la colonización del nódulo en la cepa Jemalong, no así para la cepa F83005.5 de <i>Medicago truncatula</i> .	Homólogo a <i>bypA</i> , proteína relacionada a diferentes estreses y virulencia en bacterias	Kiss <i>et al.</i> , 2004
<i>prsDE</i>	<i>R. leguminosarum</i> y <i>S. meliloti</i>	Nódulos Fix- en <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> . En <i>S. meliloti</i> , nódulos Fix+	Sistema de secreción tipo I	Finnie <i>et al.</i> , 1997; York y Walker, 1997

LAS PURINAS EN EL PROCESO SIMBIÓTICO

La síntesis *de novo* de purinas en bacterias

La síntesis de las purinas es una función metabólica central en todas las células. Los productos adenosina monofosfato (AMP) y guanina monofosfato (GMP) proveen las bases para la síntesis de los ácidos nucleicos, así como para coenzimas esenciales (NAD, NADP, FAD), moléculas energéticas (ATP y GTP) o de señalización (AMPc y GMPc). La vía *de novo* de las purinas ha sido caracterizada, inicialmente en los organismos procarióticos, *E. coli*, *S. typhimurium* y *Bacillus subtilis* (Ebbole y Zalkin, 1989; Zalkin y Dixon, 1992). Posteriormente, los estudios de organización génica, la función y localización de las enzimas de esta ruta se han extendido a organismos eucarióticos principalmente a las plantas leguminosas (Senecoff *et al.*, 1993; 1996; Smith *et al.*, 1998; Smith y Atkins, 2002).

En *E. coli*, el primer nucleótido de la vía, inosina monofosfato (IMP), se forma a partir de la ribosa 5-fosfato activada, PRPP, en diez reacciones enzimáticas que incorporan en forma secuencial grupos funcionales. Si bien este modelo se mantiene en el resto de los organismos estudiados, la organización de las enzimas varía substancialmente. En *E. coli*, los genes de la ruta central, denominados *pur*, se encuentran organizados en 9 operones (Zalkin y Nygaard, 1996) que codifican enzimas monofuncionales excepto la codificada por el gen *purH* que cataliza los dos últimos pasos de la vía. Mientras en las plantas la organización de la ruta es similar a las bacterias, en el resto de los organismos eucarióticos las enzimas de la síntesis de purinas son en general multifuncionales, manteniendo sin embargo los dominios similares a sus homólogos monofuncionales procarióticos (Zalkin y Dixon, 1992; Smith y Atkins, 2002).

Las reacciones de síntesis de los nucleótidos AMP y GMP a partir de IMP son pasos compartidos por las vías *de novo* y de salvataje de purinas. La síntesis de GMP se realiza en dos etapas codificadas por los genes *guaB* y *guaA* sucesivamente. En el primer paso, la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa cataliza la oxidación de IMP a xantina monofosfato (XMP) con la concomitante reducción de NAD a NADH. Posteriormente, la XMP es aminada a

GMP por la amidotransferasa GMP sintetasa, en un proceso glutámico dependiente que requiere ATP (Zalkin y Nygaard, 1996).

La vía de las purinas responde a las alteraciones metabólicas de la célula sensando tanto la necesidad de nucleótidos precursores para los ácidos nucleicos como la disponibilidad externa de guanina o adenina, las cuales son usadas preferentemente a su síntesis *de novo*. Asimismo, la producción de las purinas debe mantenerse balanceada con la concentración de pirimidinas presentes en la célula (Hutchings y Drabble, 2000). En *E. coli*, la síntesis de nucleótidos esta regulada por dos tipos de controles, a nivel de la actividad enzimática y en la expresión de los genes *pur*. La actividad de la enzima PRPP amidotransferasa es retroinhibida por los productos IMP, GMP y AMP. Además existe un control suplementario en la actividad de las enzimas inosina monofosfato deshidrogenasa y adenilosucinato sintetasa mediado por los productos GMP y AMP respectivamente (Merha y Drabble, 1981; Zalkin y Nygaard, 1996).

A nivel de la expresión génica, PurR es el regulador que coordina la transcripción de los genes *pur* en relación con la disponibilidad externa de purinas (Meng *et al.*, 1990). La unión específica de esta proteína a las secuencias operadoras depende de la presencia de las bases guanina e hipoxantina las cuales actúan como co-represores (Meng y Nygaard, 1990). En los genes de síntesis de AMP y GMP la inhibición de la transcripción es mas débil que en el resto de los genes *pur*, este patrón diferencial de control le permite a la célula reprimir la síntesis de novo de purinas manteniendo las vías de salvataje (Zalkin y Nygaard, 1996).

En *Bacillus subtilis*, la expresión de los operones *pur* y *xpt-pbuX* (xantina fosforiltransferasa y transportador de xantina) esta sujeta a un mecanismo dual de regulación del inicio y terminación de la transcripción (Christiansen *et al.*, 1997). Similar a lo observado en *E. coli*, el mecanismo de control del inicio de la transcripción esta regulado por la unión de PurR a la secuencia operadora. Asimismo cuando el pool de PRPP es abundante se une al regulador negativo evitando la unión al sitio operador y liberando la transcripción de los genes (Saxild y Nygaard, 1991). El segundo mecanismo de control, responde a las bases libres hipoxantina y guanina. En presencia de estas purinas la

transcripción termina antes de completar el primer gen estructural de los operones (Christiansen *et al.*, 1997).

Recientemente, se describió un nuevo regulon de purinas en *B. subtilis*, XptR, el cual comprende los operones *pur*, *xpt-pbuX* y los genes *pbuG*, *pbuE*, y *nupG*. El regulon es controlado negativamente por las bases hipoxantina y guanina, excepto para el gen *pbuE*. Este último gen codifica para una bomba de salida de hipoxantina, por lo que la expresión aumentada del gen resulta en la disminución de la concentración celular de hipoxantina y por ende en la inducción del regulón XptR (Johansen *et al.*, 2003).

Vías de salvataje y catabolismo de purinas

Las vías de salvataje de purinas, caracterizadas en varios organismos procarióticos, le permiten a la célula la utilización de bases y nucleósidos preformados para la síntesis de nucleótidos. Mediante estas enzimas, los nucleósidos son degradados a bases puricas las que a su vez son convertidas en los nucleótidos monofosfatos correspondientes por acción de fosforibosiltransferasas (Xi *et al.*, 2000). Asimismo, en algunos microorganismos, como *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis* y *E. coli*, las vías de salvataje posibilitan la degradación de las purinas para ser utilizadas como fuentes de nitrógeno o carbono (Tyler, 1978; Christiansen *et al.*, 1997, Xi *et al.*, 2000).

Las bacterias de la especie *B. subtilis* son capaces de utilizar las purinas adenina, hipoxantina, xantina y guanina como única fuente de nitrógeno mediante la actividad de las enzimas de salvataje (Fig. 5). Las enzimas adenina deaminasa y guanina deaminasa convierten la adenina a hipoxantina y la guanina a xantina respectivamente. En pasos subsecuentes la xantina deshidrogenasa cataliza las reacciones de oxidación de hipoxantina a xantina y la conversión de xantina a ácido úrico. Esta última reacción es el primer paso irreversible del catabolismo de las purinas. Alternativamente, la xantina puede ser incorporada nuevamente a la vía de síntesis de purinas como xantina monofosfato (XMP) (Christiansen *et al.*, 1997).

En *B. subtilis* existe un sistema de control coordinado entre los procesos de salvataje y catabolismo de purinas. Los genes que codifican para las enzimas

responsables de la degradación purinas en conforman un regulón controlado por el activador transcripcional PucR. El metabolismo de la xantina es regulado por el nivel nutricional de las células, así, durante el crecimiento con purinas o glutamato como única fuente de nitrógeno, se reprime el salvataje de la xantina y PucR actúa induciendo la transcripción de los genes de degradación, principalmente de la enzima xantina deshidrogenasa. Por el contrario, en presencia de glutamato más amonio, se induce la enzima fosforibosiltransferasa (gen *xpt*) y la conversión de xantina en XMP (Christiansen *et al.*, 1997; Schultz, *et al.*, 2001).

En *E. coli* el catabolismo de las purinas es incompleto, la bacteria es incapaz de utilizar las purinas como única fuente de nitrógeno, con excepción de la adenina y adenosina las cuales son degradadas a alantoína, mientras que las enzimas últimas de la vía de catabolismo no parecen ser funcionales. Asimismo se propone que la enzima XDH cumple una función importante en la síntesis de GMP a partir de adenina, pero no participa en el catabolismo aeróbico de purinas (Xi *et al.*, 2000).

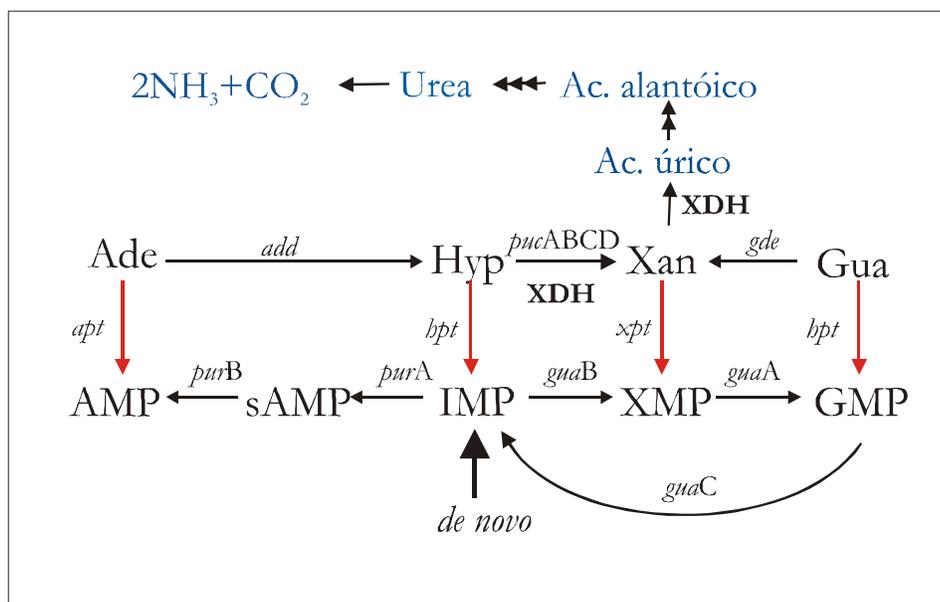


Figura 5: Vías de salvataje (Christiansen *et al.*, 1997) y catabolismo (Schultz, *et al.*, 2001) de las purinas descritas en *Bacillus subtilis*. En cada reacción se indican los genes que codifican para las enzimas implicadas.

Relación entre la síntesis de purinas y el proceso de infección en la simbiosis

Los auxótrofos para purinas de varias especies de *Rhizobium* presentan diversos fenotipos defectivos en la simbiosis con sus hospedantes normales. El paso en que se detiene el proceso de infección en estos mutantes depende de la especie vegetal y del gen afectado en la bacteria (Worland *et al.*, 1999). En *R. leguminosarum* las bacterias Pur⁻ inducen pocos hilos infectivos y la producción de pseudonódulos con sistema vascular central y células sin bacterias (Newman *et al.*, 1994). Estructuras similares son inducidas en las raíces de poroto por mutantes de purinas de *R. etli* (Noel *et al.*, 1988; Newman *et al.*, 1995). El mutante Pur⁻ caracterizado en *R. NGR234* induce en raíces de *Macroptilium* el encurvamiento del pelo y la iniciación de la división cortical pero no se observan hilos de infección (Djordjevic *et al.*, 1988). Si bien el bloqueo en estos procesos simbióticos no se observa exactamente en la misma etapa de desarrollo, los antecedentes descriptos demuestran que el fenotipo Pur⁻ en la bacteria afecta el proceso de infección (Newman *et al.*, 1994).

La suplementación de las raíces con AICA, forma no fosforilada del precursor de las purinas AIRCAR, restaura alguna de las características simbióticas normales en los mutantes de purinas (Noel *et al.*, 1988; Newman *et al.*, 1992; 1994) si bien se ha demostrado que dicha complementación no es total, acorde al análisis proteómico de las cepas mutantes suplementadas (Worland *et al.*, 1999).

Debido a los antecedentes citados, se ha propuesto que la presencia de algún intermediario de las purinas, el 5-aminoimidazol-4-carboxamida ribonucleotido (AIRCAR) u otro metabolito relacionado, es crítica para iniciar la infección y o el mantenimiento del hilo infectivo hasta la diferenciación del nódulo (Newman *et al.*, 1995).

La síntesis de guanina es esencial para la tolerancia térmica y la nodulación efectiva en *R. tropici*

En el suelo, la eficiencia de la nodulación resulta afectada por una variedad de condiciones adversas tales como pH extremos, limitación de nutrientes, o la exposición a altas temperaturas. La respuesta a estos factores ambientales depende tanto de la planta como de la especie bacteriana implicada en la simbiosis. En el caso del poroto (*Phaseolus vulgaris*), la infección y la fijación son efectivas solo en un rango estrecho de temperaturas (Phia y Munns, 1987). Se han identificado una variedad de cepas capaces de nodular poroto en condiciones de temperatura alta y elevados niveles de acidez y aluminio en suelo (Hungria *et al.*, 1993), de las cuales *R. tropici* CIAT 899 es una de las cepas con mayor tolerancia intrínseca.

Con el objeto de estudiar las bases moleculares implicadas en la respuesta al estrés térmico, en nuestro laboratorio realizamos la mutagénesis al azar del genoma de *Rhizobium tropici* CIAT 899 por inserción del transposón Tn5-*luxAB*, seleccionando los mutantes con crecimiento defectivo en condiciones de altas temperatura. Una de las cepas seleccionadas, CIAT 899-10.T, presenta una inserción en el gen *guaB* codificante de la enzima inosina-monofosfato deshidrogenasa en la vía biosintética de guaninas. Este mutante, sin embargo no es auxótrofo para guanina en temperaturas normales de crecimiento debido a la utilización de la vía alternativa mediada por la enzima xantina deshidrogenasa. Asimismo, se encontró que la suplementación al medio con guanina, o alternativamente con sus precursores biosintéticos en la vía alternativa, restaura la tolerancia térmica del mutante. Por otra parte, la cepa CIAT 899-10.T presenta un fenotipo defectivo en la simbiosis (Ndv-) con poroto y caupí. En estas plantas el mutante induce nódulos pequeños, blancos, numerosos y distribuidos a en toda la raíz. Por observaciones microscópicas se observa la formación de pocos hilos de infección y la ausencia de bacterias dentro de las células del nódulo (Riccillo *et al.*, 2000). Sin embargo el fenotipo Ndv- originado por la mutación en el gen *guaB* parece depender del hospedante implicado en la simbiosis puesto que el mutante *guaB* de *R. tropici* es capaz de nodular normalmente plantas de *Leucaena leucocephala*.

Estos resultados demuestran que la síntesis de guanina es esencial tanto para el crecimiento en altas temperaturas de *R. tropici* como para la nodulación efectiva en poroto. Asimismo, señalan otro compuesto de la vía de síntesis de guanina, además del AIRCAR, que cumple un rol importante en la infección simbiótica.

Objetivos del presente trabajo

Objetivos generales

- Investigar el rol del gen *guaB* de los rizobios en el establecimiento de una simbiosis efectiva con las leguminosas hospedadoras.
- Avanzar en el conocimiento actual de los factores genéticos y bioquímicos determinantes de la tolerancia al estrés térmico de *R. tropici*.

Objetivos particulares

- Determinar la organización genética y el patrón de expresión del gen *guaB* de *R. tropici*.
- Analizar el efecto de la mutación en el gen *guaB* sobre la síntesis de las proteínas de estrés térmico de *R. tropici*.
- Investigar en qué etapas de la interacción simbiótica con poroto es requerida la expresión del gen *guaB* de *R. tropici*.
- Evaluar la importancia del gen *guaB* en el establecimiento de una simbiosis efectiva en las asociaciones *S. meliloti*-alfalfa y *R. tropici*-siratro.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS.

Tabla 1. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5α	F ⁻ φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁺) <i>phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1</i>	Hanahan, 1983
S17-1	<i>thi pro hsdR⁻ hsdM⁺ recA</i> , RP4 2-Tc::Mu integrado en el cromosoma	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>S. meliloti</i>		
1021	Sm ^r , cepa salvaje derivada de RCR2011	Meade <i>et al.</i> , 1982
MC.1021 ⁻	Nm ^r , auxótrofo para guanina	Esta tesis
<i>Rhizobium tropici</i>		
CIAT899	Sm ^r , cepa salvaje, Nod ⁺ Fix ⁺ en poroto y leucaena	Martinez Romero <i>et al.</i> , 1991
CIAT899MC17	en el cromosoma fusión génica <i>guaB-lacZ</i> , el reportero <i>lacZ</i> en sentido opuesto al gen <i>guaB</i> , Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
CIAT899MC18	<i>guaB::lacZ</i> , Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
CIAT899MC21	ORF1:: <i>lacZ</i> ; Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
CIAT899MC22	con fusión génica ORF1- <i>lacZ</i> , el reportero <i>lacZ</i> en sentido opuesto al ORF1, Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
CIAT899MC23	con fusión génica ORF2- <i>lacZ</i> , el reportero <i>lacZ</i> en sentido opuesto al ORF2, Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
CIAT899MC24	ORF2:: <i>lacZ</i> ; Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
CIAT899-B y CIAT899-G	Tc ^R , <i>nifD</i> , Nod ⁺ , Fix ⁻ en poroto	Esta tesis
CIAT899-10.T	Nm ^r , <i>guaB</i> , Ndv ⁻ Fix ⁻ en poroto	Riccillo <i>et al.</i> , 2000
10.TMC17	<i>guaB</i> , fusión génica <i>guaB-lacZ</i> , el reportero <i>lacZ</i> en sentido opuesto al gen <i>guaB</i> , Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
10.TMC18	<i>guaB</i> , <i>guaB::lacZ</i> , Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
10.TMC21	<i>guaB</i> , ORF1:: <i>lacZ</i> ; Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
10.TMC22	<i>guaB</i> , fusión génica ORF1- <i>lacZ</i> , el reportero <i>lacZ</i> en sentido opuesto al ORF1, Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
10.TMC23	<i>guaB</i> , fusión génica ORF2- <i>lacZ</i> , el reportero <i>lacZ</i> en sentido opuesto al ORF2, Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis
10.TMC24	<i>guaB</i> , ORF2:: <i>lacZ</i> ; Nm ^r , Gm ^r	Esta tesis

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pIC20H	Ap, <i>lacZ</i> , con sitios <i>Hind</i> III en los extremos del sitio múltiple de clonado y un único sitio <i>Eco</i> RI.	Marsh <i>et al.</i> , 1984
pSUP104	Cm, Tc Mob; vector de amplio rango derivado de pACYC184	Priefer, <i>et al.</i> , 1985
pSUP204	Ap, Cm, Tc, Mob; vector de amplio rango derivado de pACYC184	Priefer <i>et al.</i> , 1985
pUC-4K	Ap, Km, <i>lacZ</i> , vector de clonado	Vieira <i>et al.</i> , 1982
pAB2001	Ap, <i>lacZ</i> , Gm, vector para la construcción de fusiones transcripcionales	Becker <i>et al.</i> , 1995
pSUP102	Cm, Tc, Mob; vector suicida en <i>Rhizobium</i>	Simon <i>et al.</i> , 1986
pNM482	Ap, múltiples sitios de restricción para la construcción de fusiones traduccionales con el gen reportero <i>lacZ</i> ,	Minton, 1984
pK18 <i>mob</i>	Km, <i>lacZ</i> , Mob+derivado de pK18, vector suicida en <i>Rhizobium</i>	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pMC0	Ap, fragmento <i>Eco</i> RI (1,5 kb) conteniendo la secuencia del gen <i>guaB</i> de <i>R. tropici</i> sin promotor con Shine Dalgarno, clonada en pGem-T easy (Promega)	Esta tesis
pMC1	Tc, fragmento <i>guaB</i> derivado del plásmido pMC0, clonado en el sitio <i>Eco</i> RI del vector pSUP204, en la misma dirección del promotor <i>cat</i>	Esta tesis
pMC2	Tc, fragmento <i>guaB</i> derivado del plásmido pMC0, clonado en el sitio <i>Eco</i> RI del vector pSUP204, en dirección opuesta al promotor <i>cat</i>	Esta tesis
pMC3	Ap, fragmento comprendido entre los 400pb río arriba del ATG de <i>guaB</i> y 500pb de la secuencia codificante, clonado en el vector pGem T-easy.	Esta tesis
pMC4	Ap, fragmento <i>guaB Eco</i> RI- <i>Pst</i> I derivado del plásmido pMC3, clonado en el plásmido pNM482	Esta tesis
pMC5	Tc, fusión traduccional <i>guaB-lacZ</i> derivada de pMC4, clonada en el plásmido pSUP 204	Esta tesis
pMC6	Ap; región cromosomal <i>Eco</i> RI (8 kb) que contiene el gen <i>guaB</i> de <i>R. tropici</i> , clonada en pIC20H	Esta tesis
pMC9	Tc; región cromosomal <i>Eco</i> RI (8 kb) que contiene el gen <i>guaB</i> de <i>R. tropici</i> , clonada en pSUP104	Esta tesis
pMC12	Ap, fragmento <i>Bam</i> HI (3 kb) que contiene el gen <i>guaB</i> , derivado del plásmido pMC6, clonado en el vector pUC-4K	Esta tesis
pMC15	Ap, Gm, derivado de pMC12, fusión transcripcional <i>guaB-lacZ</i> con el gen <i>lacZ</i> inserto en sentido contrario al gen <i>guaB</i>	Esta tesis
pMC16	Ap, Gm, derivado de pMC12, fusión transcripcional <i>guaB-lacZ</i> con el gen <i>lacZ</i> inserto en el mismo sentido del gen <i>guaB</i>	Esta tesis

pMC17	Km, Gm, fusión transcripcional <i>guaB-lacZ</i> (fragmento <i>Bam</i> HI derivado del plásmido pMC15), clonado en el vector pK18 <i>mob</i>	Esta tesis
pMC18	Km, Gm, fusión transcripcional <i>guaB-lacZ</i> (fragmento <i>Bam</i> HI derivado del plásmido pMC16), clonado en el vector pK18 <i>mob</i>	Esta tesis
pMC19	Km, fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Sal</i> I (derivado del plásmido pMC6) que contiene el ORF1, clonado en pK18 <i>mob</i>	Esta tesis
pMC20	Km, fragmento <i>Sma</i> I- <i>Pst</i> I (derivado del plásmido pMC6) que contiene el ORF2, clonado en pK18 <i>mob</i>	Esta tesis
pMC21	Km, Gm, derivado de pMC19, fusión transcripcional ORF1- <i>lacZ</i> con el gen <i>lacZ</i> inserto en el mismo sentido del gen <i>guaB</i>	Esta tesis
pMC22	Km, Gm, derivado de pMC19, fusión transcripcional ORF1- <i>lacZ</i> , con el gen <i>lacZ</i> inserto en sentido contrario al gen <i>guaB</i>	Esta tesis
pMC23	Km, Gm, derivado de pMC20, fusión transcripcional ORF2- <i>lacZ</i> con el gen <i>lacZ</i> inserto en sentido contrario al gen <i>guaB</i>	Esta tesis
pMC24	Km, Gm, derivado de pMC20, fusión transcripcional ORF2- <i>lacZ</i> con el gen <i>lacZ</i> inserto en el mismo sentido del gen <i>guaB</i>	Esta tesis
pMC28	Ap; fragmento del gen <i>guaB</i> (0.85 kb) de <i>S. meliloti</i> clonado en pGEM-T easy (Promega)	Esta tesis
pMC29	Ap; fragmento del gen <i>guaA</i> (0.58 kb) de <i>R. tropici</i> clonado en pGEM-T easy (Promega)	Esta tesis
pMC32	Ap/Km; <i>guaB</i> ::Km derivado del plásmido pMC28	Esta tesis
pMC37	Ap; fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Eco</i> RI (1,9 kb) del vector pVO120, conteniendo la secuencia codificante del gen <i>gusA</i> , clonado en pBluescript II SK (+) (Stratagene)	Esta tesis
pMC38	Ap/Km; fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Xho</i> I (1,5 kb) del vector pMC1, conteniendo el gen <i>guaB</i> , clonado en el vector PCR 2.1 TOPO (Invitrogen)	Esta tesis
pMC39	Cm; fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Hind</i> III (1,5 kb) del vector pMC37 conteniendo la secuencia <i>gusA</i> , clonado en pSUP 104	Esta tesis
pMC40	Km; fragmento <i>Eco</i> RI <i>guaB</i> ::Km del vector pMC32 clonado en pK18 <i>mob</i>	Esta tesis
pMC42	Cm; fragmento <i>Sal</i> I- <i>Bam</i> HI (0.34 kb) conteniendo la secuencia promotora del gen <i>nodA</i> de <i>R. tropici</i> , clonado río arriba del gen <i>gusA</i> en pMC39 (<i>PnodA-gusA</i>)	Esta tesis
pMC44	Cm; fragmento <i>Sal</i> I- <i>Bam</i> HI (0.28 kb) conteniendo la secuencia promotora del gen <i>bacA</i> de <i>S. meliloti</i> , clonado río arriba del gen <i>gusA</i> en pMC39 (<i>PbacA-gusA</i>)	Esta tesis
pMC46	Cm; fragmento <i>Sal</i> I- <i>Bam</i> HI (0.23 kb) conteniendo la secuencia promotora del gen <i>nifH</i> de <i>Bradyrhizobium</i> spp., clonado río arriba del gen <i>gusA</i> en pMC39 (<i>PnifH-gusA</i>)	Esta tesis

pMC43	Cm; secuencia codificante del gen <i>guaB</i> clonada en el vector pMC42 (<i>PnodA-guaB-gusA</i>)	Esta tesis
pMC45	Cm; secuencia codificante del gen <i>guaB</i> gene clonada en pMC 44 (<i>PbacA-guaB-gusA</i>)	Esta tesis
pMC47	Cm; secuencia codificante del gen <i>guaB</i> gene clonada en pMC46 (<i>PnijfH-guaB-gusA</i>)	

MEDIOS DE CULTIVOS

Las cepas de *E. coli* crecieron en medio LB (Miller, 1972) a 37°C. *R. tropici* y *S. meliloti* fueron crecidas a 30°C en medio rico TY (Beringer, 1974) o en medio mínimo GTS (Kiss *et al.* 1979). Las concentraciones de los antibióticos utilizados en los medios selectivos se indican en la tabla 2. Los sustratos X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indolil β-D-galactopiranosido) y X-GlcA (5-bromo-4cloro-3-indolil β-D-glucuronido) se adicionaron al medio sólido en concentraciones finales de 40 µg ml⁻¹ y 150 µg ml⁻¹ respectivamente.

Tabla 2: Antibióticos utilizados en los medios de cultivo de *E. coli*, *R. tropici* y *S. meliloti*.

Antibióticos	Abreviatura	Concentración final (µg ml ⁻¹)	
		<i>E. coli</i>	<i>R. tropici</i> y <i>S. meliloti</i>
Tetraciclina	Tc	10	10
Ampicilina	Ap	100	
Gentamicina	Gm	10	50
Kanamicina	Km	50	
Neomicina	Nm		100
Cloramfenicol	Cm	34	100
Estreptomina	Sm		400

PROCEDIMIENTOS MICROBIOLÓGICOS

Transformación de *E. coli*

Para la preparación de células de *E. coli* electrocompetentes se siguió la técnica de Tung y Chow (1995). A partir de un cultivo de *E. coli* saturado, se tomó una

alícuota de 2 ml con la cual se inoculó 400 ml de medio LB, los cultivos fueron incubadas a 37°C en agitación (220 rpm) hasta alcanzar una DO₆₀₀ de aproximadamente 0.8 unidades. Luego, las células fueron mantenidas en un sistema agua-hielo durante 30 minutos, centrifugadas a 4°C por 10 minutos a 4000 xg y posteriormente lavadas dos veces con 200 ml de glicerol 10%. Por último, el sedimento fue resuspendido en 1 ml de medio GYT (10% glicerol, 0.13% extracto de levadura y 0.25% de triptona) frío y se distribuyó en alícuotas de 100µl. Las células competentes fueron conservadas en freezer a -80°C.

La transformación por electroporación se realizó utilizando un equipo Gene Pulser (BioRad) en cubetas de 0.2 ml de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes (25µF, 200Ω, 2.5kV). Luego de la transformación, las células fueron resuspendidas en 700µl de medio LB e incubadas en estufa a 37°C durante 45 min. Finalmente, las bacterias fueron plaqueadas en medio LB/agar suplementado con el antibiótico correspondiente.

Conjugación bacteriana

La transferencia de los plásmidos a las cepas de *Rhizobium* fue realizada mediante conjugación bacteriana de acuerdo a la técnica descrita por Simon *et al.* (1989). En el sistema de conjugación triparental, los cultivos de la cepa cepa DH5α conteniendo el plásmido a transferir –donadora- y de la misma cepa con el plásmido pRK2013 que porta los genes para permitir la transferencia de material fueron crecidas hasta fase exponencial temprana (0.3 a 0.5). A una alícuota de estos cultivos (0.3 ml) se le agrego 0.7 ml de un cultivo de 12 hs de la cepa receptora de *Rhizobium*. Las bacterias fueron crecidos en medio rico, LB para *E. coli* y TY para los rizobio, suplementados con los antibióticos correspondientes. La mezcla fue centrifugada a 2500 rpm por 3 minutos y el sedimento bacteriano fue resuspendido suavemente en 50µl de medio TY. La suspensión fue sembrada en placa de medio TY e incubada en estufa a 28°C durante 12 horas. El crecimiento bacteriano fue resuspendido en medio TY líquido y plaqueado en medio TY/agar suplementado con los antibióticos adecuados. En todos los casos se mantuvieron como control las cepas procesadas por separado y plaqueadas en el mismo medio.

En el sistema de conjugación biparental el procedimiento experimental fue el mismo excepto que se utilizó como donadora la cepa S17-1 que porta los genes de transferencia de material genético integrados al cromosoma.

Curvas de crecimiento en medio mínimo

En los ensayos de crecimiento en medio líquido las bacterias fueron crecidas en medio mínimo GTS a 28°C hasta fase exponencial tardía, a partir de estos cultivos se tomaron alícuotas que fueron diluidas en 20 ml de medio fresco con una densidad óptica a 600nm (DO₆₀₀) de 0.05 unidades. Los cultivos se mantuvieron en agitación (200 rpm) a 28°C, o a 38°C para los ensayos de estrés térmico. Los nucleótidos –guanina, xantina, adenina e hipoxantina (Sigma)- y el allopurinol (4-hidroxi pirazolo-3,4 pirimidina, Sigma), inhibidor específico de la enzima Xdh, fueron adicionados al medio en concentraciones finales de 0.14mM y 1mM respectivamente, acorde con lo descrito por Riccillo *et al.* (2000). En todos los ensayos el crecimiento del cultivo fue seguido por medición de la DO₆₀₀ en el tiempo y cada tratamiento fue realizado al menos dos veces.

Ensayos de tolerancia a estrés térmico en medio agarizado

Los ensayos de tolerancia térmica en medio sólido fueron realizados de acuerdo al siguiente procedimiento: a partir de cultivos en fase exponencial temprana (0.3 a 0.5 unidades) se realizaron diluciones 10⁻¹ y 10⁻² y se tomaron alícuotas de 2 ul que fueron sembradas -como gotas- en medio GTS/agar e incubadas en estufa a 39°C.

Determinación de la actividad metalobetalactámica en *R. tropici*

Se analizó la presencia de metalobetalactamasas expresadas por la cepa *R. tropici* CIAT899 determinando la capacidad de la misma de hidrolizar el Imipenem, un antibiótico beta-lactámico del tipo Carbapenem. La sensibilidad de las cepas al Imipenem se analizó mediante un antibiograma utilizando la técnica de difusión en fase sólida siguiendo las normas recomendadas por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2001).

Las cepas analizadas, *R. tropici* CIAT899 y los controles *E. coli* DH5α -sensible- y *Stenotrophomonas maltophilia* –resistente- fueron crecidos en medio agarizado TY o LB –en el caso de *E. coli*-. Con un ansa se tomaron colonias aisladas de

cada cultivo y se resuspendieron en 5 ml de solución fisiológica estéril hasta lograr una suspensión con una DO600 de 0.3 unidades. La suspensión bacteriana fue absorbida por un hisopo estéril el cual fue aplicado en toda la superficie de una placa con 25 ml de medio Mueller-Hinton (pH 7.2) (Mueller y Hinton, 1941).

En cada placa sembrada se aplicaron dos discos de 10 µg de Imipenem (Britania) separados con una distancia suficiente para evitar la superposición de los halos. Luego de la colocación de los discos, las placas fueron incubadas invertidas a 35°C hasta observar el crecimiento de las cepas. El diámetro de los halos de inhibición de las cepas analizadas se comparó con los puntos de corte para discos de 10 µg de Imipenem los cuales presentan los siguientes valores: *susceptible* \geq a 16 mm, *intermedio* de 14 a 15 mm y *resistente* \leq 13 mm de diámetro.

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Extracción y purificación de ADN

Extracción de ADN total

La preparación de ADN total se realizó de acuerdo al método de Meade *et al.* (1982) modificado para pequeños volúmenes. Una alícuota (1 ml) de un cultivo de 12 hs fue centrifugada a 10000 xg durante 3 minutos, el sedimento bacteriano fue lavado con 0.5 ml de solución tampón TES frío (TE, 0.15M ClNa) y nuevamente centrifugado. Se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 0.5ml de TE (10mM Tris-ClH pH 8, 1mM EDTA) frío con lisozima (0.5mg/ml) e incubado durante 30 minutos a 37°C. A esta solución se le agregó 50µl de sarcosil-pronasa (10% sarcosil, 5mg/ml pronasa), se mezcló por inversión y se incubó nuevamente a 37°C durante una hora. Luego de la incubación se realizaron dos extracciones, la primera con 0.6 ml de fenol/TE pH 8 y la segunda con una mezcla fenol/cloroformo. Posteriormente el ADN fue precipitado añadiendo 0.6 ml de isopropanol frío y AcONH₄ (0.3M). La solución se mezcló por inversión hasta visualizar el ADN precipitado como una hebra, el mismo fue separado adhiriéndolo a las paredes y el resto de la solución fue extraída con un tip. El ADN unido a la pared fue lavado con 0.5 ml de etanol

70% frío, se dejó secar a temperatura ambiente durante 10 minutos y por último fue resuspendido en un volumen de 100µl a 200 µl de agua bidestilada estéril.

Extracción de ADN plasmídico

Las purificaciones de ADN plasmídico de *E. coli* fueron realizadas por el método modificado de lisis alcalina con precipitación con PEG de acuerdo al protocolo recomendado en el Kit TaqDyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems) o usando el kit Wizard mini-Preps DNA Purification System (Promega) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Purificación de ADN a partir de geles de agarosa

La purificación de ADN a partir de geles de agarosa se realizó con el kit Wizard PCR-Preps DNA Purification System (Promega) de acuerdo a las instrucciones de los fabricantes.

Alternativamente, se realizó el siguiente procedimiento: la porción del gel de agarosa con la banda de ADN fue cortada con un bisturí estéril y se colocó en tubo tipo eppendorf (de 1.5ml) conteniendo un tubo de menor volumen (0.5ml) relleno con lana de vidrio y perforado en el fondo. Los tubos con la tapa abierta fueron centrifugados a 2500 xg durante 7 minutos. Luego de la centrifugación se descartó el tubo con la lana de vidrio y se llevó la solución eluída a un volumen de 400µl con la adición de TE. A continuación se realizaron dos extracciones, la primera con 0.6 ml de fenol/TE pH 8 y la segunda con una mezcla fenol/cloroformo. El ADN fue precipitado añadiendo 1 volumen de isopropanol frío y AcONH₄ (0.3M), posteriormente se centrifugó en microcentrífuga a velocidad máxima durante 20 minutos a 4°C. El sedimento fue lavado con etanol 70%, secado durante 5 minutos a 37°C y por último resuspendido en agua bidestilada estéril (20 a 50 µl).

Técnicas de modificación y análisis de ADN

Condiciones de digestión y ligación de ADN

Las digestiones del ADN con enzimas de restricción fueron realizadas de acuerdo a las condiciones recomendadas por los fabricantes (Promega o Life Technologies).

La ligación de ADN se efectuó con la enzima T4DNA ligasa (Promega o Gibco) en la mezcla de reacción comercial, con incubación a 16°C durante toda la noche. Previo a la electroporación de las bacterias, la mezcla de ligación fue tratada con *n*-butanol siguiendo el protocolo de Thomas (1994) con el objeto de reducir la fuerza iónica de la solución y concentrar el ADN.

Separación de ADN en geles de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa de concentración entre 0.8% y 2% -de acuerdo con el tamaño del fragmento- utilizando en general solución tampón TBE (Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTANa₂ 2.5mM, pH 8.2) o alternativamente TAE (Tris-acetato 40mM, EDTANa₂ 10mM) en caso de realizar la purificación de los fragmentos. Para la determinación del tamaño de los fragmentos se utilizaron alternativamente los marcadores comerciales Lambda DNA/HindIII o Lambda DNA/HindIII+EcoRI (Promega).

Los geles fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio (1µg/ml), observados con luz UV en un transiluminador y fotografiados con cámara digital.

Visualización de plásmidos en geles de agarosa según la técnica de Eckhardt

La visualización del perfil plasmídico de las cepas de rizobios se realizó utilizando el método de lisis en gel de Eckhardt (1978), con las modificaciones para geles horizontales de agarosa descritas por Wheatcroft *et al.* (1990).

Condiciones de amplificación (PCR) de ADN

Las amplificaciones de ADN (PCR) fueron realizadas en un volumen final de reacción de 10µL conteniendo los siguientes reactivos: solución tampón provista con la enzima 1X, 3 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1 µM de cada cebador, 0,5U de *Taq* DNA polimerasa (Promega) y ADN molde 10ng. Las condiciones generales de los ciclos de amplificación fueron las siguientes:

1 ciclo	desnaturalización	95 °C	5 min
30 ciclos	desnaturalización	94 °C	1 min
	hibridación	variable de acuerdo al par de cebadores	1 min
	síntesis	72 °C	1 min
1 ciclo	síntesis	72 °C	10 min

Estas reacciones fueron realizadas utilizando los termocicladores Thermoblock UNO (Biometra) o Mastercycler gradient (Eppendorf).

Ensayos de hibridación de ADN (Southern blot)

El ADN digerido con las enzimas de restricción fue separado por electroforesis en gel de agarosa-TBE al 0,8%. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio, observado en el transiluminador y fotografiado con cámara digital. La transferencia del mismo a una membrana se realizó acorde al siguiente procedimiento: el gel fue desnaturalizado en una solución de NaOH 0,4M y NaCl 3M durante 60 minutos, luego se incubó en la solución de transferencia (NaOH 0,8 mM, NaCl 3 M) durante 15 minutos y por último fue transferido a una membrana de nylon (Hybond-N, Amersham-Pharmacia) utilizando la técnica de transferencia por capilaridad descrita por Chomczynski (1992). Una vez finalizada la transferencia la membrana fue neutralizada con buffer fosfato (NaH₂PO₄, Na₂HPO₄ 0,2 M pH 6,8), fijada durante 15 minutos con luz UV y luego secada en estufa a 60°C.

En el ensayo de hibridación realizado para analizar la cepa mutante *S. meliloti* MC.1021, se utilizó el sistema Gene Images AlkPhos Direct (Amersham Pharmacia Biotech), en este caso la marcación de la sonda, la hibridación de la membrana y la visualización de las bandas detectadas por la sonda se realizaron según el protocolo provisto por los fabricantes.

El resto de los ensayos de hibridación presentados en esta tesis fueron realizados con sondas biotiniladas. Las mismas fueron marcadas en la reacción de amplificación (PCR) en una mezcla con un volumen final de 50µL, conteniendo: 100 ng de ADN molde, buffer de polimerasa (1X), 1,5 mM MgCl₂, 20 µM de cada dNTP, excepto para el dATP, en este caso se utilizó una relación

60/40 frío/marcado con biotina, 1 μM de cada cebador y 2 U de *Taq* DNapolimerasa (Promega). La hibridación de la membrana con la sonda biotinilada se realizó siguiendo el protocolo de hibridación para membranas de nylon disponible con el sistema BluGene Nonradioactive Nucleic Acid Detection System (Life Technologies), asimismo este sistema se utilizó para la visualización de los resultados.

Análisis informático de las secuencias

Las secuencias de referencia utilizadas fueron obtenidas de la base de datos de secuencias Genbank (<http://www2.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/genbank>). El análisis de las secuencias de nucleótidos y proteínas se realizó utilizando los siguientes programas: BLAST con acceso libre en el sitio informático <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> perteneciente a la NCBI (National Center for Biotechnology Information, US National Library of Medicine), el paquete de servicios informáticos BCM Search Launcher disponible en el sitio <http://searchlauncher.bcm.tmc.edu> de la BCM (Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center) y el programa ClustalX disponible en el sitio <http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>.

Los alineamientos múltiples fueron graficados utilizando el programa GeneDoc (Nicholas y Nicholas, 1997). La búsqueda de dominios proteicos se realizó mediante el uso de los programas Pfam disponible en el sitio www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/ y CD-search con acceso en el sitio www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/ de la NCBI. Por último, el programa NNPP (Neural Network Promoter Prediction) disponible en el sitio www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html se aplicó para la búsqueda de posibles regiones promotoras en la secuencia 5' del gen *guaB* de *R. tropici*.

Clonado de la región cromosomal que contiene al gen *guaB*

Construcción de una biblioteca parcial de *R. tropici*

Con el objeto de construir una biblioteca parcial de *R. tropici* CIAT899 de fragmentos cromosomales *EcoRI* con peso molecular de ~5 kb a ~10 kb, se digirió el ADN total de esta cepa con la endonucleasa *EcoRI*. Luego de la digestión, los fragmentos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de

agarosa al 0,8%. Los fragmentos con el peso molecular deseado fueron purificados a partir del gel de agarosa utilizando el kit Wizard PCR-Preps DNA Purification System (Promega). Los fragmentos purificados fueron ligados al plásmido pIC20H digerido con *EcoRI*. La ligación se usó para transformar *E. coli* DH5 α , se seleccionaron las colonias blancas en medio LB suplementado con ampicilina y el sustrato X-Gal.

Detección por PCR del gen *guaB* salvaje de *R. tropici*

Se iniciaron cultivos en 10 ml medio líquido LB con ampicilina sembrando 50 colonias transformantes por frasco. A partir de estos cultivos crecidos durante 12 horas se realizaron preparaciones de ADN plasmídico siguiendo el método de lisis alcalina y precipitación con PEG. Esta mezcla de ADN fue diluida en una relación 1/200 con agua bidestilada estéril y utilizada como molde en ensayos de amplificación (PCR) con los oligonucleótidos (F10T2 5'-ATGCTCTGACATTCGACGAC-3'/R10TR21 5'-CAGTGACCGTGTGCGTATCGA-3'). Una vez que se produjo la amplificación del fragmento esperado (740 pb), se identificó el grupo de colonias correspondientes y se iniciaron cultivos de las colonias por separado en medio LB con ampicilina. Luego se realizaron preparaciones de ADN plasmídico de cada una de las colonias y se usaron como molde en una nueva amplificación con los cebadores específicos para el gen *guaB*. De esta forma se obtuvo el plásmido pMC6, constituido por el vector pIC20H y un inserto *EcoRI* de 8 kb que contiene el gen *guaB* de *R. tropici*.

Obtención de la cepa *guaB* de *S. meliloti*

Enriquecimiento en auxótofos para la guanina

La mutagénesis del gen *guaB* de *S. meliloti* se realizó por el método de interrupción fragmento específica utilizando el plásmido pMC40 el cual porta el fragmento *guaB::Km* clonado en el vector suicida pK18*mob*. La integración de este plásmido en la región *guaB* cromosomal por un único evento de recombinación interrumpe la transcripción del gen *guaB* salvaje. El plásmido pMC40 fue transferido a *S. meliloti* 1021 mediante conjugación biparental. La mezcla de conjugación fue plaqueada en medio TY adicionado con los antibióticos Sm y Nm. Los posibles transconjugantes fueron repicados

sucesivamente en medio GTS, GTS suplementado con allopurinol, y en medio TY agarizado. Se espera que un mutante *guaB* sea incapaz de crecer en medio con allopurinol (inhibidor específico de la Xdh) debido al bloqueo de la vía alternativa para la síntesis de guanina que comprende la enzima Xdh. El procedimiento de conjugación y posterior selección fue realizado al menos en tres ocasiones, en todos los ensayos el número de colonias transconjugantes fue bajo y no se obtuvieron mutantes incapaces de crecer en presencia de allopurinol. Por ende, se ensayó el enriquecimiento en mutantes auxotróficos para guanina de la población de transconjugantes. El procedimiento seguido fue el siguiente: una alícuota de la mezcla de conjugación (100µl) fue diluída en 10 ml de medio TY Sm/Nm, el cultivo se incubó a 28°C durante 12 horas, y luego se realizó una nueva dilución del cultivo en medio fresco. Estos ciclos de crecimiento y dilución fueron repetidos tres veces. La cuarta dilución se realizó en 10 ml de medio mínimo GTS, el cultivo se incubó a 28°C durante 6 horas y luego fue centrifugado a 4000 xg durante 10 minutos. El sedimento fue resuspendido en 10 ml de medio GTS con allopurinol (2 mM) y luego de tres horas de incubación se agregó al medio el antibiótico ampicilina (concentración final 1 mg/ml) para la muerte selectiva de las bacterias capaces de crecer en presencia de allopurinol. Este cultivo fue incubado durante 12 horas, luego se centrifugó y se lavó varias veces con medio TY. Finalmente las bacterias fueron resuspendidas en 10 mL medio TY Nm-Sm, se dejaron crecer durante 8 horas y se plaquearon diluciones del cultivo en medio TY Nm/Sm agarizado. Las colonias obtenidas fueron repicadas en los medios GTS, GTS con allopurinol y TY. Se realizaron dos enriquecimientos sucesivos, obteniéndose en el segundo ciclo la cepa mutante *guaB* denominada MC.1021.

ANÁLISIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Extracción y separación por electroforesis de las proteínas

A partir de un cultivo en fase exponencial, se tomó una alícuota de 1 ml (~10⁸ células), las células fueron centrifugadas a 10.000 xg, luego de eliminar el sobrenadante fueron resuspendidas en 80 µl de buffer de extracción Laemmli (1970) con 4 µl de β-mercaptoetanol y calentadas en baño de agua a 100°C durante 5 minutos. Los extractos proteicos se conservaron a -20°C hasta el

momento de ser analizados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS/PAGE) según el método de Laemmli (1970). En cada calle del gel se sembraron ~20 µg de proteínas, la concentración de proteínas totales en las muestras se determinó utilizando el sistema comercial (de Sigma-Aldrich) basado en el ensayo con ácido bicinchonínico descrito por Smith *et al.* (1985). La electroforesis se realizó en cuba Mini Protean (Bio Rad) a temperatura ambiente y voltage constante (120 V), finalizada la misma los geles se fijaron y tiñeron en solución metanol 50% v/v, ácido acético 10% v/v y Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma) al 0.1 % p/v.

Marcación *in vivo* de proteínas con ³⁵S metionina

El análisis de la síntesis *de novo* de proteínas se realizó por marcación con ³⁵S metionina. Los cultivos crecidos en medio GTS líquido hasta fase exponencial temprana, fueron sometidos a estrés térmico en distintas condiciones de temperatura y tiempo, indicadas en cada uno de los ensayos. Luego del estrés térmico, se tomaron alícuotas de 1 ml que fueron incubadas con 15 µCi de ³⁵S metionina (Amersham) durante 5 minutos. La marcación se detuvo enfriando las muestras en un baño de agua-hielo, luego se centrifugaron a temperatura ambiente a 12000 xg por 2 minutos y se lavaron dos veces con buffer fosfato salino (pH 7.2). Finalmente el sedimento fue resuspendido en 80 µl de buffer de extracción Laemmli y las muestras se calentaron en baño de agua a 100°C. Para determinar la cantidad de ³⁵S metionina incorporada a las proteínas se tomó una alícuota de 5 µl del extracto proteico, las muestras fueron colocadas en discos de papel Whatman 3MM, se dejaron secar por 5 minutos y luego fueron lavadas con ácido tricloroacético (TCA) 10%, TCA 5% y etanol 100% en forma consecutiva. Finalmente los discos se dejaron secar, se colocaron en viales con 3 ml de líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad de cada muestra utilizando un contador de centelleo.

Las proteínas fueron separadas en un gel SDS/PAGE sembrando entre 30.000 y 50.000 cpm de cada muestra, la electroforesis se realizó acorde a las condiciones descritas en el punto anterior, excepto que se utilizó una cuba Protean (Bio Rad). Los geles fueron revelados por autoradiografía siguiendo el protocolo descrito por Bonner y Laskeley (1974).

Transferencia e inmunodetección de proteínas (Western blot)

Luego de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas desde el gel a una membrana PVDF (Inmobilon-P Millipore), siguiendo la técnica de Towbin *et al.*, (1979). La electrotransferencia se realizó en el sistema Mini Trans Blot Cell (Bio Rad) utilizando el buffer Tris 25mM, glicina 192 mM, metanol 20%, pH 8.3, con amperaje constante (0.35 A) durante 4 horas a 4°C. Finalizada la transferencia la membrana fue teñida con Rojo Ponceau S (Sigma) para controlar la eficiencia de la transferencia y determinar la posición de las bandas del marcador de peso molecular (Bio Rad). El bloqueo de la membrana se realizó en buffer TBS (25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) con 5 % de leche en polvo descremada durante dos horas a temperatura ambiente. Luego las membranas se incubaron con el anticuerpo diluido en TBS/leche durante dos horas a 37°C. Se ensayaron dos anticuerpos policlonales de conejo dirigidos contra las proteínas DnaK y GroEL de *Chromatium vinosum*, en dilución 1:1000 y 1:5000 respectivamente (Los anticuerpos fueron cedidos gentilmente por el Dr. Alejandro Viale, Universidad Nacional de Rosario). Finalizada la incubación con el primer anticuerpo, se realizaron 3 lavados TBST (TBS, Tween-20 0.02%) de 10 minutos cada uno. Luego las membranas se incubaron por dos horas a 37°C con anti IgG de conejo conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma) diluido 1:5000 en TBS/leche. Se realizaron tres lavados de 10 minutos, dos con TBST y el lavado final con TBS solo. Finalmente las membranas fueron reveladas utilizando el sistema colorimétrico BCIP/NBT, 5-bromo, 4-cloro, 3-indolilfosfato/nitroazul de tetrazolium (Sigma). Este complejo forma un precipitado azul-púrpura como resultado de la desfosforilación y posterior oxidación de BCIP a indigo, acoplada a la reacción de NBT a diformazon.

DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS

Actividad IMPd y Xdh en geles nativos

La actividad de las enzimas IMP deshidrogenasa (IMPd) y xantina deshidrogenasa (Xdh) fue detectada por electroforesis en geles de poli(acrilamida) en condiciones no desnaturizantes, siguiendo el protocolo descrito por Miyamoto *et al.* (1998) con algunas modificaciones.

Las bacterias fueron crecidas en 50 ml de medio líquido GTS suplementado con guanina para permitir el crecimiento del mutante MC.1021. Al llegar a fase exponencial, los cultivos se centrifugaron a 8000 xg durante 15 minutos a 4°C, el sedimento se lavó con solución I (50mM Tris-HCl pH 8, 10mM MgCl₂, 10mM β-mercaptoetanol, 0.1mM EDTA, 1mM PMSF) y fue resuspendido en 1 ml de la misma solución. Las células fueron lisadas por sonicación (10 pulsos de 15 micrones de potencia durante 10 segundos, con intervalos de 30 segundos manteniendo las muestras en baño de agua-hielo), a continuación se separó la fracción citoplasmática por ultracentrifugación durante 30 min. a 15.000 xg a 4°C. Finalmente el sobrenadante (~1 ml) fue concentrado por filtración utilizando una membrana con límite de exclusión de peso molecular de 30.000 daltons (YM-30, Centricon), la columna se centrifugó a 5000 xg durante 30 minutos a 4°C y se resuspendió en 100 μl de solución II (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 % glicerol, 0.2mM EDTA, 0.2mM PMSF). Las muestras fueron analizadas en un gel no desnaturizante de poliacrilamida preparado esencialmente siguiendo el método de Laemmli (1970) y se corrieron a voltaje constante (150 V) durante 90 minutos a 4°C. Finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron en la solución III (50 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 1 mM glutatión reducido, 1.25 mM β-NAD, 0.55 mM NBT y 0.16 mM metasulfato de fenazina (PMS) con la adición de 1.5 mM del sustrato -IMP o xantina para la detección de IMPd y Xdh respectivamente-, los geles se incubaron en esta solución en oscuridad durante 30 minutos, la reacción se detuvo con ácido acético al 10 %.

Medidas de actividad β-galactosidasa

La actividad β-galactosidasa se determinó siguiendo el protocolo descrito por Miller (1972). 400 μL de cultivo fueron centrifugados a 10000 xg durante 2 minutos y el sedimento fue resuspendido en 800 μL de buffer Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM M MgSO₄.7H₂O y 50 mM β-mercaptoetanol, pH 7,0). Las células fueron permeabilizadas con la adición de 50 μL de cloroformo y 100 μL de SDS 0,1 % mezclando vigorosamente durante 1 minuto. La reacción se inició con el agregado de 150 μL del sustrato O-nitrofenilgalactopiranosido (ONPG) (4 mg/ml en buffer Z) y las muestras se incubaron a 28°C. Al virar la solución a amarillo, se detuvo la reacción con el

agregado de 400 μ l de Na_2CO_3 1M, se centrifugó 4 minutos a 10.000 xg y se midió la absorbancia del sobrenadante a 420 nm. La actividad β -galactosidasa se expresó en Unidades Miller calculadas de acuerdo a la siguiente formula: $1000 \times \text{DO}_{420} \text{ nm} / (\text{DO}_{600} \text{ de los cultivos} \times \text{volumen de cultivo} \times \text{tiempo de incubación})$.

Asimismo, se determinó la actividad β -galactosidasa en extractos de nódulos. Las medidas se realizaron en nódulos de 4 semanas, los mismos fueron cosechados y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido. Cada muestra constó de dos nódulos que fueron macerados en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) utilizando un pilón plástico y resuspendidos en 500 μ l de buffer Tris-HCl pH 7.5. Luego, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C, se recuperó el sobrenadante y a partir del mismo se tomó una alícuota (100 μ l) para la determinación de proteínas totales. En el volumen restante se determinó la actividad β -galactosidasa siguiendo el protocolo de Miller (1972) descripto para la cuantificación de esta actividad en los cultivos líquidos, la actividad fue expresada como nmoles de O-nitrofenol (ONP) producidos (por min. por mg de proteínas) a 28°C.

Medidas de actividad β -glucuronidasa

El análisis histoquímico para la detección de la actividad Gus en nódulos fue realizado siguiendo el protocolo descripto por Wilson *et al.* (1995). Cuando fue posible, los nódulos fueron removidos de la raíz para su tinción, en las etapas mas tempranas de la nodulación la tinción se realizó cortando el segmento de raíz con los primordios nodulares. El material vegetal fue incubado en buffer fosfato (Jefferson, 1987) conteniendo NaPO_4 50 mM pH 7, EDTA 0.1mM, sarcosil 0.1%, triton X-100 0.1%, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mM, y X-GlcA 150 μ g. ml^{-1} . Las muestras fueron concentradas en centrifuga "speed vac" y posteriormente incubadas a 37 °C durante 12 horas. Luego de la tinción, los tejidos fueron clarificados en solución de hipoclorito de sodio al 3%.

Para la determinación cuantitativa de la actividad GUS en nódulos, los extractos se prepararon de la siguiente forma, los nódulos fueron cosechados e inmediatamente congelados a -80°. En tubos de 1.5 ml (Eppendorf) se separaron 2 nódulos los cuales fueron macerados y resuspendidos en 400 μ l de buffer

salino (NaPO_4 50 mM pH 7), esta mezcla fue centrifugada a 12.000 xg durante 10 minutos a 4°C. A partir del sobrenadante se tomaron dos alícuotas de 50 μl con las cuales se determinó la concentración total de proteínas y el número de células viables mediante el plaqueo en medio TY sólido. En el volumen restante (300 μl) se cuantificó la actividad Gus siguiendo básicamente el protocolo descrito por Reeve *et al.* (1998) para cultivos líquidos de rizobios. Se agregó a la mezcla 2 μl de EDTA 0.5 M, 10 μl de β -mercaptoetanol 1 M, 590 μl de buffer salino y se mezcló vigorosamente. Luego se agregaron dos gotas de tolueno, se mezcló nuevamente cada muestra y se incubaron a 37°C durante 30 minutos con la tapa abierta para remover el tolueno. Los tubos se dejaron 5 minutos a 28°C, en cada muestra se agregó 10 μl de sustrato p-nitrofenil β -D-glucuronido (pNPG) 0.1 M y se incubaron a 28 °C. Al virar el color, las reacciones se detuvieron con el agregado de 400 μl de buffer 2-amino, 2-metil, propanediol 2.5M. Los tubos fueron centrifugados durante 2 minutos a 12.000 xg y se midió la absorbancia del sobrenadante a 415 nm. La actividad β -glucuronidasa específica se expresó como nmoles de p-nitrofenol producido por min. por mg de proteína a 28°C.

Determinación de la actividad nitrogenasa

La determinación de la actividad nitrogenasa se realizó por el método de reducción de acetileno (ARA) descrito por Hardy *et al.* (1968). Este método es indirecto y consiste en cuantificar la reducción de acetileno a etileno catalizada por la enzima nitrogenasa.

Estas determinaciones se realizaron en plantas enteras en el caso de *Medicago sativa*, o en el sistema radicular en plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Macroptilium atropurpureum*. Las plantas de poroto y alfalfa fueron cosechadas luego de 4 semanas de la inoculación, mientras que en el caso de siratro las determinaciones de ARA se realizaron a los 50 días. El material vegetal se introdujo en frascos de 57 ml cerrados herméticamente con tapas de goma. La reacción se inició inyectando acetileno en una concentración final 10% v/v (500 μl), a los 30 y 60 minutos de incubación se retiraron muestras (500 μl) de gas de cada frasco. Los niveles de etileno se determinaron en un cromatógrafo de gases Varian Star 3400X que contenía una columna Poropack N, utilizando

He como gas de arrastre y un detector de ionización por llama (FID) (equipo perteneciente al CIDCA, Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP). La actividad nitrogenasa fue expresada en nmoles de etileno producidos por planta por hora.

ENSAYOS DE NODULACIÓN

Esterilización y germinación de las semillas

En este trabajo se realizaron ensayos de inoculación con plantas de *Phaseolus vulgaris* cv. Negro Jamapa (poroto), *Macroptilium atropurpureum* (siratro), *Vigna unguiculata* (caupí) y *Medicago sativa* cv. CUF101 (alfalfa). Las semillas de siratro fueron pretratadas en agua destilada a 80°C durante 5 min. Luego se siguió el mismo procedimiento para todas las semillas. Las mismas fueron desinfectadas en etanol 95% (v/v) por 1 min., se trataron con hipoclorito de sodio (8 g.l⁻¹) durante 30 min. y finalmente se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron incubadas en oscuridad a 28°C en cajas de Petri conteniendo agar/agua.

Condiciones de cultivo de las plantas

En los ensayos de cinéticas de nodulación en plantas de alfalfa las plántulas de 1-2 cm fueron introducidas en bolsas plásticas estériles con soporte de papel de filtro, la superficie inferior de la bolsa se cubrió en su mitad inferior con papel opaco para evitar la incidencia de luz en las raíces. Las bolsas se mantuvieron con un volumen de 5 ml de solución salina Fahraeus (Vincent, 1970). En el resto de los ensayos los plantines fueron transferidos individualmente a macetas de 300 cm³ con vermiculita estéril como soporte y se regaron con agua destilada estéril y solución de Fahraeus.

Las plantas crecieron en una cámara de cultivo en condiciones de luz, humedad y temperatura controladas, con un 60% de humedad relativa, 28°C y fotoperíodo de 16/8 (luz/oscuridad).

Preparación de los cultivos bacterianos e inoculación de las plantas

La inoculación con cultivos bacterianos se realizó en plantas de una semana. Las bacterias fueron crecidas en medio TY líquido a 28 °C hasta fase exponencial tardía, estos cultivos fueron diluídos con solución Fahraeus estéril hasta un valor de 10⁷ rizobios por ml. Cada planta fue inoculada con una

alícuota de 1 ml, en el caso de las plantas que crecieron en macetas con vermiculita, y 100 µl para las plantas crecidas en bolsas plásticas.

Cinética de nodulación de alfalfa

Para estos ensayos, las plantas fueron mantenidas en bolsas plásticas transparentes y se regaron periódicamente con solución mineral de Fahraeus. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones de 15 plantas cada uno (45 plantas totales). Las raíces se examinaron periódicamente y se determinó el número total de nódulos por planta. Las observaciones se realizaron hasta 45 días posteriores a la inoculación.

Determinación del peso seco de plantas de siratro

Las plantas fueron cosechadas luego de 50 días de la inoculación, se lavaron las raíces para eliminar los restos de vermiculita. A continuación las plantas fueron introducidas en sobres de papel y secadas en estufa a 65 °C hasta peso constante. Las determinaciones se realizaron utilizando balanza analítica.

Aislamiento y recuento de bacterias de los nódulos

Los nódulos fueron esterilizados superficialmente con alcohol 96° durante 30 segundos y peróxido de hidrógeno (30 volúmenes) por 3 min., luego se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Cada nódulo se rompió individualmente en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) y se resuspendió en 100 µl de H₂O destilada estéril. Se realizaron diluciones seriadas de este macerado y se sembraron gotas de 2 µl de cada suspensión en una placa de medio TY con los antibióticos correspondientes.

Observación de cortes de nódulos por microscopía

Los nódulos cosechados a las 4 semanas de la inoculación fueron fijados en 50 M potassium phosphate buffer (pH 7.2) conteniendo paraformaldehído 2%, gluteraldehído 2.5%. Luego de 3 hs., los nódulos fueron fijados por 1 hora en el mismo buffer conteniendo tetróxido de osmio 2%. Las muestras fueron lavadas con buffer fosfato y deshidratadas por el pasaje a través de una serie de soluciones etanólicas (50, 70, 80, 95 y 100% v/v) a 0°C. Finalmente los nódulos fueron embebidos en resina Epon-Araldita. Para la observación por microscopía óptica se realizaron cortes semi-finos los cuales fueron teñidos con azul de

toluidina 0.5% en 0.5% de buffer borato. Estos preparados fueron observados utilizando un microscopio LEICA DMLB equipado con dispositivo de fotografía digital (perteneciente al CIDCA, Facultad de Ciencias. Exactas, UNLP). Asimismo se realizaron cortes ultrafinos los cuales fueron teñidos con acetato de uranilo al 2% (p/v) y citrato de plomo durante 3 min. Estas muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX, del servicio de microscopía electrónica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

CAPÍTULO III

Estudio de la organización
y la expresión del gen *guaB*

INTRODUCCIÓN

Organización de los genes de síntesis de guanina

Las enzimas responsables de las etapas finales de la síntesis *de novo* de guanina, inosina monofosfato deshidrogenasa y GMP sintetasa, son codificadas por los genes *guaB* y *guaA* respectivamente. Si bien estos genes se encuentran conservados a nivel de sus secuencias (Zalkin y Dixon, 1992), la organización génica es variable. En varias especies los genes *gua* forman un operón bicistrónico con un ordenamiento alternativo, *guaBA* (*S. typhimurium*, *E. coli*, *S. flexneri*) o *guaAB* (*B. Burgdorferi*) (Schafer *et al.*, 1974; Mehra y Drabble, 1981; Noriega *et al.*, 1996; Margolis *et al.*, 1994). En otros organismos, como *B. subtilis*, *S. thermophilus*- *guaA* y *guaB* se encuentran separados entre sí, y se transcriben independientemente (Mantsala y Zalkin, 1992; Bolotin *et al.*, 2004); esta organización se encuentra también en los genomas de rizobios cuya secuencia es conocida (caso *M. loti*, *S. meliloti*, *A. tumefaciens* y *B. japonicum*) (Kaneko *et al.*, 2000; Galibert *et al.*, 2001; Wood *et al.*, 2001; Kaneko *et al.*, 2002).

Regulación de la expresión de los genes *gua*

La expresión del operón *guaAB* de *E. coli* es regulada por un sistema de control multivalente. El regulador PurR constituye uno de los elementos que actuaría como coordinador general de la expresión de los genes responsables de la síntesis de purinas y pirimidinas; la expresión de los genes *gua* se reprime en presencia de guanina y se induce al aumentar la concentración de adenina (Mehra y Drabble, 1981; Thomas y Drabble, 1985). Asimismo, la proteína DnaA, que forma parte de la maquinaria de replicación del ADN, regula la expresión del operón en respuesta a la demanda de nucleótidos para la replicación de ADN (Tesfa-Selase y Drabble, 1992). La expresión de los genes *gua* también depende de la disponibilidad de aminoácidos y de la velocidad de crecimiento, los cuales constituyen mecanismos de control transcripcional propios de los genes ribosomales (Davies y Drabble 1996). Así, el promotor del operón *guaBA* de *E. coli* presenta secuencias que caracterizan a los promotores ribosomales, tales como las secuencias -10 y -35 similares a las secuencias consenso para promotores σ^{70} , una secuencia rica en GC implicado en la respuesta al estrés de

RESULTADOS

En esta sección se describe el clonado y análisis de la región *EcoRI* que contiene al gen *guaB* de *R. tropici*. Se presenta la organización física de dicha región genómica en comparación con otras especies de rizobios. Asimismo, se examina la expresión del gen *guaB* y su relación con las propiedades defectivas del mutante CIAT 899-10.T.

Clonación de la región cromosomal que contiene al gen *guaB*

En un ensayo preeliminar de hibridación tipo Southern dirigido a clonar el gen *guaB* salvaje, se determinó el tamaño del fragmento cromosomal *EcoRI* que contiene al gen *guaB*. La sonda utilizada consistió en un fragmento interno del gen de 740pb amplificado con cebadores específicos diseñados a partir de los datos de la secuencia *guaB* de *R. tropici* disponibles en nuestro laboratorio (F10T2 5'-ATGCTCTGACATTCGACGAC-3' /R10TR21 5'-CAGTGACCGTGTGCGTATCGA-3'). En las tres cepas ensayadas, *S. meliloti*, *R. tropici*, y *R. etli* se detectó un fragmento de peso molecular aproximado de 5.5, 8 y 10 kb respectivamente (Figura 2); el tamaño del fragmento detectado en el ADN de *S. meliloti* coincide con el tamaño esperado de acuerdo a los datos de secuencia del genoma (NC_003047).

Teniendo en cuenta el resultado de este experimento se construyó, a partir del ADN total de *R. tropici* digerido con la endonucleasa *EcoRI*, una biblioteca parcial comprendiendo fragmentos de ~5 kb a ~10 kb, los cuales fueron ligados al vector pIC20H. Luego de la transformación de *E. coli* DH5a con estos plásmidos, se realizaron varias preparaciones de ADN plasmídico de un pool de 50 colonias transformantes. Este ADN proveniente de diversos clones fue utilizada como molde en ensayos de amplificación (PCR) con los oligonucleótidos específicos para el gen *guaB* de *R. tropici* que fueran descriptos anteriormente. A partir de la amplificación positiva del fragmento esperado, se identificó un grupo de colonias, algunas de las cuales debería contener al plásmido recombinante con el gen *guaB* clonado. A partir de cada uno de los clones se preparó en forma individual ADN molde el cual se usó para realizar la amplificación por PCR con los mismos oligonucleótidos *guaB*. De este experimento resultó un plásmido recombinante denominado pMC6, el cual, al ser analizado con enzimas de

restricción se comprobó que está constituido por el vector pIC20H y un inserto *EcoRI* de 8 kb.

Además, la comparación de estos resultados con los datos disponibles del análisis de la secuencia *guaB*::Tn5lux del mutante 10.T (Riccillo, 2001), permitió confirmar la identidad *guaB* de la región clonada. La figura 3 muestra un mapa de restricción de la región clonada de *R. tropici* que posee la secuencia *guaB*.

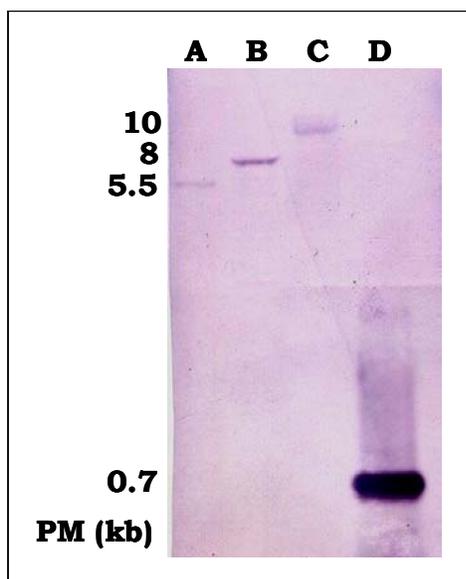


Figura 2: Análisis de hibridación de ADN genómico usando como sonda un fragmento interno del gen *guaB*. El ADN total de las especies *S. meliloti* (A), *R. tropici* (B) y *R. etli* (C) fue digerido con la endonucleasa *EcoRI*. El fragmento *guaB* utilizado como sonda (D) fue marcado en la reacción de amplificación con dATP biotinilados. En el lado izquierdo de la figura se indican los tamaños de las bandas que hibridaron con la sonda.

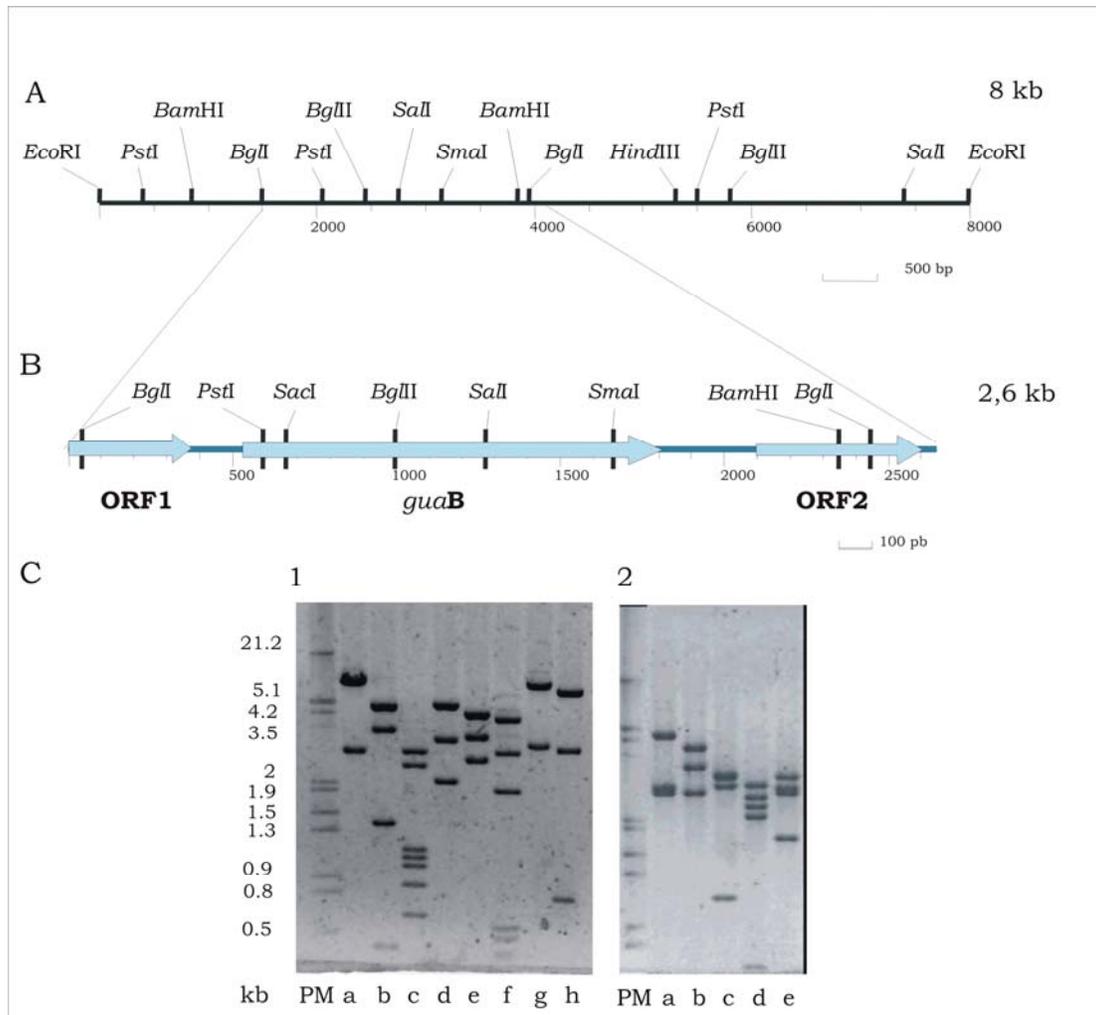


Figura 3: Mapa de restricción de la región cromosomal que contiene al gen *guaB*.

Panel A: Mapa de restricción de la región de 8 kb clonada en el plásmido pMC6, los sitios de reconocimiento encontrados por mapeo de restricción y los determinados mediante el análisis informático (**Panel B**) de la región secuenciada fueron coincidentes.

Panel C: Electroforesis en geles de agarosa de ADN del plásmido pMC6 digerido con las siguientes enzimas de restricción, **gel 1** calles: a) *EcoRI*, b) *PstI*, c) *BglII*, d) *BglIII*, e) *SalI*, f) *SacI*, g) *SmaI*, h) *BamHI*, **gel 2** calles a) *HindIII*, b) *SmaI* y *SalI*, c) *SmaI* y *XhoI*, d) *SmaI* y *BglIII*, e) *SmaI* y *HindIII*. La primera calle a la izquierda de la figura corresponde al marcador de peso molecular (PM) ADN λ digerido con *EcoRI* y *HindIII* (Promega).

Organización génica de la región *guaB* de *R. tropici*

Con el fin de determinar la organización de la región *guaB* de *R. tropici* encaramos un análisis comparativo con las secuencias presentes en la base de datos de secuencias nucleotídicas. En este análisis también se hizo uso de los datos de secuencia de nuestro laboratorio que fueran publicados previamente por Riccillo *et al.* (2000).

El análisis bioinformático de las regiones vecinas adyacentes a los extremos 5´- y 3´- del gen *guaB* reveló dos marcos de lectura abiertos en el orden ORF1-*guaB*-ORF2. En la figura 4 se muestra la organización génica en las regiones adyacentes al gen *guaB* de varias especies de rizobios. Este análisis también reveló la conservación en el extremo 5´, en que el ORF1 precede al gen *guaB*. Por el contrario, la región 3´ del gen *guaB* es variable en los genomas analizados, de manera que el ORF2 identificado en *R. tropici* es propio de esa especie. Además, este ORF2 no presenta homología significativa con las secuencias disponibles en la base de datos pública de nucleótidos y proteínas.

También se comparó la secuencia aminoacídica deducida del ORF1 con secuencias del banco de datos. El dato de secuencia ORF1 de *R. tropici* usada en este análisis corresponde a una secuencia parcial de 104 residuos aminoacídicos; la comparación entre nuestra secuencia parcial y las respectivas secuencias homólogas y completas extraídas de las bases de datos nos mostró que el codón de iniciación se encontraría a aproximadamente 220 residuos río arriba del codón ATG de nuestra secuencia parcial, el cual correspondería a un codón interno de la secuencia de codificación. El mayor grado identidad del ORF1 se da con secuencias presentes en el genoma de *S. meliloti* (63%), *A. tumefaciens* (62%), *M. loti* (45%) y *R. etli* (42%) (Figura 5). Estas secuencias codificarían para proteínas pertenecientes a la familia de las metalo- β -lactamasas (Kaneko *et al.*, 2000; Wood *et al.*, 2001, Galibert *et al.*, 2001, Ramirez-Romero *et al.*, 1997). Además, mediante la búsqueda de dominios proteicos en el ORF1 usando programas específicos de acceso público (www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/ y www.sanger.ac.uk/cgi-bin/Pfam/), se identificó el dominio GloB el cual caracteriza a todas las proteínas hidrolasas dependientes de Zn.

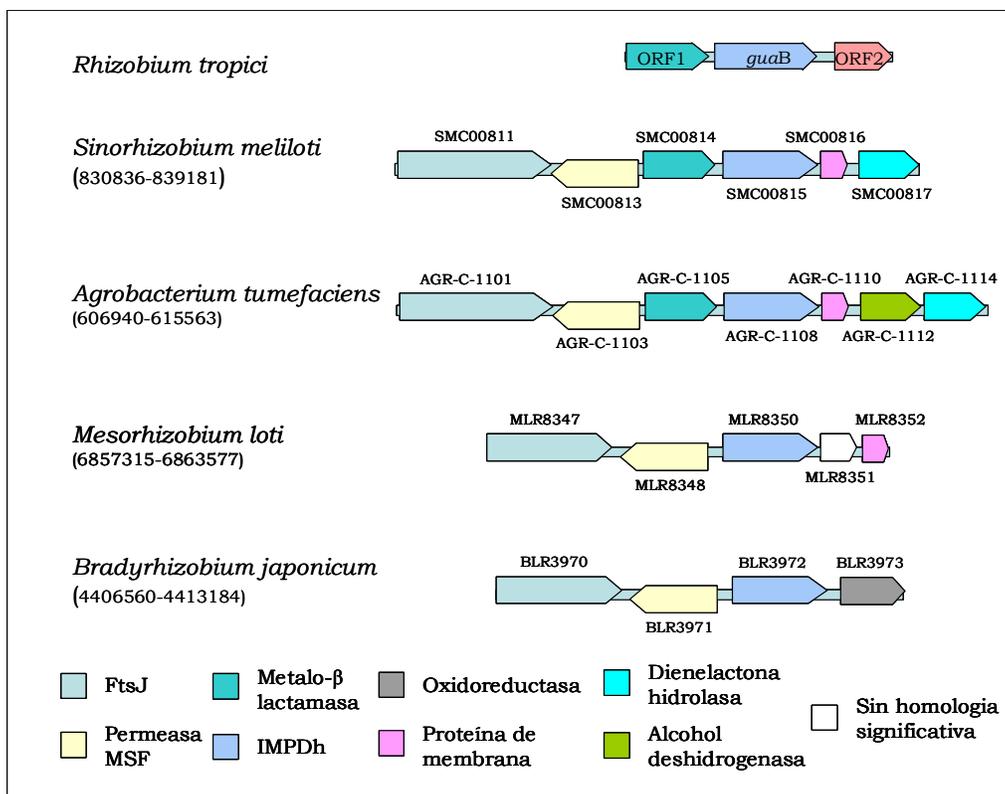


Figura 4: Organización génica de la región cromosomal que contiene al gen *guaB* en los rizobios. Los marcos de lectura homólogos son representados con bloques de igual color, los nombres para cada marco corresponden a los números adjudicados en el banco de datos de secuencias GenBank. En el margen inferior se indican las posibles homologías asignadas por comparación de secuencias con otras especies.

Análisis de la actividad betalactámica en *R. tropici*

Atentos a los resultados del análisis de la región *guaB*, encaramos un análisis funcional del ORF1 descrito precedentemente. Las proteínas metalo- β -lactamasas constituyen una numerosa superfamilia de proteínas las cuales actúan sobre una variedad de substratos. Este clan incluye las β -lactamasas clase B con actividad de hidrólisis de betalactámicos, glyoxilasas II, flavoproteínas tipo A, arilsulfatasas, cAMP fosfodiesterasas, CMP-NeuAc hidrolasas y la proteína PhnP (Aravind, 1999; Daiyasu *et al.*, 2001). Un grupo separado de metalo- β -lactamasas está integrado por proteínas de unión a ácidos nucleicos, algunas de las cuales se encuentran involucradas en la reparación de ADN, como es el caso de las proteínas Artemis, SNM1 y PSO2,

mientras que otras proteínas, como el factor de clivaje y poliadenilación –CPSF– participan del procesamiento de ARN en eucariotas (Callebaut *et al.*, 2002).

Las proteínas metalo-βlactamasas clase B son enzimas zinc dependientes que poseen actividad de hidrólisis de la mayoría de los antibióticos beta-lactámicos, con particular eficiencia para inactivar los carbapenemos (Rasmussen y Bush, 1997). Teniendo en cuenta la homología encontrada entre el ORF1 y posibles metalo-beta-lactamasas, investigamos si *R. tropici* expresa actividad betalactámica. Con este objetivo ensayamos la tolerancia a estos antibióticos para lo cual realizamos un antibiograma mediante la técnica de difusión en ágar (ver Capítulo II) empleando discos con el antibiótico imipenem (Britania). Este antibiótico pertenece al tipo carbapenem y resulta inactivado por la acción de las metalo-beta-lactamasas. En este ensayo se incluyeron como controles de sensibilidad y resistencia las cepas *E. coli* DH5α y *Stenotrophomonas maltophilia*, respectivamente (Sanschagrín *et al.*, 1998). También, evaluamos la actividad betalactámica de las cepas *E. coli* DH5α y *R. tropici* conteniendo el plásmido pMC9, el cual contiene el ORF1 de *R. tropici* clonado en el vector replicativo en los rizobios pSUP104.

La evaluación del ensayo consistió en determinar el tamaño del halo de inhibición que se forma alrededor del disco que contiene el antibiótico. De acuerdo a las especificaciones del fabricante de los discos, los diámetros de inhibición esperados son de ≤13mm para una cepa resistente, entre 14 y 15 mm para una cepa de tolerancia intermedia y ≥ a 16 mm para una cepa sensible. En los ensayos realizados con las cepas *E. coli* DH5α y *Sthenotrophomona maltophilia* los halos de inhibición promedio fueron de 30 mm y 15 mm respectivamente. En la cepa *E. coli* DH5α (pMC9) el diámetro promedio de inhibición fue de 30 mm, similar a la cepa sensible. Con las cepas CIAT899 y CIAT899 (pMC9), las inhibiciones fueron coincidentes con los de las cepas sensibles al antibiótico (Figura 6). Estos resultados nos permiten concluir que el *R. tropici* no expresa actividad propia de una proteína betalactámica, lo cual teniendo en cuenta el alto grado de homología entre el ORF1 y genes de la familia de proteínas, y su conservación en los rizobios, sugieren que el ORF1 podría codificar para alguna otra proteína también miembro de dicha superfamilia de metalobetalactamasas pero con una función distinta.

```

S. meliloti:      ISAMAAFGHSPGHMIYRLES D GKAMILTADTANHYVLSLQRPDWEVRFDMDK
A. tumefaciens: ITGIAAFGHSPGHMIFRVESEGKQLILTADTANHFVLSLQKPDWEVKFDMDK
R. tropici:      MTAMLAPGNTPGHLVHFHLESGGRQLVMTGDTANHYVLSLGRPDWEVRFDLDK
M. loti:         ITAIDASGHSPGLLAFLVESGGQRLLIWSDAFLHYVVSIOHPFWHADFDLDDK
R. etli:         --AISAPGHTLGHHCFMLQSGNDRI C FLGDLTHHHILLMERPMMEFRYDTPD

S. meliloti:      PAASASRKKVFDMIATDRLPFIGYHMPFPSVGFVESQDQGYRFVPA SYQFDI
A. tumefaciens:  AAAAA TRKKVYDMIATDRLPFLGYHMPFPSVGYAEKLDTCYRFVPKSYQFDI
R. tropici:      PQAAKTRRRIFDMIADRIPFLGFHMPFPAVGFVEKQPEGFYRVPKSYQFDV
M. loti:         ERAIETRKRLLKMAADQRLLVAGHHMPFPGLYIESVNGSFRWLPVSYQLN-
R. etli:         KLSARSRTRVLDMLATDRIAVMSYHFAWPGACHVVRNGDGFYRIPSPMO---

```

Figura 5: Alineación múltiple de secuencias homólogas al ORF1 de *R. tropici*. Debido a que la secuencia disponible del ORF1 es parcial, el alineamiento corresponde a los últimos 104 residuos en el extremo C-terminal de las proteínas. Los sombreados corresponden a diferentes grados de similitud: negro 100%, gris oscuro $\geq 80\%$, gris claro $\geq 60\%$, blanco $< 60\%$. Números de acceso de GenBank/EMBL de las secuencias aminoacídicas analizadas: *S. meliloti* NP_384865, *A. tumefaciens* NP_531322, *R. tropici* AAF85967.1, *M. loti* BAB 48742, *R. etli* NP_659930.

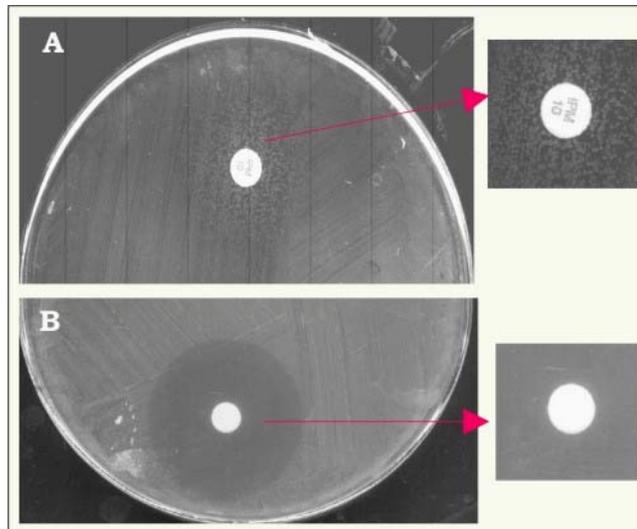


Figura 6: Ensayo de actividad β lactámica mediante antibiograma por difusión en ágar con discos de Imipenem. Se analizó la actividad metalo- β lactámica de las cepas *S. maltophilia* (A) y CIAT899 (pMC9) (B). A la derecha de la figura la amplificación de la región cercana al disco muestra el crecimiento de las colonias resistentes de *S. maltophilia* y la ausencia de crecimiento en la cepa CIAT899 (pMC9).

Los genes *guaA* y *guaB* de *R. tropici* no están asociados físicamente

Dado que la región *guaB* clonada de *R. tropici* como un fragmento *EcoRI* no ha sido secuenciada en su totalidad, lo cual nos permitiría encarar un análisis informático, investigamos la presencia del gen *guaA* en la región a través de análisis de hibridación.

La sonda utilizada en este ensayo fue un fragmento interno del gen *guaA* amplificado a partir del ADN total de *R. tropici* utilizando los oligonucleótidos, GUAAF 5'-TATGCCGTCCAGTTCCACCCG-3' y GUAAR 5'-CGACATTGTGGTGCGACTTGAT-3'. Estos cebadores fueron diseñados a partir de las regiones conservadas del gen *guaA* de las especies *E. coli*, *B. subtilis*, *S. meliloti* y *B. burgdorferi*. El producto de PCR de *R. tropici* fue clonado en el vector pGemT-easy, resultando en el plásmido pMC29. La comparación de las secuencias aminoácidas deducidas del producto de PCR y del gen *guaA* de *S. meliloti* demostró una identidad del 82%. Estos resultados confirmaron que el fragmento de PCR amplificado del genoma de *R. tropici* y clonado en el plásmido pMC29 corresponde al gen *guaA*, y que el mismo presenta una alta homología con la secuencia *guaA* de *S. meliloti* comprendida entre las posiciones nucleotídicas 511pb y 1069pb de la región de codificación.

En el ensayo de hibridación analizamos individualmente el ADN genómico digerido de *R. tropici* y el plásmido pMC9, el cual porta la región *guaB* de 8 kb clonada en el plásmido replicativo en rizobios pSUP104. Como se muestra en la figura 7, no se detectó banda alguna en el caso del plásmido pMC9, mientras que en el ADN total de *R. tropici* –digerido respectivamente con endonucleasas *EcoRI* y *HindIII*- se observaron bandas de 0.8 kb y 3.7 kb respectivamente. Este resultado indicó que en el gen *guaA* no se localiza en el fragmento cromosomal *EcoRI* de 8 kb que contiene al gen *guaB*.

Además, se ensayó la complementación del mutante *GuaA*⁻ de *E. coli* (AT2465) con el plásmido pMC9. El mutante conteniendo el plásmido no recuperó la capacidad salvaje de crecimiento en medio mínimo.

Los resultados del ensayo de hibridación y de complementación constituyen evidencias fuertes para concluir que en *R. tropici* el gen *guaA* se encuentra en una región genómica distinta a la del gen *guaB*. Asimismo, los patrones de hibridación de ADN genómico utilizando la sonda *guaA* indican que este gen se

encuentra en una copia única comprendida en un fragmento *Hind*III de aproximadamente 3,7 kb y, una parte del gen (la secuencia que incluye la sonda utilizada), se encuentra presente en un fragmento *Eco*RI de 0.8 kb.

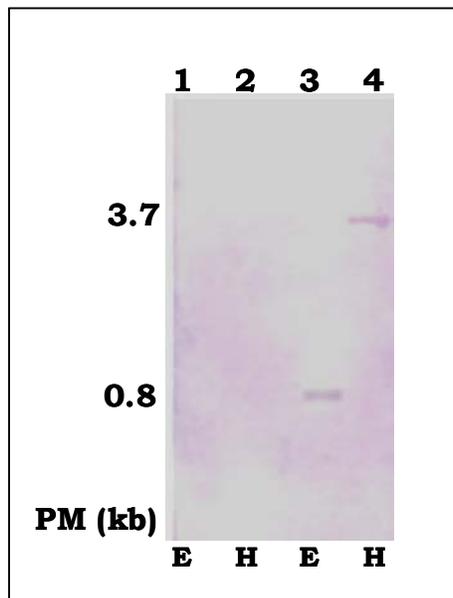


Figura 7: Análisis de hibridación del plásmido pMC9 y del ADN genómico de *R. tropici* con una sonda para el gen *guaA*. El plásmido pMC9 (1 y 2) y el ADN genómico de *R. tropici* (3 y 4) fueron digeridos con las endonucleasas *Eco*RI (E) o alternativamente *Hind*III (H). La sonda *guaA* consistió en el fragmento de PCR sintetizado en presencia de dATP biotinilados.

Secuencias conservadas en la región 5' adyacente al gen *guaB* de los rizobios

Con el fin de investigar la presencia de secuencias que podrían funcionar como promotores de la transcripción del gen *guaB*, se realizó un análisis informático a través del alineamiento múltiple de la secuencia nucleotídica intergénica que se encuentra entre el codón de terminación del ORF1 y el codón de inicio del gen *guaB* de las especies *R. tropici* (AF272827), *S. meliloti* (Smc00815), *A. tumefaciens* (NC_003304.1) y *R. etli* (Centro de Fijación de Nitrógeno, UNAM México, comunicación personal a Dr. M. Aguilar). Como se ilustra en la figura 8, en los rizobios se identificaron dos regiones muy conservadas (en fuente roja resaltada); una de las mismas se encuentra

El uso del programa NNPP (Neural Network Promoter Prediction-www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html), diseñado para la búsqueda de posibles regiones promotoras, nos permitió identificar una secuencia localizada a 107 pb del ATG como una posible región promotora, indicando como inicio de la transcripción el residuo C y como posible secuencia promotora -10 a las secuencias señaladas en recuadro en la figura 8. Si bien la significancia asignada por el programa informático NNPP a esta secuencia como posible secuencia promotora es baja (0.35 en una escala de 0 a 1), la región señalada se conserva en los rizobios, siendo además similar a la secuencia que se encuentra alrededor de la posición -10 del gen *guaB* de *E.coli* –consistente en un consenso TATAAT- (Davies y Drabble, 1996), la cual también es detectable en los genes estructurales de *B. japonicum* analizados por Beck *et al.* (1997). Este análisis y la conservación de la secuencia TATTT observada en los distintos rizobios, sugieren que la misma podría participar en la regulación de la expresión del gen *guaB* de los rizobios.

El gen *guaB* salvaje complementa la cepa mutante CIAT899.10T

Con el fin de confirmar que el fenotipo defectivo observado en la cepa mutante CIAT 899-10.T es sólo consecuencia de la alteración del gen *guaB*, se realizaron ensayos de complementación del mutante con el gen salvaje, en los cuales se evaluaron el crecimiento en condiciones de estrés térmico y el fenotipo simbiótico con poroto. Para disponer del gen *guaB* de *R. tropici*, se amplificó por PCR el fragmento *guaB* que comprende la región de codificación, sin su secuencia promotora, utilizando oligonucleótidos específicos diseñados en nuestro laboratorio y ADN molde de *R. tropici* CIAT899, (GuaB1 5´GGT AGA CGA ATT CGT TCC GGG 3´; GUAB2 5´ GAT TTA AGG AAT TCT GCA GTA 3´). Como se representa en la figura 9, el producto de PCR (1.5 kb) fue clonado en el vector pGem-T easy resultando en el plásmido pMC0; posteriormente se liberó el fragmento de PCR como un fragmento *EcoRI* y el mismo se ligó al vector pSUP204 digerido con la misma enzima. El marco de lectura del gen *guaB* fue clonado en las dos orientaciones posibles respecto al promotor del gen de resistencia a cloramfenicol (*cat*) localizado en la secuencia del vector, lo que resulta en los plásmidos pMC1, con el gen *guaB* dirigido por el promotor *cat*, y pMC2, con el inserto en dirección opuesta al gen *cat*.

Los plásmidos pMC1 y pMC2 fueron transferidos individualmente por conjugación a la cepa mutante CIAT 899-10.T. La presencia de los mismos en los transconjugantes Tc^R fue confirmada mediante su visualización en un gel tipo Eckhardt.

Las cepas CIAT899-10.T y CIAT899-10.T (pMC1) fueron ensayadas en su tolerancia a altas temperaturas en medio mínimo GTS, líquido o agarizado, de acuerdo con las condiciones descritas por Riccillo y col. (2000) para la selección de mutantes sensibles a la resistencia térmica. Hemos descrito que la cepa mutante CIAT 899-10.T es prototrófica en condiciones normales de crecimiento, e incapaz de crecer en condiciones de altas temperaturas. Por otra parte, en medio líquido a 28°C la velocidad de crecimiento de este mutante es menor a la de la cepa salvaje (Riccillo *et al.*, 2000).

Como se muestra en la figura 10, el ensayo de crecimiento demostró que la cepa mutante CIAT889-10.T (pMC1) recuperó la capacidad de crecer en placa a 40°C, aún en presencia de allopurinol, demostrando la funcionalidad de la vía que comprende la inosina monofosfato deshidrogenasa. Además, la velocidad de crecimiento del mutante complementado en medio líquido a 28°C fue similar a la observada con la cepa salvaje, con un tiempo de generación promedio de 3 horas (Figura 11). La presencia del plásmido pMC2 no modificó el comportamiento de la cepa mutante en condiciones de estrés térmico, indicando que el efecto positivo es causado por la expresión del gen *guaB* dirigida por el promotor presente en el vector.

Asimismo, examinamos el fenotipo simbiótico del mutante complementado con el plásmido pMC1 en ensayos de inoculación de plantas de poroto. Similar a lo observado en los ensayos de tolerancia térmica, la presencia del plásmido pMC1 restauró el fenotipo simbiótico salvaje. Efectivamente, después de cuatro semanas de la inoculación, el tamaño, color y la distribución de los nódulos inducidos por la cepa CIAT 899-10.T (pMC1) fueron comparables a los nódulos formados por la cepa salvaje. Asimismo, luego de seis semanas de riego con solución mineral libre de nitrógeno, las plantas inoculadas con la cepa mutante complementada no presentan el aspecto clorótico propio de las plantas deficientes en nutrientes nitrogenados (Figura 12).

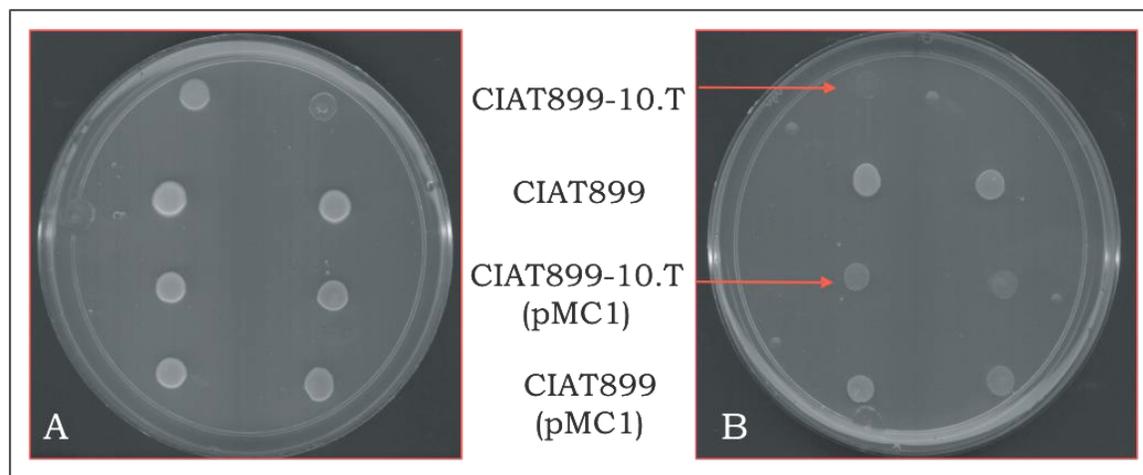


Figura 10: Ensayo de tolerancia térmica de la cepa CIAT899-10.T (pMC9) en medio agarizado. Los cultivos fueron incubados en medio mínimo hasta fase exponencial temprana (DO_{600} 0.4-0.5). Se sembraron 2 μ l de una dilución 10^{-1} (línea izquierda) y 10^{-2} del cultivo (línea derecha) en dos cajas de medio mínimo GTS agarizado. Las placas fueron incubadas durante 36 horas a 28°C (Placa A) o 40°C (Placa B).

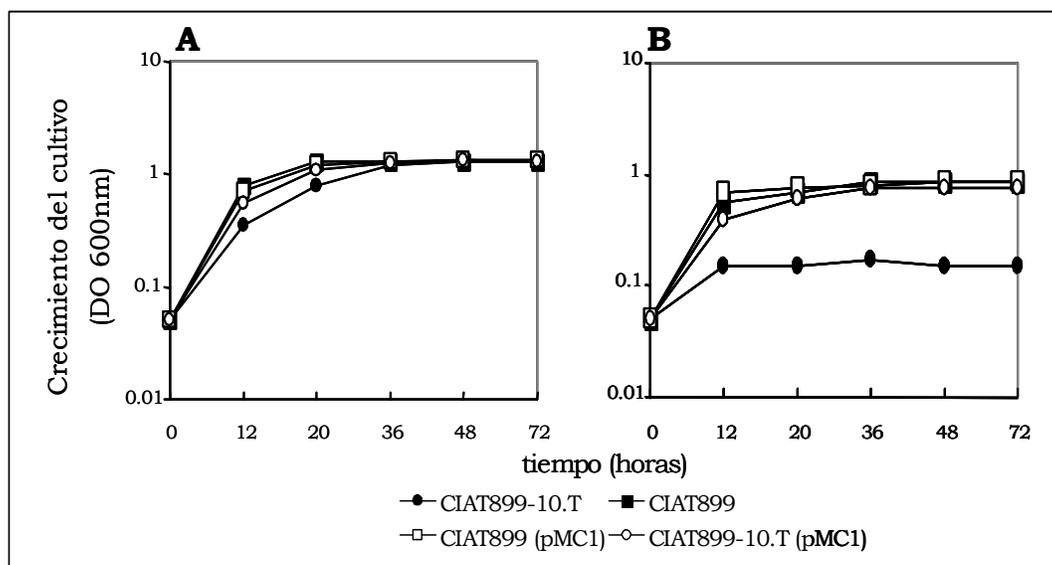


Figura 11: Crecimiento del mutante CIAT899-10.T complementado con el gen *guaB* en condiciones de estrés térmico. Los cultivos de las cepas salvaje y mutante CIAT899-10.T portando el plásmido pMC1 fueron incubados en medio mínimo líquido a 28°C (A) o 38°C (B). Los datos presentados corresponden a valores promedios de tres repeticiones.

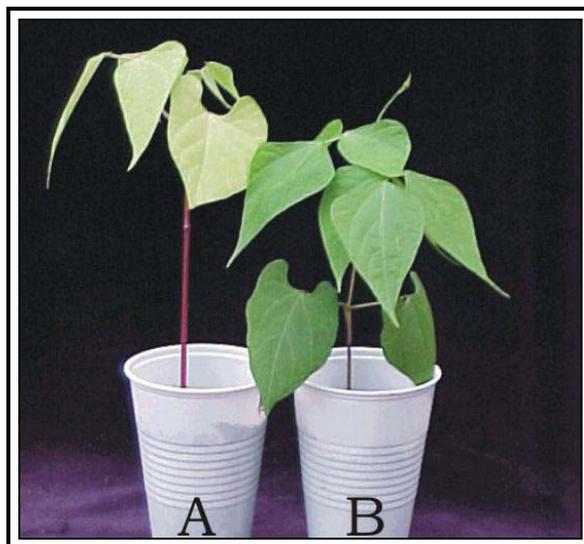


Figura 12: Complementación del mutante CIAT899-10.T con el plásmido pMC1 en la nodulación de plantas de poroto. Se observa el aspecto clorótico de las plantas inoculadas con la cepa mutante CIAT899-10.T (A); en contraste con las plantas noduladas por la cepa mutante con el plásmido pMC9 (B).

El rol de los intermediarios de purina en la simbiosis de *R. tropici* con poroto

Si bien los resultados descriptos en la sección anterior demuestran que la expresión del gen *guaB* es necesaria para la nodulación efectiva de poroto, queda por determinar si el fenotipo defectivo del mutante *guaB* se debe a la falta de guanina, el producto final de la vía biosintética, o a la carencia de la actividad IMPd. En los ensayos de inoculación, realizados con el agregado de guanina al sustrato de crecimiento de las plantas, no se observaron diferencias en el fenotipo simbiótico del mutante CIAT899-10.T (Ricillo, 2001). Encaramos entonces la respuesta a este interrogante investigando el fenotipo simbiótico en poroto de un mutante de *R. tropici* afectado también en la vía de síntesis de guanina pero en una etapa distinta. Elegimos el gen *guaA* que corresponde a la conversión de XMP a GMP catalizada por la enzima GMP sintasa. El uso de este mutante nos habría de poner en la situación de deficiencia de biosíntesis de guanina pero conservando la funcionalidad de *guaB*.

La obtención del mutante *guaA* de *R. tropici* se intentó por mutagénesis específica utilizando el fragmento interno del gen *guaA* clonado en el plásmido pMC29 (que fuera utilizado previamente para investigar la presencia de la secuencia *guaA* en el fragmento *EcoRI guaB* de *R. tropici*). El fragmento *guaA* fue subclonado en el vector pSUP102 -no replicativo en los rizobios- y transferido por conjugación a la cepa *R. tropici* CIAT899. Los transconjugantes se seleccionaron por la resistencia al antibiótico tetraciclina conferida por el vector y fueron analizados mediante hibridación tipo southern para identificar los clones en los que el evento de recombinación se produjo entre las secuencias del gen *guaA*. Los perfiles no fueron coincidentes con el esperado indicando que ninguna de las colonias transconjugantes seleccionadas presentó la región *guaA* alterada.

A partir de este resultado se probaron diferentes variantes en el proceso de mutagénesis dirigida. Así se diseñaron y ensayaron oligonucleótidos en diferentes regiones conservadas del gen para generar mediante PCR distintos fragmentos para su uso en la mutagénesis, la utilización de distintos vectores no replicativos en rizobios (pG18*mob*, pK18*mob*), el enriquecimiento de mutantes auxótrofos en la mezcla de conjugación, y el uso de medios de selección diferentes (medios ricos, mínimos y mínimos adicionados con guanina). En ninguno de los ensayos resultó posible el aislamiento de transconjugantes con el gen *guaA* interrumpido.

Se ha descrito el aislamiento de numerosos mutantes de purina derivados de diversas especies de *Rhizobium* afectados en etapas tempranas de la biosíntesis (Djordjevic *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 1988; Kerppola y Kahn, 1988; Noel *et al.*, 1988; Pain, 1978; Newman *et al.*, 1994, 1995). Las cepas *R. tropici* CIAT899-10T y *S. meliloti* MC.1021 constituyen los únicos ejemplos de rizobios afectados en la vía de síntesis de guanina.

Los experimentos negativos en la obtención de mutantes *guaA* de *R. tropici* parecen indicar que estos mutantes podrían resultar inviables en las condiciones de cultivo ensayadas o alternativamente, que el gen *guaA* se localiza en una región del genoma con una baja frecuencia de recombinación. Concluimos que si bien el análisis del gen *guaA* de *R. tropici* constituye un punto de interés dentro del contexto de nuestro proyecto, las dificultades

experimentales no nos permitieron avanzar en esos momentos en la dirección de encarar la respuesta a la pregunta inicial.

Análisis de la expresión génica en la región *guaB*

La expresión del operón *guaBA* de *E. coli* es regulado por diversos mecanismos que responden a modificaciones en el metabolismo celular (Davies y Drabble 1996, Hutchings *et al.*, 2000). Considerando la esencialidad del gen *guaB* para la simbiosis entre *R. tropici* y poroto y para el crecimiento de la bacteria en condiciones de estrés térmico (Riccillo *et al.*, 2000), es interesante investigar si la expresión del gen *guaB* manifiesta cambios en respuesta a factores tales como el estrés térmico, los niveles de purinas y el ambiente intracelular del nódulo. Decidimos aproximarnos a estos análisis haciendo uso de fusiones génicas a genes reporteros. Por otra parte, con el objeto de profundizar la caracterización de la región *guaB* clonada, investigamos la actividad transcripcional de los marcos de lectura que fueran identificados adyacentes al gen *guaB*.

Actividad transcripcional de los marcos de lectura identificados en la región *guaB*

Se realizaron fusiones entre el gen *lacZ* y los marcos de lectura, ORF1, *guaB* y ORF2, respectivamente. En la figura 15 se representa la estrategia utilizada para la construcción de estas fusiones. Los fragmentos conteniendo cada uno de los marcos de lectura fueron subclonados utilizando los sitios de restricción del plásmido pMC6 identificados previamente. El fragmento *EcoRI-SalI* de 2.7 kb, conteniendo el ORF1 y parte del extremo 5' del gen *guaB*, fue ligado al vector pK18*mob*, digerido con las mismas enzimas, lo que resulta en el plásmido pMC19. La secuencia *lacZ-Gm*, liberada del vector pAB2001 como fragmento *BamHI*, fue insertada en el sitio único *BamHI* del ORF1, originando los plásmidos pMC21, con el inserto en la dirección del ORF1, y pMC22, con el inserto en dirección opuesta (Figura 15.A). Una estrategia similar se utilizó para el clonado del ORF2 y el extremo 3' del gen *guaB*, este fragmento *SmaI-PstI* de 2,5 kb se subclonó en el vector pK18*mob* resultando en el plásmido pMC20. El fragmento *BamHI lacZ-Gm* se insertó en ambas direcciones en el sitio *BamHI*

del plásmido pMC20 situado en la posición 250pb de la región codificante del ORF2, originando los plásmidos pMC23 y pMC24, respectivamente (Figura 15.B).

Para el clonado del gen *guaB*, se removió de pMC6 la región conteniendo este gen y parte de las secuencias de los marcos de lectura adyacentes como un fragmento *Bam*HI de 3 kb. Para insertar la secuencia *lacZ*-Gm en el sitio *Pst*I situado a 120pb de la región codificante de *guaB*, el fragmento *guaB* fue previamente subclonado en el sitio *Bam*HI del vector pUC-4K, el cual al ser digerido con la enzima *Bam*HI pierde los sitios de reconocimiento para la enzima *Pst*I del sitio múltiple de clonado. El plásmido resultante, pMC12, fue digerido con la enzima *Pst*I y posteriormente ligado con el fragmento *Pst*I *lacZ*-Gm del vector pAB2001. El casete *lacZ*-Gm fue clonado en ambas direcciones resultando en los plásmidos pMC15 y pMC16 respectivamente. Estos plásmidos fueron digeridos con la enzima *Bam*HI para liberar el fragmento *guaB-lacZ*-Gm de 7,3 kb el cual fue ligado al vector pK18*mob* digerido con la misma enzima. Los plásmidos originados, pMC17 -derivado del plásmido pMC15- y pMC18 -derivado de pMC16 presentaron el fragmento *guaB-lacZ* inserto en dirección contraria al promotor *lacZ* del vector pK18*mob* (Figura 15.C). En todas las construcciones, las orientaciones fueron determinadas por análisis de restricción.

Resumiendo, se construyeron los plásmidos pMC21, pMC18 y pMC24 los cuales poseen las fusiones: ORF1::*lacZ*, *guaB*::*lacZ* y ORF2::*lacZ*, respectivamente. Asimismo, se construyeron fusiones similares en las cuales el gen *lacZ* resultó insertado en sentido contrario a cada uno de los marcos de lectura -pMC22 en el ORF1, pMC17 en el gen *guaB* y pMC23 para el ORF2- las que fueron utilizadas como control negativo en los ensayos de expresión.

Los plásmidos obtenidos fueron transferidos a las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici* CIAT899 por conjugación bi-parental. Las colonias merocigotas se seleccionaron por su resistencia a Gm adquirida por la integración del plásmido al cromosoma mediante un único evento de recombinación. En la Figura 16 se describen las cepas y sus respectivas fusiones. La nomenclatura adoptada para estos transconjugantes se corresponde con la de las fusiones que portan: MC21, MC22, MC17, MC18,

MC23 y MC24 precedidas del nombre de la cepa que derivan –CIAT899 o CIAT899-10.T.

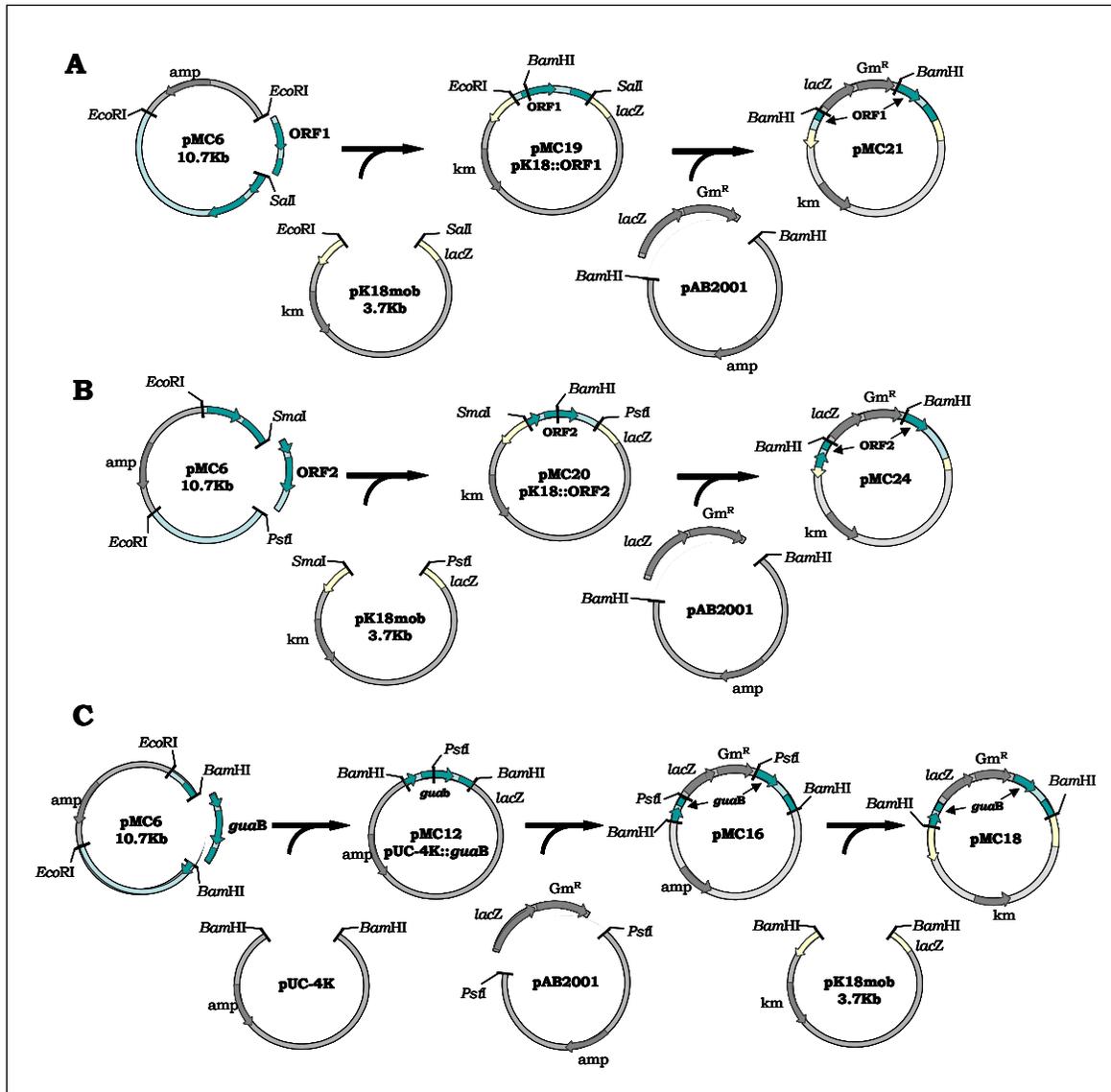


Figura 15: Construcción de las fusiones génicas. En la figura se muestra la estrategia seguida para la construcción de los plásmidos con fusiones entre el gen reportero *lacZ* y los marcos de lectura abiertos de la región *guaB*. **Panel A.** pMC21 (*ORF1::lacZ*), **Panel B.** pMC24 (*ORF2::lacZ*), **Panel C.** pMC18 (*guaB::lacZ*).

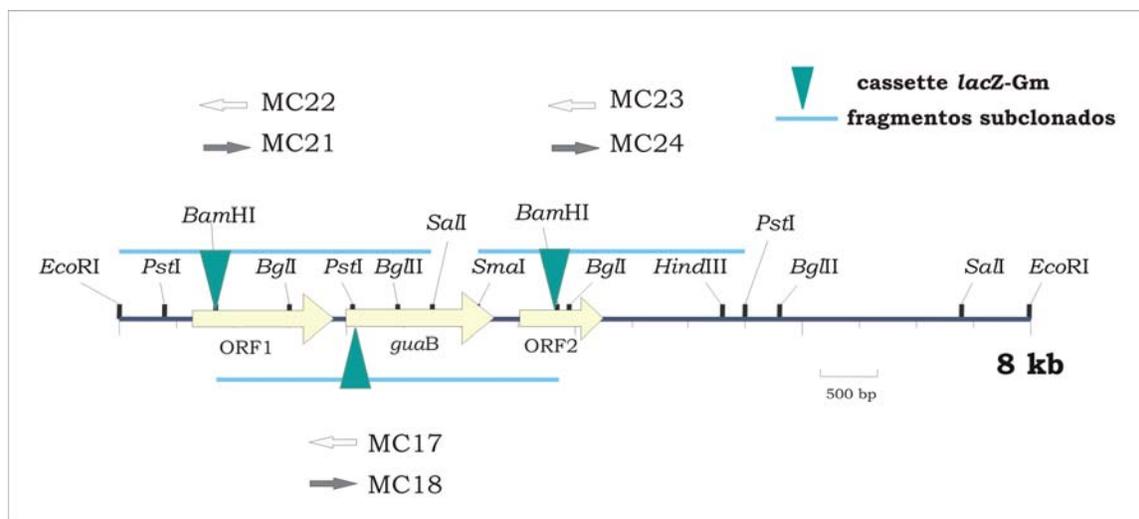


Figura 16: Mapa de las fusiones transcripcionales en la región *guaB* de *R. tropici*. Se indican los fragmentos subclonados (líneas celestes), *EcoRI-SalI*, *SmaI-PstI* y *BamHI-BamHI*, conteniendo los marcos de lectura ORF1, ORF2 y *guaB* respectivamente. Asimismo se señalan los sitios de inserción de la secuencia *lacZ-Gm* (triángulos verdes), así como la denominación de las cepas merocigotas resultantes de la integración plasmídica en cada una de las regiones.

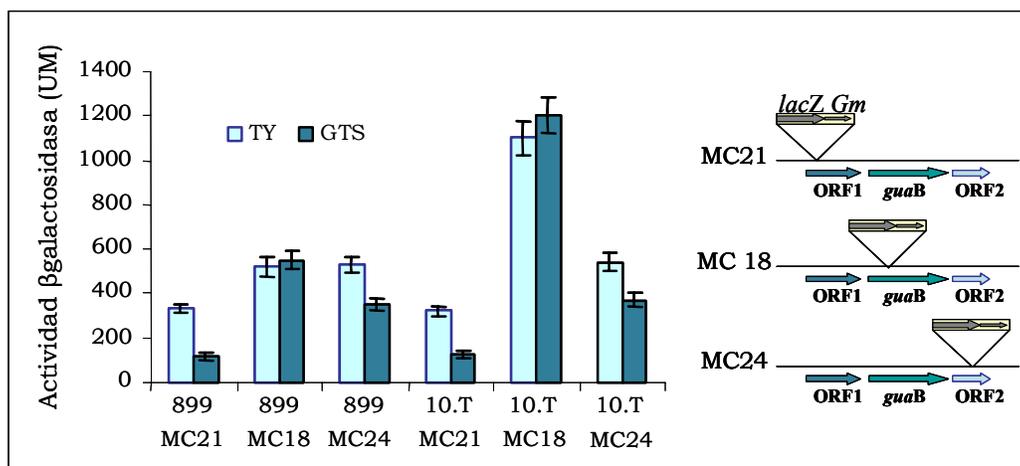


Figura 17: Actividad β-galactosidasa de las cepas MC18, MC21 y MC24 crecidas en medios de cultivo mínimo (GTS) y rico (TY) respectivamente. Los valores corresponden al promedio de por lo menos tres repeticiones independientes.

En los ensayos de expresión, se determinó la actividad β -galactosidasa de las células provenientes de los cultivos en fase exponencial incubados a 28°C en medio rico (TY) o en medio mínimo (GTS). Los resultados de estos ensayos se presentan en la figura 17. Los merocigatas que portan las fusiones en el sentido de los tres marcos ensayados mostraron actividad β -gal superiores a la expresión basal (considerando expresión basal a la actividad β -gal observada en la cepa salvaje), mientras que por el contrario la actividad de aquellas cepas con el gen *lacZ* insertado en sentido opuesto no superan el valor de 40 UM. Las cepas CIAT899.MC21 (ORF1::*lacZ*) y MC24 (ORF2::*lacZ*) presentan mayor actividad en condiciones de medio rico. Contrariamente, la cepa CIAT899.MC18 (*guaB*::*lacZ*) presentó niveles similares de actividad β -galactosidasa en ambos medios. Además, el nivel de expresión de esta fusión en la cepa mutante *guaB* resultó el doble con respecto a los valores observados en la cepa salvaje independientemente del medio ensayado. Por el contrario, la actividad de la fusión ORF2::*lacZ* en el mutante *guaB* presenta los mismos niveles de actividad que los observados en la cepa salvaje (Figura 18).

Concluyendo, la actividad de las fusiones MC18, MC21 y MC24 indican que los marcos de lectura ORF1, *guaB* y ORF 2 se corresponden a genes activos. La expresión del ORF2 no resulta afectada por la mutación en el gen *guaB*, indicando que la transcripción de ORF2 y *guaB* ocurre en forma independiente. Por otra parte, los niveles de expresión de las cepas CIAT899 y CIAT899-10.T indican que la transcripción del gen *guaB* se activa en el mutante defectivo en IMPd, lo cual podría deberse a la acumulación del substrato (IMP) y/o bajos niveles de productos guanilados (ej. xantina o guanina) los cuales actuarían como inductores de la expresión. Además, en todas las condiciones ensayadas la actividad transcripcional del gen *guaB* fue mayor que la observada en el ORF1, lo que nos permite suponer que el gen *guaB* se transcribe en forma independiente. Esta hipótesis podría confirmarse analizando el fenotipo de un mutante en el ORF1 y midiendo la expresión del gen *guaB* en este mutante. La respuesta de este ensayo se encaró en el párrafo siguiente. Para alcanzar este objetivo se diseñó un par de oligonucleótidos específicos que permiten amplificar un fragmento interno del ORF1. El fragmento de 320pb resultante de la amplificación fue clonado en el vector pSUP102, y transferido a

R. tropici mediante conjugación biparental. Ninguno de los transconjugantes Tc^R analizados por hibridación se correspondió con el reemplazo génico o alteración en la región del ORF1. Alternativamente, como estrategia para investigar la presencia de un ARN mensajero del gen *guaB* independiente de la transcripción del ORF1, se analizó la actividad promotora en la región intergénica ORF1-*guaB* mediante el uso de fusiones traduccionales, los resultados de este ensayo se presentan en secciones posteriores.

Las purinas exógenas afectan negativamente la expresión del gen *guaB* de *R. tropici*

Con el objeto de analizar el perfil de expresión del gen *guaB* de *R. tropici*, investigamos la actividad de la fusión MC18 (*guaB::lacZ*) bajo diferentes condiciones de cultivo.

En las cepas salvaje y mutante *guaB*, la actividad de la fusión MC18 fue mayor en bacterias que se encontraban en la fase exponencial temprana (DO 0.4-0.6) comparada con la actividad observada en cultivos de fase estacionaria. Asimismo, en la cepa mutante *guaB* el nivel de actividad fue el doble comparado con la cepa salvaje, independientemente de la fase de crecimiento (Figura 18).

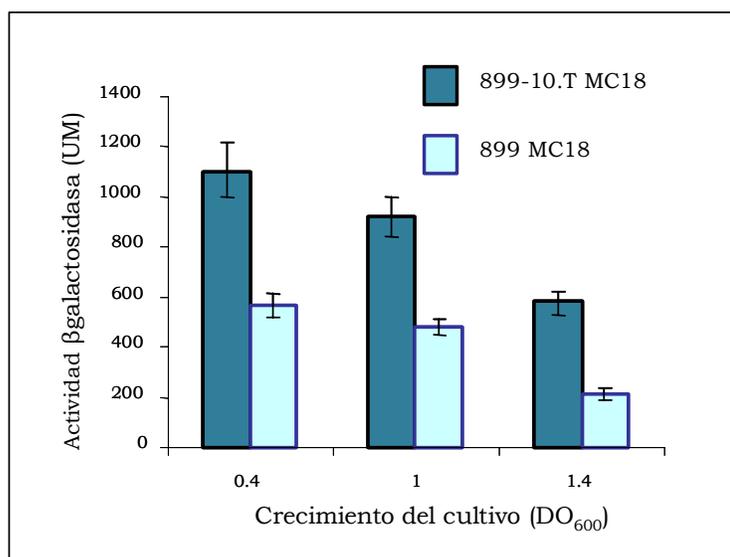


Figura 18: Niveles de expresión del gen *guaB* de *R. tropici* en las diferentes etapas de crecimiento del cultivo. Se indican los valores promedios de la actividad de la fusión *guaB::lacZ* medida en diferentes etapas del cultivo en las cepas salvaje y mutante *guaB*.

Considerando que la actividad de la fusión *guaB::lacZ* es mayor en la cepa mutante *guaB* en comparación con la cepa salvaje, investigamos el efecto del agregado de purinas en el medio. En estos ensayos, las bacterias crecieron en medio mínimo hasta la fase exponencial temprana (0.3-0.4 DO600nm), en esta etapa de crecimiento, se adicionaron respectivamente al medio los nucleótidos guanina, xantina, adenina e hipoxantina en concentración 0.3mM final. Luego de cuatro horas de incubación se tomaron muestras para determinar la actividad β -galactosidasa. En los cultivos suplementados con guanina y xantina, la actividad de la cepa CIAT899-10.T.MC18 disminuyó a niveles similares a los presentados por la cepa salvaje (Figura 19.A). Mientras que en los medios suplementados con adenina e hipoxantina, la reducción de actividad β -gal se observó luego de 12 horas (Figura 19.B). En contraste, encontramos que la presencia de las purinas en el medio no afecta la expresión del gen *guaB* en la cepa salvaje (Figura 19.A y B).

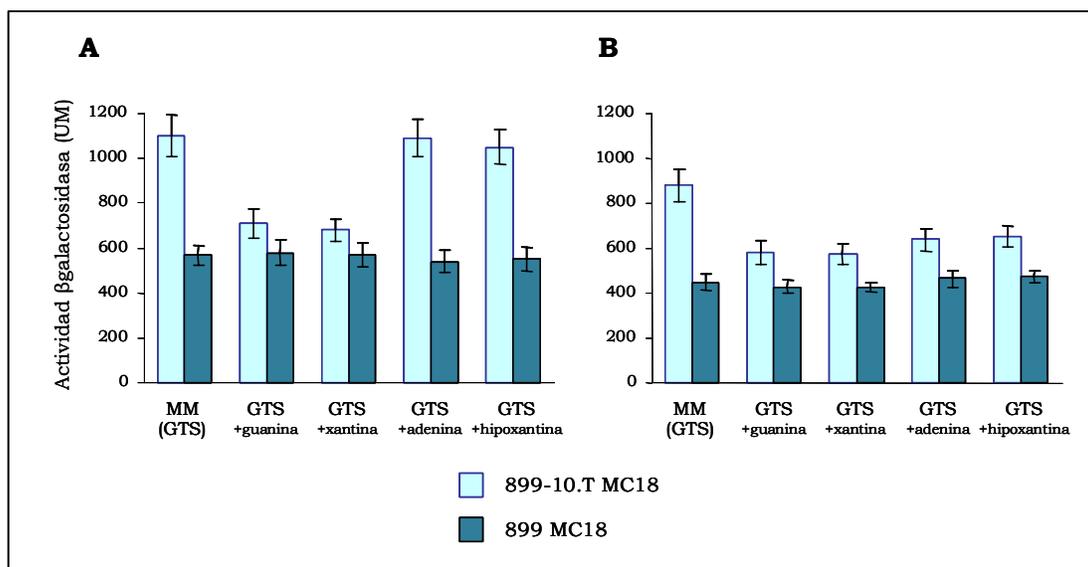


Figura 19: Efecto de la adición de purinas sobre la expresión de la fusión *guaB::lacZ*. Se muestran los niveles promedio de actividad β -galactosidasa en las cepas 899MC18 y 899-10.T. MC18. **Panel A** Actividad a las 6 horas desde la suplementación con las purinas. **Panel B** Actividad luego de 12 horas de la adición al medio con las purinas.

Se investigó además, la expresión del gen *guaB* en condiciones de estrés térmico. Los cultivos de 28°C en fase exponencial fueron sometidos a estrés de temperatura -45°C- durante diferentes tiempos de incubación (15, 30, 60 y 120 minutos). La actividad de la fusión *guaB::lacZ*, medida en las cepas salvaje y mutante *guaB*, no experimentó modificaciones en el curso del tiempo de estrés ensayado.

En conclusión, la actividad de la fusión *guaB::lacZ* es mayor en cultivos en fase exponencial, este resultado indicaría que la expresión del gen *guaB* es afectada por la velocidad de crecimiento de la bacteria. Por otro lado, el estrés de temperatura no afecta el patrón de expresión del gen. Asimismo, considerando el mayor nivel de actividad de la fusión *guaB::lacZ* detectado en el mutante CIAT899-10.T y dado que este nivel es afectado negativamente por la presencia de guanina y xantina en el medio, podemos concluir que la transcripción del gen *guaB* es afectada negativamente por los niveles aumentados de purinas que actuarían como represores.

Análisis de la expresión de la región 5' adyacente al gen *guaB*

Con el objeto de delimitar la región 5' al gen *guaB* que presenta actividad promotora, se construyeron fusiones traduccionales entre dicha secuencia y el gen reportero *lacZ*. Primeramente, la secuencia comprendida entre 500 pb río arriba del codón inicial y 400pb de la secuencia codificante fue amplificada con los oligonucleótidos específicos 1OT1 –descrito en sección anterior- y 10TR4 5'-TGCGACTTTTCGACGACCGGG-3'-diseñado por Riccillo (2000) utilizando como molde el plásmido pMC6. El fragmento amplificado se clonó en vector pGemT-easy. El plásmido resultante, pMC3, fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *PstI*, liberando el fragmento comprendido entre 500 pb río arriba del ATG hasta las primeras 60 pb de la secuencia codificante del gen. Este fragmento fue ligado al plásmido pNM482 (Minton *et al.*, 1984), previamente digerido con las mismas enzimas, generando una fusión en fase con el gen *lacZ*. Las colonias de *E. coli* con el plásmido construido, pMC4, presentaron actividad β galactosidasa ensayada en medio sólido. La fusión *guaB-lacZ*, liberada como fragmento de 4 kb *EcoRI-DraI*, fue subclonada en el sitio *EcoRI* del vector pSUP204 en dirección contraria al promotor de cloramfenicol (Figura 19). El plásmido resultante,

pMC5, fue transferido por conjugación biparental a *R. tropici*. La presencia del plásmido en los transconjugantes Tc^R fue confirmada mediante el análisis en gel tipo Eckardt (1978).

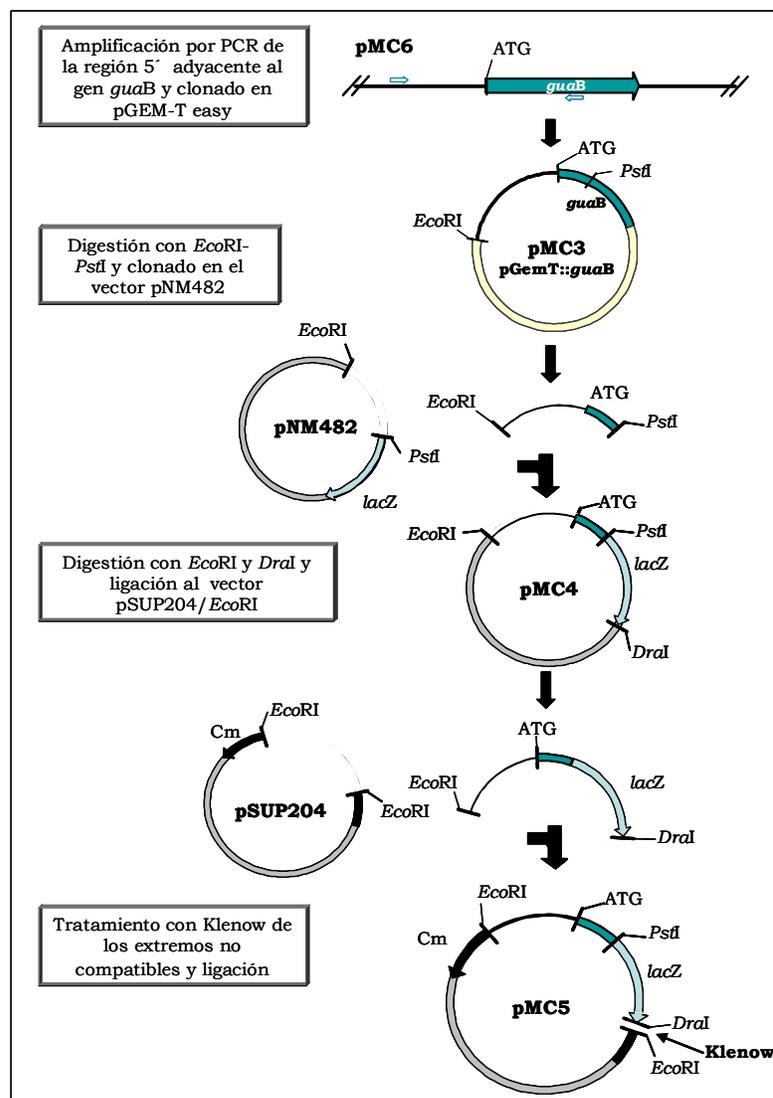


Figura 20: Estrategia seguida para la construcción de una fusión traduccional *guaB-lacZ*. La secuencia que comprende la región 5' intergénica entre el ORF1 y el gen *guaB* y parte de la secuencia codificante del gen *guaB* fue amplificada y posteriormente clonada en el vector pGem-T easy, lo que resulta en el plásmido pMC3. Posteriormente la región 5' adyacente al gen *guaB* fue liberada como fragmento *EcoRI*-*PstI* y clonada en el plásmido pNM482, generando una fusión en fase con el gen *lacZ*. La fusión *guaB-lacZ* fue liberada como fragmento *EcoRI*-*DraI* por digestión del plásmido pMC4, y ligada al plásmido pSUP204 digerido previamente con la enzima *EcoRI*. Se ligaron los extremos compatibles y posteriormente la mezcla de ligación fue tratada con el fragmento Klenow de la enzima ADN Polimerasa I con el objeto de hacer romos los extremos no compatibles *DraI* y *EcoRI*. La ligación de estos extremos romos resultó en el plásmido pMC5.

La actividad de la fusión *guaB-lacZ* fue determinada en bacterias en fase exponencial de crecimiento, incubadas en medio mínimo a 28°C. El nivel de actividad en la cepa mutante fue superior al de la cepa salvaje. El valor promedio de actividad β -galactosidasa de las cepas CIAT899 (pMC5) (710UM) y CIAT899-10.T (1300UM) fue similar a los niveles de actividad observados en las mismas cepas con la fusión transcripcional MC18 (*guaB::lacZ*). La adición al medio de las purinas guanina y xantina estuvo asociada a la disminución de la actividad de la cepa CIAT899-10.T (pMC5) a valores cercanos al nivel de expresión de la fusión en la cepa salvaje (780UM). Asimismo, la actividad de las fusiones se analizaron en condiciones de estrés térmico, de acuerdo con las condiciones ensayadas para las fusiones transcripcionales, encontrándose que los niveles de actividad no son afectados por las altas temperaturas.

Se midió la actividad del plásmido pMC5 en nódulos maduros (de 21 días) de poroto inducidos por las cepas salvaje y mutante *guaB*. Solo se detectó actividad β -galactosidasa en nódulos inducidos por la cepa salvaje, por lo que no fue posible comparar los niveles de expresión del gen *guaB* entre las cepas salvaje y mutante durante la nodulación. La ausencia de actividad β -galactosidasa en los nódulos de la cepa mutante se explica por el fenotipo defectivo en la simbiosis de la cepa, dado que la cepa CIAT 899-10.T se encuentra bloqueada en la liberación desde el hilo de infección al interior de las células del nódulo (Ricciolo *et al.*, 2000). Por otra parte, la actividad β -galactosidasa de la cepa CIAT899 (pMC5, fusión *guaB-lacZ*) es similar en condiciones de vida libre y en extractos de nódulos (Tabla 2), este resultado sugiere que la expresión del gen *guaB* de *R. tropici* no se encuentra inducida en los nódulos maduros de poroto.

Tabla 2: Actividad β galactosidasa de la cepa CIAT 899 (pMC5) medida en condiciones de vida libre y en los nódulos. Los datos presentados son los valores promedios de tres repeticiones independientes.

Condiciones de crecimiento	DO _{600nm}	Actividad β galactosidasa (nmoles de ONP por min. por mg de proteínas)
Vida libre	0.8	85
Bacteroides		68

Concluyendo, la región intergénica entre el ORF1 y el gen *guaB* presenta actividad transcripcional y el patrón de expresión de esta región es semejante al observado en el gen *guaB* analizado con la fusión transcripcional *guaB::lacZ*. Estos resultados indican que la transcripción del gen *guaB* es dirigida por la actividad promotora de la región 5' adyacente al mismo, es decir que el gen *guaB* se transcribe como un operón monocistrónico independiente de la expresión del ORF1.

Ensayos de de complementación celular entre los mutantes NifD⁻ y GuaB⁻

La inoculación mixta ha sido usada por varios autores para complementar el fenotipo defectivo de diversos mutantes de rizobios (Müller *et al.*, 1988; Kapp *et al.*, 1990; Ardourel *et al.*, 1994; van Workum *et al.*, 1998; Pellock *et al.*, 2000). En estos ensayos la simbiosis efectiva depende de la habilidad de las cepas ensayadas de complementarse mutuamente a nivel celular. Considerando que el mutante *guaB* de *R. tropici* se encuentra afectado en su capacidad de infectar las células del nódulo en plantas de poroto (Ricciolo *et al.*, 2000), nos preguntamos si este fenotipo defectivo podría ser complementado mediante la co-inoculación usando otra cepa GuaB⁺. Por otra parte, a los efectos de facilitar el análisis del ensayo, usamos un mutante defectivo en su capacidad de fijar nitrógeno (Fix⁻), pero normal en su capacidad de formar nódulos en poroto. De esta manera los ensayos de complementación se evaluaron determinando la actividad nitrogenasa de los nódulos resultantes, ya que esta actividad debería detectarse solo en el caso que la cepa *guaB* es complementada por el mutante Fix⁻.

La mutación de la cepa Fix⁻ mapea en el gen *nifD*, el cual codifica la subunidad α de la proteína MoFe dinitrogenasa. Los mutantes alterados en este gen en las especies *S. meliloti* y *B. japonicum* (Ruvkun *et al.*, 1982; Hahn y Studer, 1986) son capaces de completar el proceso de infección, pero los nódulos resultan inefectivos (Fix⁻). Considerando que estos mutantes presentan las características deseadas para evaluar la complementación del mutante *guaB*, se construyó la cepa *nifD* de *R. tropici*. Este mutante se obtuvo por mutagénesis específica utilizando un fragmento interno del gen *nifD*; el cual fue

amplificado usando los oligonucleótidos NifDF/NifDR diseñados a partir de regiones muy conservadas del gen (Stoltzfus *et al.*, 1997). El fragmento amplificado, de 390 pb, se clonó en el vector pSUP102 -no replicativo en los rizobios- y fue transferido a *R. tropici* CIAT899 por conjugación biparental. Los transconjugantes Tc^R, fueron analizados por hibridación de ADN total.

Como se observa en la Figura 13, se aislaron dos cepas transconjugantes, CIAT899-G y CIAT899-B, en las cuales el gen *nifD* salvaje resultó interrumpido por un evento de recombinación. Posteriormente, se inocularon plantas de poroto con las cepas *nifD*. Luego de cuatro semanas de la inoculación, las plantas presentaron aspecto clorótico en comparación con las inoculadas con la cepa salvaje. Los nódulos de estas plantas fueron similares a los inducidos el mutante CIAT899-10.T en tamaño, número, y distribución en la raíz. Además, usando el método de reducción de acetileno no se detectó actividad nitrogenasa en los nódulos inducidos por los mutantes *nifD* lo que confirma el fenotipo Fix- de estas cepas en plantas de poroto y demuestra que los mutantes *nifD* son apropiados para su uso en el ensayo propuesto.

Los ensayos de co-inoculación se realizaron con plantas de poroto y una mezcla de las cepas mutante *guaB* CIAT899-10.T y mutante *nifD* -CIAT899-G o CIAT899B- en una relación 1:1. Las plantas fueron inoculadas con 1 ml de los cultivos bacterianos en una concentración de 10⁷ bacterias por ml. Asimismo, se realizaron inoculaciones simples con las cepas analizadas. A las cuatro semanas, en todos los tratamientos las plantas presentaron síntomas de clorosis (Figura 14) y el aspecto de los nódulos fue similar a los formados por las cepas Fix-. Los nódulos fueron cosechados, esterilizados superficialmente y a partir de los mismos se aislaron los rizobios plaqueando en medio TY/agar suplementado con los antibióticos que permiten seleccionar las cepas CIAT899-10.T (Nm^R) y CIAT899G y B (Tc^R). En todos los tratamientos de co-inoculación se observó el 100% de los nódulos ocupados por las cepas *nifD*; asimismo, las determinaciones de la actividad de nitrogenasa indicaron que estos nódulos eran inefectivos.

En los ensayos de inoculación simple, a los 7 días de la inoculación, las raíces inoculadas con la cepa CIAT 899-10.T presentaron engrosamientos visibles solo con lupa, mientras que las plantas inoculadas con la cepa *nifD*, al

igual que la cepa salvaje, presenta nódulos discretos que se observan a simple vista. Teniendo en cuenta que el mutante *guaB* presenta un retraso en el inicio de la nodulación y con el propósito de favorecer la entrada de las dos cepas, realizamos nuevos ensayos de co-inoculación aumentando la proporción del mutante *guaB* respecto a la cepa *nifD* (1/10; 1/100; 1/1000). Sin embargo, a partir de los nódulos inducidos en todos los tratamientos se aislaron solamente bacterias *nifD*.

Los resultados de ensayos de complementación descritos por otros autores parecen indicar que la complementación celular durante el proceso infectivo, requiere que las cepas logren un contacto muy cercano, implicando una invasión simultánea y que ambas cepas se acompañen en la infección (Kapp *et al.*, 1990). Si bien en las condiciones ensayadas el mutante *nifD* no complementa el fenotipo simbiótico defectivo del mutante *guaB*, no podemos descartar que el resultado negativo en el ensayo de complementación se deba a que el ingreso de los mutantes durante el proceso de infección no sea simultáneo de manera de asegurar la complementación. Alternativamente, la cepa *nifD* podría ser más competitiva en la nodulación iniciando así el proceso infectivo antes que el mutante *guaB*. La mutación en el gen *rosR*, el cual codifica para un regulador transcripcional, afecta la superficie celular, la competencia en la nodulación y el crecimiento en la rizósfera de *R. etli* (Araujo *et al.*, 1994; Bittinger *et al.*, 1997). En ensayos de inoculación simple en plantas de poroto, el mutante *rosR* no está afectado en la nodulación, sin embargo en las mezclas de coinoculación con la cepa salvaje es necesario un exceso de 17000 veces la cepa mutante para obtener igual ocupancia en el nódulo (Araujo *et al.* 1994). En nuestros resultados, la ausencia de bacterias *guaB* en los nódulos inducidos en los ensayos de co-inoculación podría deberse a una menor competitividad de la cepa CIAT899-10.T en relación con el mutante NifD.

Concluimos que el avance en el proceso infectivo del mutante *nifD* es mayor que el del mutante *guaB* y que este tipo de ensayos requiere el uso de mutantes de *R. tropici* que se encuentren afectados en las etapas tempranas de la infección, para asegurar que la invasión sea simultánea con la cepa mutante CIAT899-10.T.

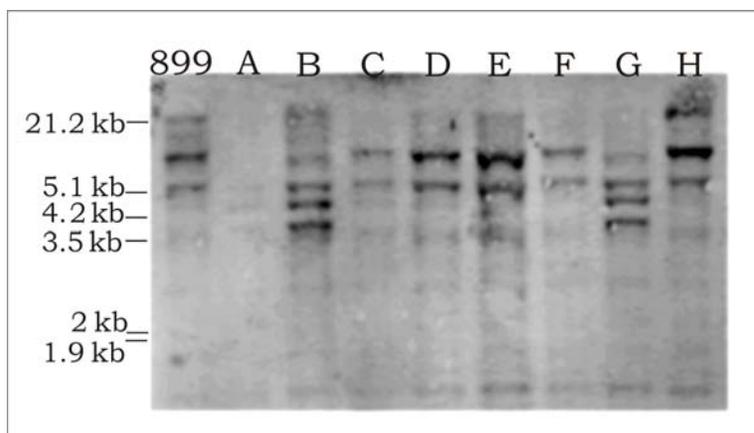


Figura 13: Obtención de mutantes Fix. Análisis de hibridación de ADN genómico de la cepa CIAT899 y de ocho transconjugantes Tc^R. El ADN de las cepas analizadas fue digerido con la endonucleasa *EcoRI*, y los fragmentos resultantes separados en geles de agarosa. Se utilizó como sonda el fragmento interno del gen *nifD* marcado con dATP biotinilados. Las cepas transconjugantes **B** y **G** muestran el patrón de hibridación esperado para una integración plasmídica en el gen *nifD*.



Figura 14: Ensayos de coinoculación con los mutantes *nifD* y *guaB* de *R. tropici* en plantas de poroto. Se observa el aspecto clorótico de las plantas inoculadas con los mutantes *nifD* y *guaB* -por separado o en inoculaciones mixtas - en comparación con la planta inoculada con la cepa salvaje.

DISCUSIÓN

En este capítulo se describe el clonado de la región que contiene al gen *guaB* en *R. tropici* así como el análisis físico y génico de la misma. En esta región se identifican tres marcos de lectura: ORF1-*guaB*-ORF2. El ORF1, por similitud de secuencia, pertenece a la familia de metalo-betalactamasas, mientras que el ORF2 no presenta homología significativa con ninguna proteína.

Los genes implicados en la síntesis *de novo* de guanina se han estudiado en detalle en *E. coli*. En esta especie los genes *guaB* y *guaA* forman un operón con un solo promotor adyacente al gen *guaB*. Por el contrario, en los rizobios con genoma secuenciado, los genes *gua* no se encuentran físicamente asociados. El análisis de la secuencia genómica de *R. tropici* mediante ensayos de hibridación demuestra que el gen *guaA* se encuentra localizado en una región cromosomal distinta a *guaB*.

El promotor del operón *guaBA* de *E. coli* muestra características propias de los promotores ribosomales: la secuencia -10 similar al consenso de los promotores reconocidos por el factor σ^{70} , la región rica en GC adyacente a la secuencia -10 y el elemento activador AT posicionado río arriba de la secuencia promotora; además presenta, al igual que el resto de los genes implicados en la síntesis de purinas, un sitio de unión para el regulador de la transcripción PurR (Davies y Drabble, 1996). En comparación con los numerosos estudios relacionados con los promotores simbióticos (Morett y Buck, 1989; Fisher *et al.*, 1994; Rushing y Long, 1995), los promotores de los genes estructurales en los rizobios han sido poco analizados. En *B. japonicum* los promotores de los genes ribosomales presentan secuencias consenso -35/-10 las cuales son reconocidas por el factor σ que pertenece a la familia de los factores σ^{70} (Beck *et al.*, 1997). El análisis de la región 5' adyacente al gen *guaB* en los rizobios demostró que la misma presenta secuencias muy conservadas: un box de 32 nucleótidos, la secuencia Shine-Dalgarno, y una posible región promotora similar a la secuencia -10 del gen *guaB* de *E. coli* (Davies y Drabble, 1996). Las secuencias conservadas en esta región no son similares a la secuencia consenso de unión a PurR presente en los genes *pur* de *E. coli* y *B. subtilis* (Schumacher *et al.*, 1994; Saxild *et al.*, 2001). En *B. subtilis*, la región promotora de los genes *guaB* y *guaA* no presentan secuencias de unión a PurR (Kanzaki y Miyagawa *et al.*, 1990;

Mantsala y Zalkin *et al.*, 1992), estos genes tampoco forman parte del segundo regulón de la vía de síntesis de purinas, XptR (Johansen *et al.*, 2003).

El resultado del análisis de la expresión de la región genómica que comprende al gen *guaB* demuestra que los tres marcos de lectura identificados se corresponderían con genes funcionales. Estos tres genes serían transcripcionalmente independientes entre sí. Efectivamente encontramos que la interrupción del gen *guaB* no afecta la transcripción del ORF2 que se encuentra localizado río abajo de *guaB*, por lo que su transcripción es independiente del gen *guaB*. Por otra parte, la región intergénica ORF1-*guaB* presenta actividad promotora, y la actividad de esta región es similar a la del gen *guaB* analizado con la fusión génica *guaB::lacZ*, indicando que la transcripción del gen *guaB* es dirigida por la región 5' analizada y es asimismo independiente de la transcripción del ORF1. Estos resultados son coincidentes con los descriptos para *B. subtilis*, en esta especie el gen *guaB* se transcribe en forma independientes en un mensajero monocistrónico (Saxild y Nygaard, 1988).

En *E. coli* el operón *gua* se induce con la adición de adenina y se reprime en presencia de guanina (Thomas y Drabble, 1985). Si bien PurR modula la expresión del operón, los valores de inhibición de la expresión son mayores que los mostrados por la acción de este regulador, lo que indica que los genes *gua* poseen un mecanismo de regulación específico distinto a PurR (Meng *et al.*, 1990; Hutchings y Drabble, 2000). El gen *guaB* se encuentra activado en el mutante defectivo en IMPd, asimismo, la suplementación al medio con purinas afecta negativamente la expresión del gen, indicando que los nucleótidos xantina y guanina se encuentran involucradas en la represión del gen *guaB*, y que probablemente el mutante experimenta una oferta celular limitada de guanilatos que conduce a una mayor expresión de *guaB*. Por otra parte, la actividad transcripcional de la fusión *guaB::lacZ* es mayor en cultivos en fase exponencial lo que sugiere que la expresión de *guaB* es afectada por la velocidad de crecimiento y a su vez depende de la demanda de precursores de nucleótidos para la división celular. En forma similar, en *E. coli* la expresión del gen *guaB* se induce en cultivos que presentan mayor tasa de crecimiento (Davies y Drabble, 1996).

En *E. coli* el gen *guaB* no parece estar relacionado con la respuesta al estrés térmico, los estudios de expresión genómica mediante microarreglos de ADN (microarrays) indican que la actividad del gen disminuye en condiciones de estrés de temperatura (Richmond *et al.*, 1999). Asimismo, el gen *guaB* es inhibido en respuesta a la expresión constitutiva de la proteína MarA, la cual es considerada como una de las nuevas proteínas del mecanismo de *E. coli* de respuesta al estrés térmico (Barbosa y Levy, 2000).

Nuestros resultados demuestran que la complementación con el gen *guaB* revierte las características defectivas observadas en el mutante CIAT899-10.T indicando que la expresión del mismo es importante para la simbiosis de protozoario y para la tolerancia térmica de *R. tropici*. Ensayos previos han demostrado que la suplementación con guanina le permite al mutante 10.T recuperar la tolerancia térmica, lo que demuestra la asociación entre la guanina o algún compuesto guanilado y la respuesta al estrés térmico (Riccillo *et al.*, 2000). Sin embargo, aunque el requerimiento de guanilatos para la tolerancia térmica es claro, los resultados del presente capítulo indican que el estrés térmico no afecta la expresión del gen *guaB*. La combinación de estos datos sugieren que la expresión constitutiva del gen *guaB* en *R. tropici* es suficiente para mantener el nivel de guanina requerido durante el crecimiento en condiciones de estrés de temperatura.

CAPÍTULO IV

La capacidad de síntesis de proteínas de estrés térmico en el mutante *guaB* de *R. tropici*

INTRODUCCIÓN

Mecanismos de respuesta al estrés de temperatura en bacterias

La respuesta al estrés térmico es un mecanismo de protección celular presente en todos los organismos (Neidhardt y VanBogelen, 1987). Ante un incremento de temperatura, las células responden con la inducción de la síntesis de un grupo de proteínas denominadas proteínas de estrés térmico (HSPs, Heat Shock Proteins). La mayoría de las HSPs se encuentran altamente conservadas, algunas son proteínas que actúan como chaperonas moleculares (Sistemas GroEL y DnaK) o proteasas ATP dependientes (Lon, CLpH) y juegan un rol importante en el plegamiento y reciclaje de las proteínas tanto durante el crecimiento normal como en condiciones de estrés (Yura y Nakahigashi, 1999). Los estudios de genómica funcional permitieron la identificación de nuevas proteínas de *E. coli* que también se inducen durante el estrés térmico; por ejemplo, las proteínas MarA y MarR involucradas en la resistencia a antibióticos y a otros estreses ambientales (Richmond *et al.*, 1999; Barbosa y Levy, 2000)

A partir de los estudios realizados en *E. coli* y *B. subtilis* se han descrito dos mecanismos de regulación por estrés térmico (Yura *et al.*, 2000). La expresión de la mayoría de las HSPs citoplasmáticas de *E. coli* se encuentra controlada positivamente por el producto del gen *rpoH*, este factor σ alternativo, σ^{32} , dirige la actividad de la ARN polimerasa hacia la transcripción de los promotores de estrés térmico (Yura *et al.*, 2000). El nivel del factor σ^{32} se incrementa en respuesta al estrés térmico, principalmente a través de la traducción del ARN mensajero *rpoH* y por la estabilización transiente del factor (Morita *et al.*, 1999). En las condiciones normales de temperatura, el nivel de σ^{32} se encuentra regulado negativamente por la acción de las chaperonas que integran el sistema DnaK-DnaJ y GrpE las cuales inactivan al factor σ^{32} por asociación directa - control de actividad- y median su degradación por proteasas como la proteína FtsH -control de la estabilidad- (Tomoyasu *et al.*, 1998). Un segundo grupo de genes de estrés es controlado por otro factor de transcripción, σ^E , el cual funciona principalmente en respuesta a estímulos extracitoplasmáticos, como por ejemplo la presencia de proteínas periplasmáticas no plegadas, y las condiciones de temperaturas extremas (Missiakas y Raina, 1997). Asimismo, el operón *psp*, relacionado con el estrés por infección por fagos, también responde

en condiciones de estrés térmico y su transcripción es promovida por el factor σ^{54} (Model *et al.*, 1997).

Estos resultados señalan una regulación específica de la protección al estrés térmico que responde a diferentes señales internas y del ambiente, con factores de transcripción propios en cada caso.

Se han identificado numerosos genes homólogos a *rpoH* en más de 20 especies de proteobacterias (Nakahigashi *et al.*, 1998). El mecanismo de inducción de las HSPs mediado por el incremento de *rpoH* en condiciones de estrés térmico se conserva en estos diversos microorganismos (Yura *et al.*, 2000).

Los genes de *B. subtilis* que codifican para las HSPs pueden dividirse en cuatro subclases regulatorias. Los genes que codifican para las chaperonas del sistema DnaK y GroEL-GroES (clase I) se transcriben aún en condiciones de estrés usando el factor principal σ^{70} , y son regulados negativamente por la unión del represor HcrA a la secuencia operadora CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperone Expression) (Zuber y Schumann, 1994). Los genes de clase II, controlados por el factor de estrés general σ^B se inducen también en condiciones limitantes de nutrientes o de oxígeno (Hecker y Volker, 1998). Finalmente, los genes de clase III y IV son independientes de HcrA y σ^B , el regulón CtsR (clase III) es controlado por el represor CtsR (Derre *et al.*, 1999), en los genes de clase IV los mecanismos de regulación no se encuentran bien identificados (Narberhaus, 1999; Yura *et al.*, 2000).

El sistema CIRCE-HrcA está presente no solo en las bacterias Gram-positivas, sino también en algunas α -proteobacterias, cianobacterias y clamidias (Segal y Ron, 1998); presentando en cada grupo patrones diferentes de regulación del estrés térmico (Narberhaus, 1999; Yura *et al.*, 2000).

Mecanismos de estrés térmico en los rizobios

Los elementos de control implicados en la respuesta al estrés térmico en los rizobios son varios. En *B. japonicum*, *A. tumefaciens* y *S. meliloti* se detectaron los genes homólogos a *rpoH* (Narberhaus *et al.*, 1996, 1997; Nakahigashi *et al.*, 2001; Ono *et al.*, 2001; Oke *et al.*, 2001). El aumento del nivel de σ^{32} ocurre principalmente a nivel transcripcional, a diferencia de lo que se observa en las γ -proteobacterias (Narberhaus *et al.*, 1997; Nakahigashi *et al.*, 2001). La mayoría

de las proteínas de estrés térmico identificadas en los rizobios son controladas por RpoH. Existen además mecanismos de regulación negativos que controlan a las HSPs. El sistema CIRCE-HrcA regula a los genes *groESL* en *A. tumefaciens* y *B. japonicum* (Narberhaus, 1999). Una secuencia muy similar a la secuencia CIRCE del operon *groE* de *A. tumefaciens* se encuentra río arriba del gen *groELc* en *S. meliloti* (Ogawa y Long, 1995). Otro elemento de control de *B. japonicum* es el llamado ROSE (Repression Of heat Shock gene Expression), el cual controla la expresión de al menos cinco operones de estrés térmico (Narberhaus, 1999) y además a la mayoría de las denominadas proteínas pequeñas de estrés térmico (Münchbach *et al.* 1999).

Es interesante destacar que algunas HSPs participan en el proceso de la expresión de la capacidad de fijar nitrógeno. La actividad de la chaperonina GroEL es necesaria para el plegamiento correcto y el ensamblaje de la nitrogenasa de *A. vinelandii* (Ribbe y Burgess, 2001). En *B. japonicum* el operón *groESL₃*, controlado por el factor alternativo σ^{54} , es activado por el regulador NifA cuando la tensión de oxígeno ambiental disminuye, de esta manera uno de los operones de la chaperonina es co-regulada junto a los genes *nif* y las condiciones de su expresión coinciden con las de la fijación de nitrógeno (Fischer *et al.*, 1993).

En *S. meliloti* se detectaron al menos cuatro copias de genes homólogos *groEL*, algunas de las cuales se localizan en los megaplásmidos (Rusanganwa y Gupta, 1993). La interrupción del gen *groEL* cromosomal afecta la actividad de las proteínas NodD1, NodD3 y SyRM, probablemente a nivel de su plegamiento. Los mutantes *groELc* nodulan tardíamente y los nódulos formados son Fix⁻ (Ogawa y Long, 1995). Asimismo, la sobre-expresión de la proteína GroEL de *S. meliloti* 2011 aumenta los niveles de expresión los genes *nod* (Wais *et al.*, 2002).

La proteína DnaK parece ser otra proteína de estrés requerida para la simbiosis efectiva *S. meliloti*-alfalfa. El peso seco de las plantas inoculadas con mutantes *dnaK* resulta menor que el peso seco de las inoculadas con la cepa salvaje. [Summers *et al.*, 1998]. Consistentemente, se ha encontrado que el gen *dnaK*, al igual que los genes que codifican para varias proteínas tales como las pequeñas proteínas, las proteínas del sistema GroEL y numerosas proteasas,

tienen una expresión marcada en los bacteroides (Natera *et al.*, 2000; Djordjevic *et al.*, 2003; Becker *et al.*, 2004).

Los mutantes *dnaJ* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, inducen nódulos Fix en plantas de poroto. El análisis enzimático demuestra que la mutación del gen afecta la expresión y la actividad de las enzimas implicadas en el metabolismo del glutamato (Labidi *et al.*, 2000).

Concluyendo, estos antecedentes parecen indicar que, considerando el proceso de infección y adaptación al ambiente endofítico como una sucesión de eventos estresantes para la bacteria (Brewin, 1998), es razonable el requerimiento de la expresión de HSPS durante estos procesos. Además, pone en evidencia que la síntesis de proteínas que participan en el proceso de simbiosis y fijación de nitrógeno requiere de proteínas que podrían estar directamente relacionadas con su plegado y/o estabilización.

El estrés de temperatura en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas

La eficiencia de la nodulación en condiciones naturales resulta afectada por una variedad de condiciones adversas tales como la exposición a altas temperaturas, pH extremos, limitación de nutrientes, estrés oxidativo o la presencia de altos niveles de metales pesados (Sadowsky y Graham, 1998).

En las regiones tropicales, la temperatura es uno de los factores limitantes para la fijación biológica, el efecto de la misma depende tanto de la planta como de la especie bacteriana implicada en la simbiosis (La Favre y Eaglesham, 1986; Arayankoon *et al.*, 1990). En plantas de poroto la infección y la fijación son efectivas solo en un rango estrecho de temperaturas (Phia y Munns, 1987; Hernandez-Armenta *et al.*, 1989). A partir de un estudio realizado en suelos de Brasil, se han identificado una variedad de cepas capaces de nodular poroto en condiciones de alta temperatura (Hungria *et al.*, 1993; Michiels *et al.*, 1994). Las cepas con mayor competitividad y eficiencia en las áreas tropicales, CIAT899 (Martinez-Romero *et al.*, 1991) y PRF81 (Hungria *et al.*, 2000) pertenecen a la especie *R. tropici*.

El mutante de *R. tropici* CIAT899-10.T se encuentra afectado en su tolerancia térmica y en la simbiosis con poroto (Riccillo *et al.*, 2000). Con el objeto de determinar si la incapacidad de crecer en condiciones de alta temperatura

puede encontrarse asociado con una expresión defectiva de las proteínas de estrés térmico, analizamos comparativamente el patrón de expresión de las mismas en las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici*.

RESULTADOS

Perfil de las proteínas generales durante el estrés térmico

Investigamos el efecto del aumento de temperatura sobre el perfil de proteínas totales de las cepas CIAT899 y CIAT899-10.T. Se tomaron muestras periódicas en el curso de 60 minutos de los cultivos en fase exponencial de crecimiento incubados en medio mínimo a 28°C y 45°C, respectivamente. Las muestras fueron procesadas (ver Capítulo II) y analizadas en un gel de gradiente (7% a 23%) de poliacrilamida/SDS (PAGE-SDS). En la figura 1 se presentan los resultados de este ensayo. En las condiciones de electroforesis ensayadas, se identificaron numerosas proteínas con peso molecular en el rango de 12 a 120 kDa en los extractos celulares de ambas cepas. El aumento de temperatura no modifica el perfil de proteínas de la cepa salvaje ni de la mutante. Concluimos que el aumento de temperatura no afecta la acumulación ni el perfil de proteínas en estas cepas.

Síntesis de las proteínas de estrés térmico en *R. tropici*

Con el objeto de analizar la expresión de las HSPs en el mutante *guaB* de *R. tropici*, se investigó la síntesis *de novo* de proteínas en condiciones de estrés térmico. Los cultivos en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} 0.4) de las cepas salvaje y mutante *guaB* fueron incubados durante 10 minutos a 45°C, e inmediatamente marcados con un pulso (5 minutos) de ^{35}S metionina.

Las proteínas fueron separadas en un gel PAGE-SDS y reveladas por autoradiografía. El resultado se muestra en la figura 2. En ambas cepas el aumento de temperatura provocó una disminución generalizada de la síntesis de proteínas. Sin embargo, el gel reveló que unas pocas bandas aparecieron más intensas (Fig. 2). Estas bandas se corresponden con polipéptidos de una masa estimada de: 97kDa, 70kDa, 63kDa, 19kDa y 12kDa, siendo mayor el incremento de los polipéptidos de 63 kDa y 19 kDa. Los pesos moleculares de las proteínas observadas fueron similares a los descriptos para las HSPs de *R. tropici* (Michiels *et al.*, 1994). Las diferencias entre estos resultados y los ensayos de expresión general de proteínas descriptos en la sección anterior, en donde no se observan modificaciones en los perfiles de proteínas en respuesta

al incremento de temperatura, se deben a las características propias de ambos métodos.

En la Tabla 1 se intentó establecer una asociación entre los pesos moleculares de los polipéptidos diferenciales que aparecen en condiciones de estrés térmico en *R. tropici* y algunas de las HSPs de *E. coli* (Neidhardt y vanBogelen, 1987). También se presentan las HSPs descritas en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Michiels *et al.*, 1994) y *S. meliloti* (Ono *et al.*, 2001).

Este análisis comparativo nos permitió asignar como posibles proteínas GroEL y DnaK a las proteínas de *R. tropici* de 63 kDa y 70 kDa, respectivamente. Con el objeto de evaluar esta asignación, se analizaron por ensayos de inmunoblot (western blot), los extractos celulares de *R. tropici* utilizando los anticuerpos policlonales anti-GroEL y anti-DnaK de *Chromatium vinosum*. En este ensayo, los cultivos de las cepas CIAT899, CIAT899-10.T y *E. coli* DH5a fueron sometidos a estrés de temperatura (45°C) durante 5, 15, y 30 minutos. Ambos anticuerpos ensayados en extractos celulares de *E. coli* detectan bandas que se incrementan en condiciones de estrés térmico y sus pesos moleculares coinciden con los de las proteínas GroEL y DnaK. Este resultado confirma que en nuestras manos, los respectivos anticuerpos, anti-GroEL y anti-DnaK, detectan proteínas que responden al incremento de temperatura, de acuerdo con el comportamiento de las proteínas GroEL y DnaK.

En el ensayo con los extractos celulares de *R. tropici*, el anticuerpo anti-DnaK revela una única proteína con peso molecular de 70 kDa similar a DnaK, la cual se incrementa a los 5 minutos del aumento de temperatura (Fig. 3). Por otro lado el uso del anticuerpo anti-GroEL revela una banda intensa de ~63 kDa, cuya intensidad es aún mayor en condiciones de estrés térmico. Los ensayos de inmunoblot con el extracto de las cepas mutante y salvaje presentan el mismo perfil de bandas con incrementos similares en condiciones de estrés térmico.

La inducción que se observa en condiciones de estrés térmico en los ensayos de síntesis *de novo* con marcación radioactiva y la detección de bandas con pesos moleculares similares por ensayos de inmunoblot con los anticuerpos anti-DnaK y anti-GroEL, sugiere que los polipéptidos de 70 kDa y 63kDa de *R. tropici* corresponden efectivamente a DnaK y GroEL.

Figura 1: Perfil de proteínas generales de las cepas CIAT 899 y CIAT 899-10.T en condiciones de estrés térmico. Las proteínas fueron analizadas por SDS-PAGE en gel de gradiente (7% a 23%).

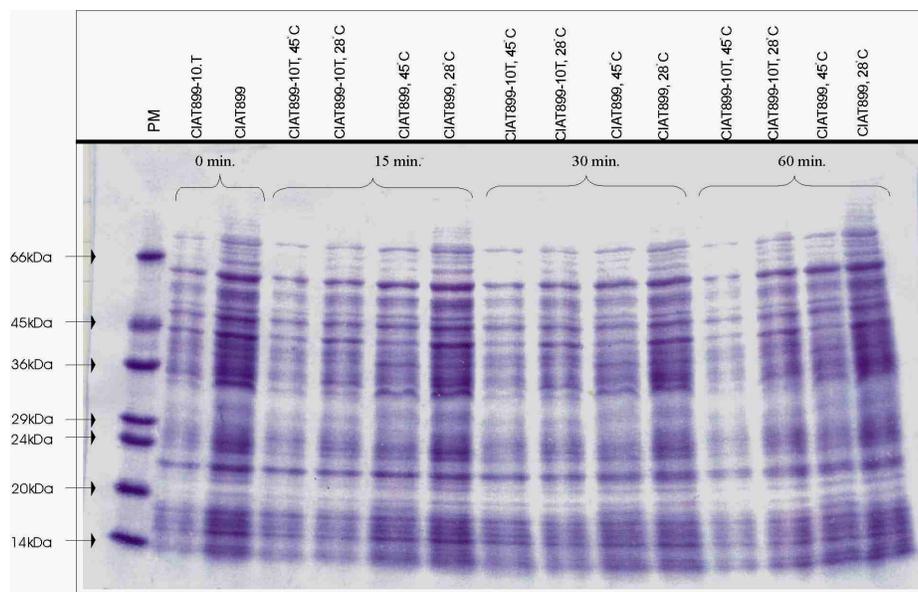


Figura 2: Síntesis de novo de proteínas de *R. tropici*, *S. meliloti* y *E. coli* durante el estrés térmico. Las proteínas marcadas con ^{35}S metionina fueron analizadas en un gel 12% PAGE-SDS y reveladas por autoradiografía. Se indican las HSPs observadas en la cepa mutante (cabezas de flechas).

Lineas:

1. *R. tropici* CIAT899-10.T, 28°C.
2. *R. tropici* CIAT 899-10.T, 45°C.
3. *R. tropici* CIAT 899, 28°C.
4. *R. tropici* CIAT 899, 45°C.
5. *S. meliloti* 1021, 28°C
6. *S. meliloti* 1021, 45°C
7. *E. coli* DH5α, 28°C
8. *E. coli* DH5α, 45°C.

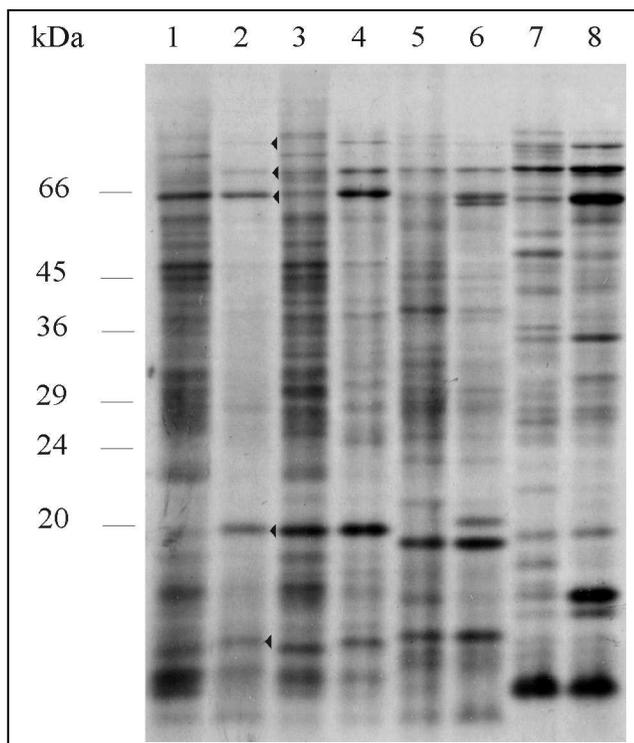


Tabla 1: Proteínas de estrés térmico observadas en *R. tropici*, *E. coli* y *S. meliloti*. En la tabla se indican las HSPs de peso molecular similar a las proteínas que se inducen por estrés térmico en las cepas CIAT 899 y CIAT 899-10.T.

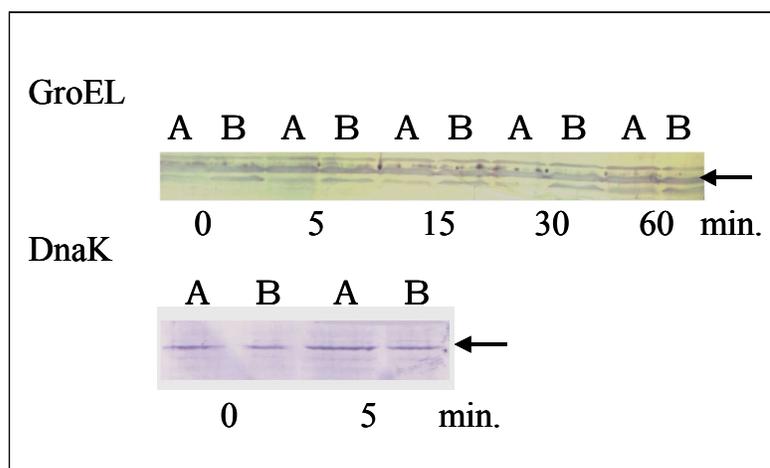
<i>R. tropici</i> CIAT 899	<i>E. coli</i> (1)	<i>S. meliloti</i> (2)	<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> (3)
97 kDa	proteína Lon de 94 kDa	100 kDa	97 kDa
70 kDa	DnaK de 69 kDa	76 kDa	68 kDa
63 kDa	GroEL 62.8 kDa	GroEL, 66 y 60 kDa	61 kDa
19 kDa	HtpL y HtpO (21.5 kDa y 21 kDa)	20 kDa	21 kDa y 19kDa
12 kDa	GroES 10.6 kDa y HtpN 13.5kDa		12 kDa

(1) Neidhardt y vanBogelen, 1987

(2) Ono *et al.*, 2001

(3) Michiels *et al.*, 1994

Figura 3: Expresión de las proteínas GroEL y DnaK en *R. tropici* CIAT899. Los extractos crudos de las cepas salvaje (A) y mutante *guaB* (B) fueron analizados mediante ensayos de inmunoblot utilizando anticuerpos anti-GroEL y anti-DnaK de *Chromatium vinosum*.



Asimismo, investigamos la síntesis *de novo* por marcación radioactiva de las HSPs de las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici*, ensayando diferentes condiciones de temperatura y tiempos de estrés. En el ensayo de estrés térmico en diferentes temperaturas los cultivos en fase exponencial de las cepas CIAT899 y CIAT 899-10.T fueron incubados durante 10 minutos a 37°C, 39°C, 42°C y 45°C respectivamente, y marcados con un pulso de 5 minutos de ³⁵S metionina. La figura 4 muestra el incremento de los niveles de las HSPs, en ambas cepas, desde los 37°C en todas las temperaturas de estrés ensayadas. El perfil de proteínas inducidas en las diferentes temperaturas fue similar en la cepa salvaje y mutante *guaB*. Además, se observó a 37° la inducción de las HSPs de *S. meliloti*, lo que concuerda con los resultados de Ono *et al.* (2001).

Con el objeto de analizar la síntesis de las HSPs en el curso del tiempo, incubamos cultivos de las cepas CIAT899 y CIAT899-10.T a 45°C durante 15, 30 y 60 minutos. En la figura 5 se observan los resultados del ensayo. A los 15 minutos del incremento de temperatura se observó la inducción de la síntesis de las proteínas de estrés en ambas cepas. En la cepa mutante la síntesis de todas las HSPs disminuyó marcadamente en comparación con los niveles de síntesis de la cepa salvaje luego de 30 minutos de estrés, y se detuvo completamente a los 60 minutos de incubación a 45°C, a diferencia de la cepa salvaje la cual mantuvo la expresión de las HSPs en este tiempo. La adición de guanina (0.14 mM) al medio de cultivo le permitió al mutante mantener la síntesis de proteínas luego de 30 minutos en condiciones de estrés térmico (Fig. 6). Este resultado es consistente con el fenotipo defectivo en la tolerancia térmica de la cepa mutante CIAT899-10.T (Ricciolo *et al.*, 2000).

Concluyendo, las cepas mutante *guaB* y salvaje de *R. tropici* inducen la síntesis de las HSPs en respuesta al estrés térmico. En ambas cepas la respuesta de estrés se observó a partir del incremento de temperatura a 37°C y el perfil de proteínas observado en geles unidimensionales es similar en tiempos de estrés cortos (hasta 15 minutos). Sin embargo, a los 30 minutos de estrés a 45°C, la síntesis de HSPs disminuye marcadamente en el mutante y se detiene completamente a los 60 minutos. La suplementación del mutante con guanina restaura los niveles de síntesis de proteínas observados en la cepa salvaje en estas condiciones.

Figura 4: Síntesis de novo de proteínas de *R. tropici* y *S. meliloti* en diferentes condiciones de temperatura. Los cultivos fueron incubados durante 10 minutos a 37°C, 39°C, 42°C y 45°C respectivamente y marcados con un pulso de 5 minutos de ³⁵S metionina. Las proteínas fueron analizadas en un gel 14% PAGE-SDS. **Lineas: A.** *R. tropici* CIAT899-10.T; **B.** *R. tropici* CIAT 899; **C.** *S. meliloti* 1021; **D.** *R. tropici* CIAT 899-10.T; **E.** *R. tropici* CIAT 899; **F.** *S. meliloti* 1021; **G.** CIAT 899-10.T; **H.** CIAT 899; **I.** *S. meliloti* 1021; **J.** CIAT 899-10.T; **K.** CIAT 899; **L.** *S. meliloti* 1021; **M.** CIAT 899-10.T; **N.** CIAT 899; **O.** *S. meliloti* 1021.

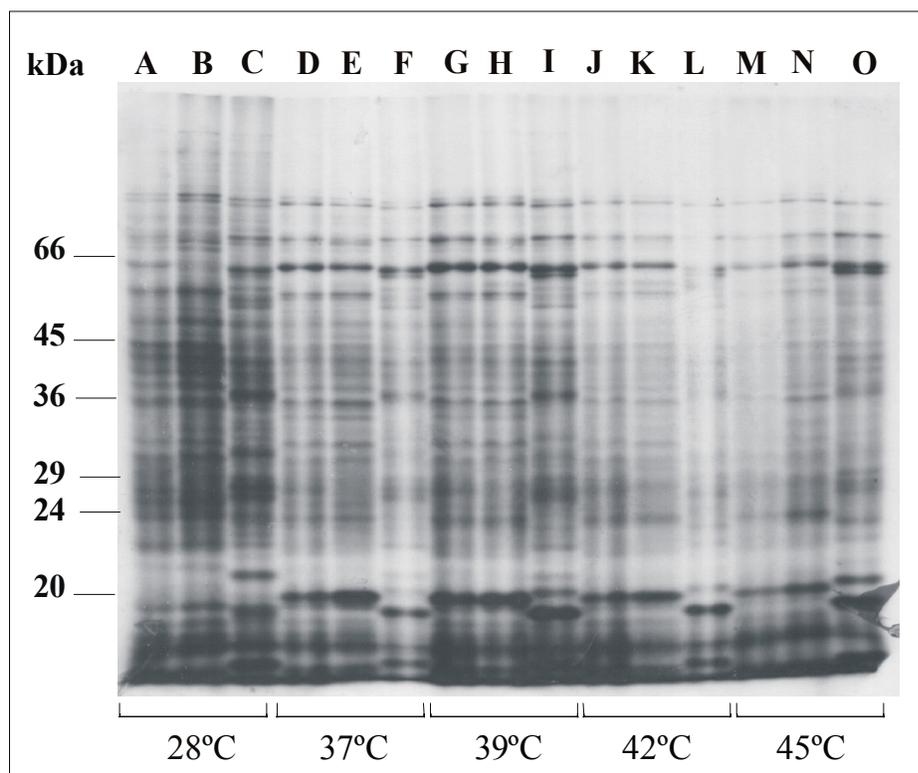


Figura 5: Síntesis *de novo* de proteínas en las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici* analizadas en diferentes tiempos de estrés térmico. Los cultivos fueron incubados a 45°C durante 15, 30 y 60 minutos. Las condiciones de marcación radiactiva y el análisis de las proteínas son semejantes a las descritas en la figura 4.

Lineas

- A. *R. tropici* CIAT899-10.T, 28°C
- B. *R. tropici* CIAT 899, 28°C
- C. *R. tropici* CIAT 899-10.T, 45°C
- D. *R. tropici* CIAT 899, 45°C
- E. *R. tropici* CIAT899-10.T, 28°C
- F. *R. tropici* CIAT 899, 28°C
- G. *R. tropici* CIAT 899-10.T, 45°C
- H. *R. tropici* CIAT 899, 45°C
- I. *R. tropici* CIAT899-10.T, 28°C
- J. *R. tropici* CIAT 899, 28°C
- K. *R. tropici* CIAT 899-10.T, 45°C
- L. *R. tropici* CIAT 899, 45°C

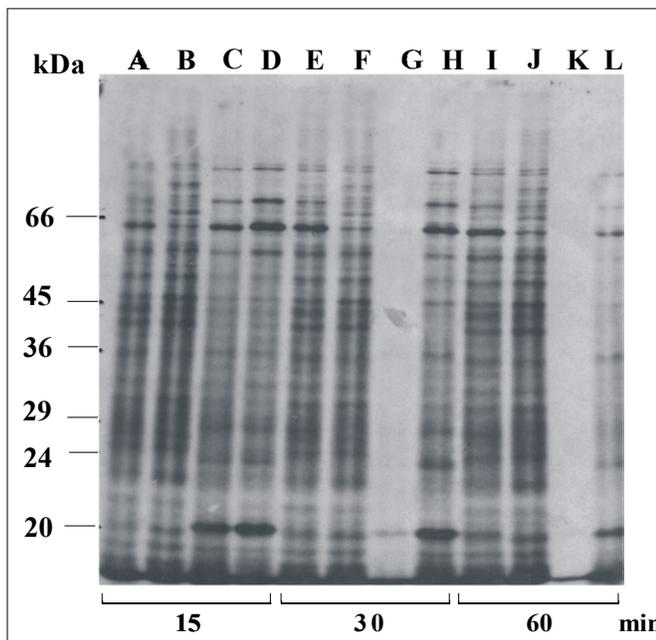
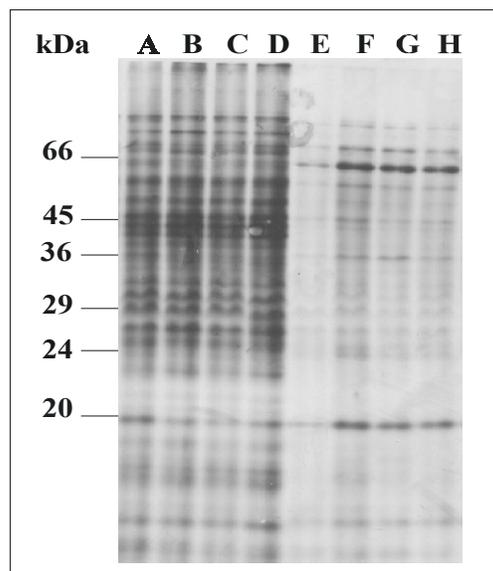


Figura 6: Efecto de la suplementación del medio con guanina sobre la síntesis de proteínas de la cepa mutante CIAT899-10.T durante el estrés térmico. Los cultivos de las cepas salvaje y mutante *guaB* fueron incubados a 28°C o alternativamente a 45°C durante 30 minutos. Las proteínas fueron marcadas con ³⁵S metionina durante 5 minutos y analizadas en un gel 15% PAGE-SDS.

Lineas

- A. *R. tropici* CIAT899-10.T, 28°C.
- B. *R. tropici* CIAT 899, 28°C.
- C. *R. tropici* CIAT899-10.T, 28°C, con guanina.
- D. *R. tropici* CIAT 899, 28°C, con guanina.
- E. *R. tropici* CIAT899-10.T, 45°C.
- F. *R. tropici* CIAT 899, 45°C.
- G. *R. tropici* CIAT 899-10.T, 45°C, con guanina.
- H. *R. tropici* CIAT 899, 45°C, con guanina.



DISCUSIÓN

El efecto de los cambios bruscos de temperaturas en la síntesis de proteínas ha sido estudiado en la mayoría de los organismos, encontrándose en todas las especies examinadas la inducción de un número pequeño de proteínas denominadas proteínas de estrés térmico (Neidhardt y VanBogelen, 1987). En el presente capítulo se analiza el efecto del estrés térmico sobre la síntesis de proteínas en las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici* CIAT899.

Los ensayos de síntesis *de novo* de proteínas en condiciones de alta temperatura mostraron, en las cepas salvaje y mutante, la disminución de la síntesis de la mayoría de las proteínas y el incremento de cinco polipéptidos (de 97kDa, 70kDa, 63kDa, 19kDa y 12kDa), siendo sus pesos moleculares similares a los reportados por Michiels *et al.* (1994) para las proteínas de estrés térmico de *R. tropici*. En ambas cepas el aumento de los niveles de todas las HSPs identificadas se observa desde los 5 minutos de estrés en los diferentes incrementos de temperatura (desde 37°C) ensayados. En *S. meliloti*, las HSPs se dividen en dos grupos de acuerdo a su cinética de inducción, las proteínas que se inducen rápidamente luego del aumento de temperatura (5 a 10 minutos) y las proteínas que se incrementan en tiempos posteriores (a los 30 minutos). A su vez, estos grupos responden a diferentes mecanismos de control, dado que el grupo de las proteínas de inducción rápida es dependiente de la función de *rpoH1*, gen que codifica el factor alternativo σ^{32} , mientras que el resto de las HSPs son independientes de la expresión de este gen.

Por otra parte, los ensayos de inmunoblot para las proteínas DnaK y GroEL no indican diferencias en los perfiles de expresión de proteínas entre las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici* en las condiciones de estrés térmico ensayadas, indicando que la mutación en el gen *guaB* no afecta la expresión de estas proteínas.

Considerando los resultados de los ensayos de inmunoblot y la síntesis *de novo* de proteínas, en tiempos cortos de estrés no se encontraron diferencias en los patrones de expresión de proteínas entre las cepas mutante *guaB* y salvaje de *R. tropici* en respuesta al incremento de temperatura. Sin embargo, a diferencia de la cepa salvaje, el mutante es incapaz de sostener la síntesis de proteínas luego de 60 minutos a 45°C. En forma similar, Mitchiels *et al.*, (1994)

encontraron que en la cepa *R. leguminosarum* bv. phaseoli CNPAF512, sensible al estrés térmico, la síntesis de proteínas cesa completamente luego de 60 minutos a 45°C, por el contrario la cepa *R. tropici* CIAT899 sostiene la síntesis de proteínas luego de la incubación por dos horas en las mismas condiciones de estrés.

Se puede concluir que en *R. tropici* el efecto de la alta temperatura aparece desde tiempos cortos de estrés. La síntesis sostenida de proteínas en tiempos mayores depende de guanina, lo cual demuestra la importancia de la disponibilidad de guanina celular o exógena para la fisiología celular en tiempos prolongados de shock térmico. Una pregunta que aparece es cual sería el rol de la guanina en esta etapa o proceso de respuesta al estrés térmico.

Varias moléculas implicadas en la traducción de señales en las bacterias son compuestos guanilados. El nucleótido ppGpp está relacionado con la respuesta al estrés por limitación de nutrientes y regula la entrada en fase estacionaria en *E. coli* (Cashel *et al.*, 1996; Hirsch y Elliott, 2002). Sin embargo, en *R. tropici*, no se produce la acumulación de ppGpp en condiciones de temperatura alta (Ricciolo *et al.*, 2000). Asimismo, investigamos el comportamiento de las cepas mutante y salvaje en la fase estacionaria mediante la determinación del número de bacterias viables, encontrando que la mutación en el gen *guaB* no afecta la viabilidad en la fase estacionaria de crecimiento de *R. tropici*.

Se ha descubierto que otros guanilatos podrían funcionar como moléculas señal en las bacterias. El nucleótido cíclico di-GMP presente en numerosas especies actúa como un mensajero secundario y se encuentra implicado en la comunicación intercelular en condiciones de estrés (D'Argenio y Miller, 2004). Asimismo, las proteínas de unión a GTP, las cuales actúan sensando los niveles intracelulares de este compuesto guanilado, se encuentran ampliamente distribuidas en los organismos y son esenciales en varios procesos celulares tales como el ciclo celular, la traducción de señales, el transporte de proteínas y el movimiento vesicular (Morimoto *et al.*, 2002; Son *et al.*, 2003). En *E. coli* la proteína con actividad GTPasa, denominada BipA, está implicada en la respuesta de la bacteria a diversos estreses (Freestone *et al.*, 1998; Pfenning y Flower, 2001). Debido a la capacidad de esta proteína de unirse a los ribosomas

in vitro, Grant *et al* (2003) postulan que se trata de un nuevo regulador que actúa a nivel de la síntesis de proteínas.

Considerando que en nuestros ensayos la adición de guanina exógena permitió recuperar la síntesis de proteínas en condiciones de estrés térmico en la cepa mutante, podemos especular que en *R. tropici* la presencia de un compuesto guanilado, ya sea en el rol de moléculas señal, o indirectamente (actuando a través de la unión con proteínas), regula la respuesta al estrés térmico mediante la estabilización de la síntesis de proteínas. En síntesis, los resultados del análisis de la síntesis de proteínas en condiciones de estrés térmico en *R. tropici* ratifica la importancia de la guanina en la tolerancia térmica de esta especie.

CAPÍTULO V

La expresión del gen *guaB* se requiere desde las etapas tempranas de la simbiosis

INTRODUCCIÓN

El proceso de establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa implica el intercambio continuo y secuencial de señales mutuas el establecimiento del nódulo implica el intercambio continuo de señales entre la planta y la bacteria a lo largo del proceso (Geurts y Franssen, 1996). En ambos simbiosis la interacción determina numerosos cambios metabólicos y estructurales que se reflejan en alteraciones del patrón de expresión genético.

En los estadios iniciales de la simbiosis, los flavonoides presentes en el exudado radicular son específicamente reconocidos por la proteína NodD de la bacteria, la cual induce la transcripción de los genes de nodulación (*nod*) (Spaink y Lugtenberg, 1994). La expresión de estos genes comienza en la rizosfera, y se detiene antes de la liberación de la bacteria desde el hilo de infección al citoplasma de la célula vegetal (Sharma y Signer, 1990; Schlaman *et al.*, 1992). Si bien existe poca información acerca de los mecanismos que regulan negativamente a los genes *nod*, se conoce que en los bacteroides funcionan los mecanismos de autorregulación negativa del gen *nodD* (Downie, 1998). Asimismo, en algunas especies del género *Sinorhizobium* y *Rhizobium* el represor NolR se une a secuencias promotoras de estos genes (Kiss *et al.*, 1998; SpainK, 2000).

En el interior de las células del nódulo, la tensión baja de oxígeno induce la expresión de los genes *nif* y *fix* requeridos para la fijación de nitrógeno (Batut y Boitard, 1994). En los nódulos indeterminados esta inducción se produce cuando las células se encuentran totalmente invadidas por las bacterias (Vasse *et al.*, 1990) mientras que en los nódulos determinados la inducción es previa ya que se observa durante el proceso de invasión, durante la liberación de las bacterias desde el hilo de infección al interior de las células del nódulo (Taté *et al.*, 1999c; Cermola *et al.*, 2000).

Si bien las etapas extremas del proceso, la iniciación de la formación del nódulo y la fijación de nitrógeno, se encuentran bien estudiadas a nivel molecular (van Rhijn y Vanderleyden, 1995; Schlaman *et al.*, 1998; Niner y Hirsch, 1998), contrariamente el número de determinantes genéticos relacionados con los eventos intermedios que acompañan a la invasión de la bacteria y al proceso de diferenciación que han sido identificados son

comparativamente pocos (Oke y Long, 1999^a; 1999^b). Se ha caracterizado el gen *bacA*, el cual se expresa en la región del nódulo en donde se da la diferenciación de los bacteroides en *S. meliloti* (Glazebrook *et al.*, 1993; Oke y Long, 1999^a). Los mutantes *bacA* invaden las células pero inmediatamente senescen en el citoplasma (Glazebrook *et al.*, 1993). La proteína BacA es funcionalmente intercambiable con su homóloga SbmA de *E. coli* (Ichige y Walker, 1997), una proteína de membrana implicada en el transporte de antibióticos (Cain *et al.*, 1993; El Ghachi *et al.*, 2004). Asimismo, los mutantes *bacA* presentan modificaciones en los lipopolisacáridos de la pared celular, sugiriendo que el fenotipo defectivo del mutante en la simbiosis podría deberse a una capacidad de adaptación disminuida de la bacteria a las diferencias ambientales entre el hilo de infección y el simbiosoma (Ferguson *et al.*, 2004; Mitra y Long, 2004). Por otra parte, en la etapa de maduración del bacteroide aparece el requerimiento de otros genes relacionados con las necesidades nutricionales de la bacteria, las mutaciones en los genes *dctA*, (codifica para la transportadora de ácidos C₄-dicarboxílicos), o *glmS* (glucosamina sintasa), conducen a la degradación del bacteroide antes de completar la maduración (Engelke *et al.*, 1989; Marie *et al.*, 1992).

El mutante *guaB* de *R. tropici*, que se agrupa en los defectivos en el desarrollo del nódulo, induce nódulos con células vacías de bacteroides en poroto, indicando que la mutación afecta la capacidad de la bacteria de invadir las células vegetales (Riccillo *et al.*, 2000). Con el objeto de determinar en que etapa de la nodulación se requiere la expresión del gen *guaB*, en este capítulo describimos la expresión del mismo bajo el control de promotores de genes simbióticos que se expresan en diferentes estadios de la interacción y evaluamos el fenotipo simbiótico en ensayos de inoculación de poroto.

RESULTADOS

Clonación del gen *guaB* bajo la dirección de los promotores simbióticos

Con el objeto de expresar el gen *guaB* bajo el control de diversos promotores simbióticos, se amplificaron las secuencias promotoras de los genes *nodA*, *bacA* y *nifH* utilizando los cebadores que fueran deducidos a partir de las secuencias *nodA* de *R. tropici* (X98514), *bacA* de *S. meliloti* (X73522), y *nifH* de *Bradyrhizobium* sp. ANU289 (K00487). En la figura 1 se esquematiza la estrategia desarrollada para la construcción de las fusiones entre los promotores simbióticos y *guaB*. Con el objeto de detectar la actividad transcripcional de los promotores, se utilizó la secuencia del gen *gusA* presente en el plásmido pCAM131, la misma fue subclonada en el vector replicativo pSUP104 lo que resulta en el plásmido pMC39. Posteriormente las secuencias promotoras amplificadas fueron clonadas río arriba del gen *gusA*. La secuencia codificante del gen *guaB* de *R. tropici* fue clonada entre la secuencia promotora (pr.) y el gen reportero *gusA*, quedando de esta forma bajo la dirección de los promotores simbióticos. Los plásmidos resultantes, pMC43 –pr.*nodA-guaB*, pMC45 –pr.*bacA-guaB* y pMC47 –pr.*nifH-guaB*, fueron transferidos por conjugación a las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici*.

A fin de determinar si las bacterias transconjugantes expresaban el gen reportero *gusA*, las bacterias Cm^R fueron crecidas en medio rico TY agarizado e incubadas con el sustrato X-GlucA. Como se observa en la figura 2.A, los transconjugantes con los plásmidos pMC43 y pMC45 presentaron actividad Gus, por el contrario las cepas con el plásmido pMC47 no expresaron el gen reportero en estas condiciones, este resultado es coherente con los datos previos de actividad del promotor *nifH*, ya que el mismo se induce solamente en bajas concentraciones de oxígeno (Batut y Boitard, 1994). La presencia del plásmido pMC47 en las cepas transconjugantes fue confirmada en geles tipo Eckardt (Figura 2.B).

A partir de la confirmación de las cepas transconjugantes, se analizó el patrón de expresión de los promotores simbióticos en condiciones de vida libre y durante la interacción con poroto.

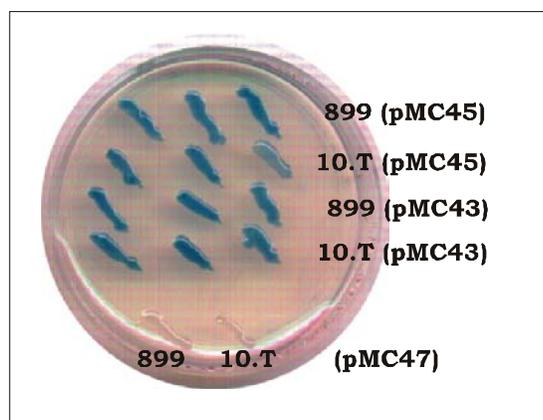


Figura 2: Actividad Gus de las cepas CIAT899 y CIAT899-10.T con los plásmidos pMC43, pMC45 y pMC47. Las cepas transconjugantes fueron ensayadas en medio rico TY a 28°C suplementado con el sustrato X-GlucA. Las cepas CIAT899 y CIAT899-10.T con los plásmidos pMC43 y pMC45 presentan actividad Gus, por el contrario las cepas con la fusión *pr.nifH-guaB* (pMC47) no expresan el gen reportero.

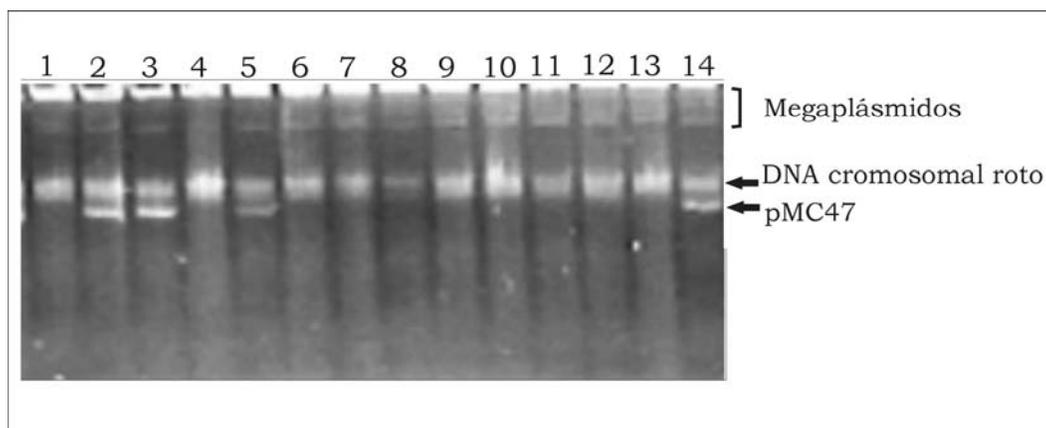


Figura 3: Perfil plasmídico de las cepas salvaje y mutante *guaB* que poseen el plásmido pMC47. Línea 1 y 8, cepas salvaje y mutante respectivamente. En las líneas restantes los probables transconjugantes derivados de las cepas salvaje (2 a 7) o mutante (9 a 14). En las líneas 2, 3, 5 y 14 se observa la presencia del plásmido pMC47.

Patrón de expresión del gen *guaB* dirigido por los promotores simbióticos en condiciones de vida libre

Previamente demostramos que la cepa mutante complementada con el gen *guaB* salvaje es capaz de crecer en condiciones de estrés térmico (Riccillo *et al.*, 2000). A fin de determinar el patrón de expresión en vida libre de los plásmidos simbióticos construidos, se ensayó la capacidad de los mismos de complementar el fenotipo defectivo del mutante *guaB* de *R. tropici* en condiciones de temperatura alta. Con este objetivo, los cultivos de las cepas mutantes que portaban los tres plásmidos pMC43, pMC45 y pMC47 fueron incubados en medio mínimo (GTS) líquido a 38°C.

Como se observa en la tabla 1, ninguno de los plásmidos simbióticos recupera la tolerancia térmica del mutante, indicando que la expresión del gen *guaB* dirigida por los promotores simbióticos es baja o nula en condiciones de vida libre. Sin embargo la cepa mutante con la fusión *pr.nodA-guaB* es capaz de crecer en condiciones de alta temperatura con la adición al medio del flavonoide naringenina (0.5 pM), inductor de los genes *nod*.

Tabla 1: Crecimiento de la cepa mutante CIAT899-10.T complementada con el gen *guaB* expresado bajo el control de los promotores simbióticos *nodA* (pMC43), *bacA* (pMC45) y *nifH* (pMC47). El crecimiento de los cultivos fue determinado por variaciones en la DO₆₀₀.

Cepa	Plásmido introducido	Suplementación ^b	Crecimiento en medio mínimo	
			28°C	38°C
CIAT899	ninguno	ninguna	+	+
CIAT899-10T	ninguno	ninguna	+	-
	pMC43	ninguna	+	-
	pMC43	naringenina	+	+
 Pr. <i>nodA</i>	pMC45	ninguna	+	-
	 Pr. <i>nifH</i>	pMC47	ninguna	+

Estos resultados concuerdan con las características de expresión conocidas de los promotores ensayados. La expresión de los genes *nod* es inducida por el activador transcripcional NodD en presencia de los flavonoides específicos (Spaink *et al.*, 1987). El promotor *bacA* presenta una actividad basal en las células en vida libre y se induce en el nódulo en la zona de formación de los simbiosomas (Oke y Long, 1999^a), mientras que el promotor *nifH* es activo casi exclusivamente en el nódulo maduro (Cabanés *et al.*, 2000).

Actividad de los promotores simbióticos en el nódulo

Con el objeto de determinar el patrón de expresión de las fusiones génicas construidas en las diferentes etapas de la simbiosis, se realizaron ensayos de inoculación en plantas de poroto con las cepas transconjugantes derivadas de la cepa salvaje CIAT899 que portan los plásmidos pMC43, pMC45 y pMC47. La actividad transcripcional de las construcciones fue detectada en nódulos en diferentes estadios de desarrollo, mediante ensayos de tinción X-Gus. En la figura 4 se presenta la actividad Gus en nódulos inducidos por la cepa CIAT899 (pMC43, pr.*nodA-guaB-gusA*) en distintas etapas de la infección y formación del nódulo, mientras que en la figura 5 se presentan en forma comparativa la actividad de los tres promotores en nódulos inducidos por las cepas salvaje y mutante. Las raíces de plantas inoculadas con la cepa CIAT899 (pMC43) presentaron actividad Gus intensa desde el tercer día posterior a la inoculación, durante el enrulado del pelo radicular, en el hilo de infección y en los primordios nodulares observados a lo largo de la raíz (Figura 4.A, 4.B y 5.A). En los nódulos más grandes (de 5 y 6 días) la actividad Gus va decreciendo (Figura 4.C) mientras que en nódulos maduros no se detecta actividad (4.D). En la figura 4.E se puede observar como disminuye la actividad Gus de acuerdo con el grado de desarrollo de los nódulos.

En los nódulos inducidos por la cepa CIAT899 (pMC45, pr.*bacA-guaB*), la actividad Gus se detectó entre los días 6 y 8 posteriores a la inoculación, dicha actividad se observó incluso en nódulos completamente formados de 21 días (Figura 5.C). Finalmente la expresión de la fusión pr.*nifH-guaB-gusA* en raíces inoculadas con la cepa CIAT899 (pMC47) se detectó a partir del noveno día posterior a la inoculación y se mantiene en nódulos maduros de 28 días (Figura 5.E).

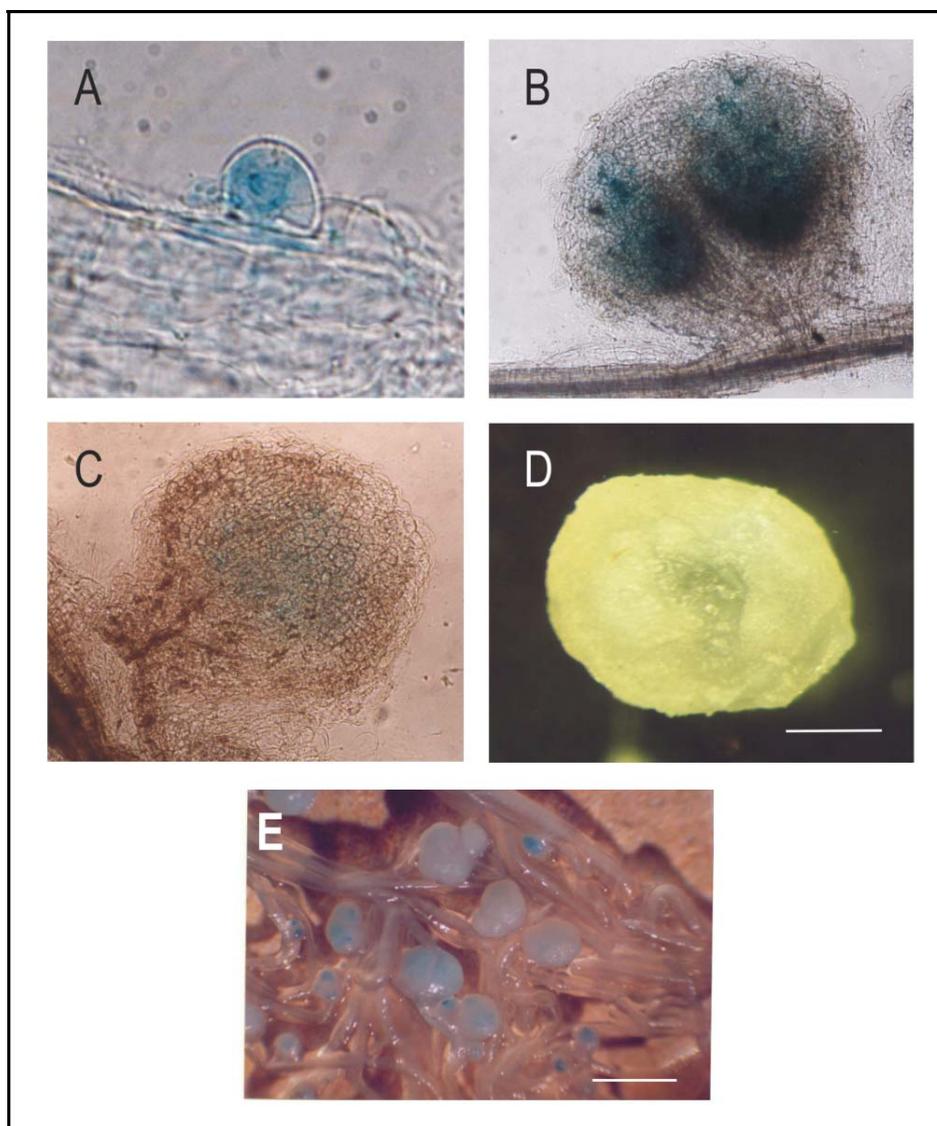


Figura 4: Actividad del promotor *nodA* en nódulos inducidos por la cepa *R. tropici* CIAT899 (pMC43, pr.*nodA-guaB-gusA*) en raíces de poroto. Se determinó la actividad Gus en raíces (A) y nódulos (B, C, D y E) a los 3 (A), 4 (B), 6 (C), 7 (E) y 10 (D) días posteriores a la inoculación. Los tejidos fueron incubados a 37°C durante toda la noche en buffer fosfato conteniendo 150 $\mu\text{g ml}^{-1}$ X-GlcA y 1mM de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$. Luego de la tinción, las muestras fueron clarificadas en hipoclorito de sodio y observadas en microscopio óptico (A, B, C) y estereoscópico (D y E). La actividad Gus es intensa en etapas tempranas de la infección, en el hilo de infección (A) y en los primordios nodulares (B), mientras que en nódulos mas desarrollados es baja (C) y finalmente no se detecta en nódulos maduros (D). En el panel E, una raíz con nódulos en distintos estados de desarrollo, se observa como la actividad Gus disminuye en los nódulos maduros. Barra, 1 mm.

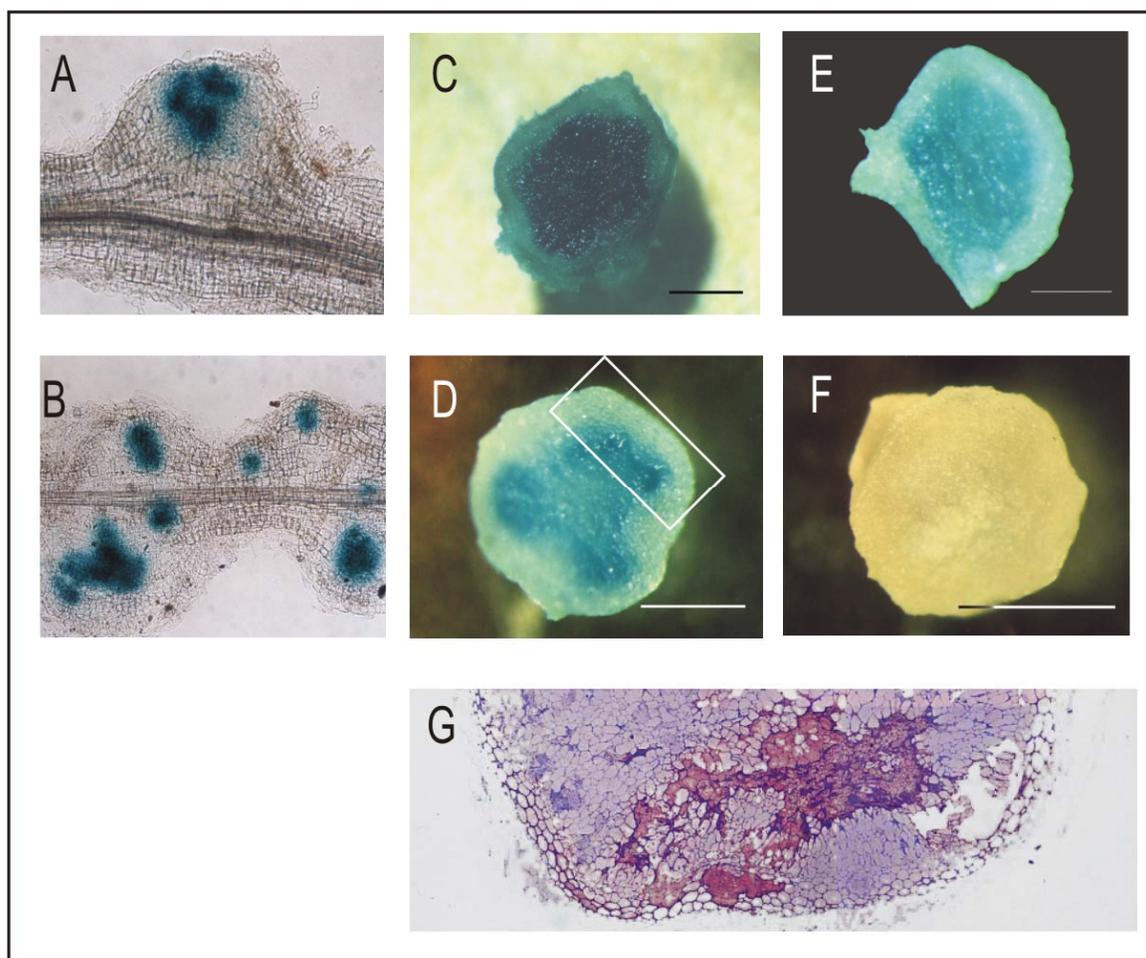


Figura 5: Actividad Gus en nódulos de poroto inducidos por las cepas *R. tropici* salvaje (A, C y E) y mutante *guaB* (B, D y F) que portan los plásmidos pMC43, pMC45 y pMC47, respectivamente. A y B. Actividad Gus intensa en primordios de nódulos de 4 días inducidos por las cepas con la fusión *pr.nodA-guaB-gusA* (pMC43). **C y D.** Cortes de nódulos de 15 días inducidos por las cepas que portan la fusión *pr.bacA-guaB-gusA* (pMC45). El recuadro dibujado en el panel **D** corresponde a la región del nódulo ampliada en **G**, el corte semifino del nódulo, realizado con micrótomo, fue teñido con azul de toluideno y observado en microscopio óptico, se observan las zonas del nódulo que presentan células invadidas rodeadas por células no infectadas. **E y F,** Cortes a mano de nódulos de 15 días inducidos por las bacterias que portan la fusión *pr. nifH-guaB-gusA* (pMC47), se observa que la actividad Gus es intensa en el nódulo salvaje mientras que por el contrario en el nódulo inducido por la cepa mutante no se detecta actividad. Barra, 1 mm.

Asimismo, se determinaron los niveles de expresión de los promotores en los nódulos mediante ensayos cuantitativos utilizando el sustrato *p*-nitrofenil- β -D-glucurónico (p-NPG). En la cepa CIAT899 (pMC43) se cosecharon los primordios de nódulos a los siete días de la inoculación, mientras que la actividad de la cepa salvaje con los plásmidos pMC45 y pMC47 se analizó en nódulos de 15 días. Como se presenta en la tabla 2, los niveles de actividad Gus fueron significativos en las tres construcciones y comparables entre sí.

En síntesis, observando las actividades de las fusiones génicas construidas podemos concluir que el promotor *nodA* se activa en las etapas mas tempranas de la interacción simbiótica entre *R. tropici* y poroto, en días posteriores se observa la inducción del promotor *bacA* y finalmente se activa el promotor *nifH*. El patrón de expresión temporal de estas fusiones concuerda con los datos publicados acerca de la actividad de los promotores *nodA* (Schlaman *et al.*, 1992) y *nifH* (Taté *et al.*, 1999c; Cermola *et al.*, 2000) en los sistemas de nódulos determinados, como también para el promotor del gen *bacA*, el cual fue clonado y caracterizado en *S. meliloti* (Glazebrook *et al.* 1993). Por ende, mediante la utilización de estas fusiones podemos controlar el tiempo de expresión del gen *guaB* durante el proceso de interacción simbiótica.

Tabla 2. Determinación cuantitativa de la actividad GUS. Se determinó el nivel de actividad β -glucuronidasa en las bacterias aisladas de nódulos de poroto formados por las cepas CIAT899 (pMC43), CIAT899 (pMC45) y CIAT899 (pMC47), respectivamente.

Cepa	Plásmido	Actividad β -glucuronidasa (nmoles de <i>p</i> -nitrofenol por minuto por mg de proteínas)
<i>R. tropici</i> CIAT899	pMC43 (pr. <i>nodA-guaB-gusA</i>)	0.38
	pMC45 (pr. <i>bacA-guaB-gusA</i>)	0.18
	pMC47 (pr. <i>nifH-guaB-gusA</i>)	0.31

Propiedades simbióticas de la cepa mutante CIAT899-10.T expresando el gen *guaB* en las distintas etapas de la simbiosis

Con el objeto de evaluar en que etapa del proceso simbiótico se requiere la expresión del gen *guaB* para una nodulación eficiente, investigamos el fenotipo simbiótico defectivo de la cepa mutante CIAT899-10.T expresando el gen *guaB* bajo la dirección de los distintos promotores simbióticos.

Con este fin, se realizaron ensayos de inoculación en plantas de poroto con las tres cepas derivadas de la cepa mutante, portando los plásmidos pMC43, pMC45 y pMC47 respectivamente. Los nódulos inducidos por las cepas presentaron diferencias entre si, en número, color y tamaño. En las plantas inoculadas con la cepa CIAT899-10.T (pMC43) las raíces presentan actividad Gus desde etapas tempranas de la nodulación (Figura 5.B) y los nódulos son muy similares en número, tamaño y color interno a los nódulos inducidos por la cepa salvaje. Por el contrario, las plantas inoculadas con las cepas CIAT899-10.T (pMC45) y CIAT899-10.T (pMC47) formaron nódulos pequeños y más numerosos que los nódulos salvajes. La coloración interna de estos nódulos, levemente rosada en los inducidos por la cepa CIAT899-10.T (pMC45) y blanca en el caso de los nódulos formados por la cepa CIAT899-10T (pMC47), sugiere que el contenido de leghemoglobina en los mismos es bajo y nulo respectivamente.

A los 21 días posteriores a la inoculación, las plantas con la cepa CIAT 899-10.T (pMC45) presentaron aspecto saludable, sin síntomas de deficiencia de nitrógeno. Por el contrario, las plantas inoculadas con el mutante portando los plásmidos pMC45 o alternativamente pMC47 se encontraron marcadamente cloróticas. La actividad de la enzima nitrogenasa fue determinada mediante el método de reducción de acetileno (ARA) en las raíces de las plantas.

En las plantas inoculadas con las cepas CIAT899-10.T (pMC43) y CIAT899-10.T (pMC45) la actividad nitrogenasa en las raíces fue el 85% y 8% respectivamente de la actividad encontrada en los nódulos inducidos por la cepa salvaje, mientras que en los nódulos inducidos por la cepa CIAT899-10.T (pMC47) no se detectó actividad.

Asimismo, los nódulos de 21 días fueron analizados por microscopía óptica y electrónica de transmisión. Los resultados de estas observaciones son presentados en la figura 6. Los nódulos inducidos por la cepa CIAT899-10.T

(pMC43, pr.*nodA*) fueron similares a los inducidos por la cepa salvaje, se observaron células invadidas por bacteroides en todas las zonas del nódulo (Figura 6.D, E y F) indicando que la expresión del gen *guaB* dirigida por el promotor *nod* restaura el fenotipo simbiótico salvaje en la cepa mutante CIAT899-10.T.

No se detectó actividad Gus en los nódulos inducidos por la cepa CIAT899-10.T (pMC47, pr.*nifH-guaB*) (Figura 5.F), a diferencia de lo que se observó con la misma fusión expresada en los nódulos maduros formados por la cepa salvaje (Figura 5. E). Asimismo, el examen histológico de estos nódulos mostró que los mismos están formados por células vacías carentes de bacterias, similar a lo observado en los nódulos inducidos por la cepa mutante.

Por el contrario, los nódulos inducidos por la cepa CIAT899-10.T (pMC45, pr.*bacA-guaB*) difieren tanto de los nódulos inducidos por la cepa mutante como de los nódulos normales. En los nódulos inducidos por la cepa mutante con la fusión pr.*bacA-guaB* se observaron unas pocas zonas con células invadidas por bacteroides (5.G, 6.A y 6.C), distribuidas en forma dispersa y rodeadas por numerosas células no infectadas que presentaron gran cantidad de gránulos de almidón, mientras que en las regiones restantes del nódulo las células se encontraron vacías de bacteroides y sin la acumulación de gránulos de almidón (6.B). Además, la tinción con XglucA reveló que la actividad Gus se encuentra restringida a unas pocas zonas del nódulo (Figura 5.D).

Concluyendo, considerando en conjunto las observaciones histológicas de estos nódulos así como la baja actividad nitrogenasa que presentan los mismos y la observación de que la actividad Gus se limita a unas pocas zonas, indican que la expresión del gen *guaB* dirigida por el promotor *bacA* le permitiría a la cepa mutante invadir solo algunas zonas determinadas del nódulo. Asimismo, dado que la expresión del gen *guaB* bajo el control del promotor *nodA* restaura la capacidad de la cepa mutante de invadir las células del nódulo en todas las zonas del mismo, y que, por el contrario, su expresión dirigida por el promotor tardío *nifH* no modifica el fenotipo defectivo de la cepa mutante, podemos concluir que la expresión del gen *guaB* se requiere desde etapas tempranas de la nodulación, y que el tiempo de dicha expresión durante el proceso infectivo es importante para la simbiosis efectiva de *R. tropici* en poroto.

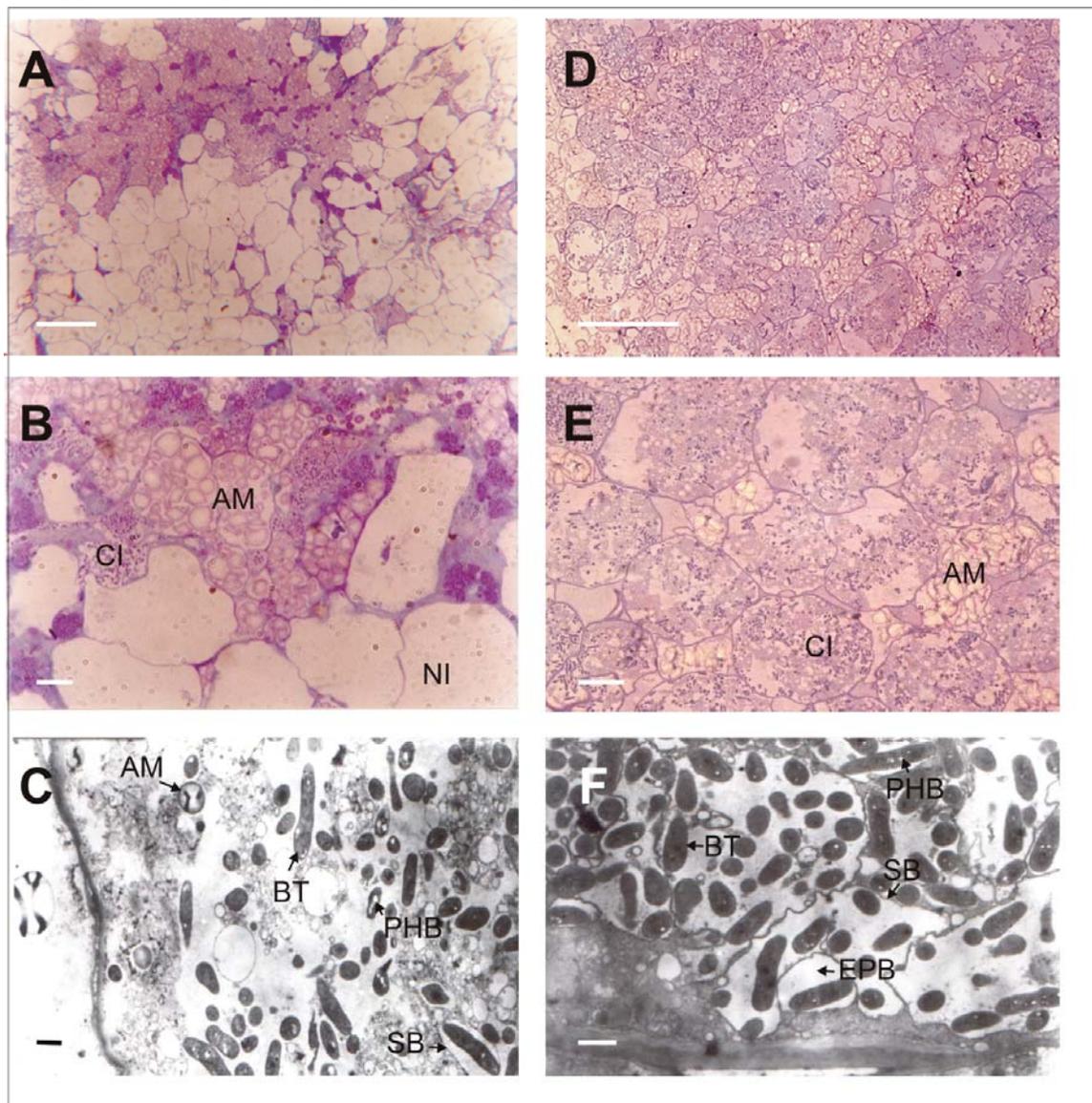


Figura 6: Nódulos de poroto inducidos por la cepa mutante *R. tropici* CIAT899.10.T portando los plásmidos pMC45 (A, B y C) y pMC43 (D, E y F). Luego de 21 días, en los nódulos inducidos por la cepa CIAT899.10.T (pMC45, pr.*bacA-guaB*) se observan unas pocas zonas que presentan células invadidas (CI) por bacteroides, rodeadas por células no infectadas (NI) con numerosos amiloplastos (AM), en las regiones restantes del nódulo las células se encontraron vacías de bacteroides y sin la acumulación de gránulos de almidón (A, y B, barra de 50 y 10 μm respectivamente). Por el contrario, la cepa mutante que porta la fusión pr.*nodA-guaB* induce la formación de nódulos tipo salvaje, presentando en todas las regiones del mismo células infectadas, rodeadas por células con numerosos gránulos de almidón (D, y E, barra de 50 y 10 μm respectivamente). C-F, Células infectadas en nódulos inducidos por la cepa mutante con los plásmidos pMC45 (C) y pMC43 (F), se indican con flechas los simbiosomas (SB) el espacio peribacteroidal (EPB), los bacteroides (BT) con reservas de polihidroxi-buterato (PHB), y los gránulos de almidón (AM) en el citoplasma. En el panel F se observan numerosos simbiosomas (SB) multibacteroidales similar a lo observado en nódulos salvajes. Barra, 1 μm .

DISCUSIÓN

Previamente demostramos la importancia de la expresión del gen *guaB* de *R. tropici* para una simbiosis efectiva en poroto (Riccillo *et al.*, 2000). En el presente capítulo evaluamos el efecto de condicionar temporalmente la expresión de *guaB* durante el proceso infectivo. Estos estudios fueron realizados mediante el uso de fusiones génicas entre la secuencia codificante del gen *guaB* y las secuencias promotores de los genes simbióticos *nodA*, *bacA* y *nifH* los cuales se expresan en diferentes etapas de la nodulación.

Encontramos que la actividad de estos promotoras en la asociación *R. tropici*/poroto es acorde al patrón de expresión observado en las especies de rizobios en los cuales fueron estudiados dichos promotores (Schlaman *et al.*, 1992; Taté *et al.*, 1999c; Oke y Long, 1999a). Es interesante notar que para el caso del promotor del gen *bacA* de *S. meliloti* el mismo fue caracterizado y se determino la importancia de su expresión en la simbiosis con plantas de alfalfa (Oke y Long, 1999a; Gage, 2004). Nuestros resultados demuestran que el patrón de expresión del promotor *bacA* de *S. meliloti* en los nódulos determinados de poroto es similar a la actividad del mismo observada en los sistemas indeterminados.

Previamente demostramos que la mutación en el gen *guaB* afecta la liberación de las bacterias desde el hilo de infección hacia el interior de las células del nódulo (Riccillo *et al.*, 2000). Sin embargo, considerando que en las etapas iniciales del proceso simbiótico se desencadenan una sucesión de cambios fisiológicos en preparación para la posterior infección bacteriana y la formación del nódulo (Limpens y Bisseling, 2003; Mitra *et al.*, 2004) no podemos determinar en que momento del proceso infectivo es requerida la expresión del gen *guaB* en base al fenotipo simbiótico del mutante. En este sentido, las fusiones génicas construidas nos permitieron ensayar el efecto de la expresión del gen *guaB* en diferentes etapas de la nodulación.

La presencia del factor Nod induce en la planta, una serie de respuestas, algunos de los cambios mas tempranos se producen a nivel de la epidermis, como la deformación de los pelos radiculares y la formación de estructuras preinfectivas, mientras que otros cambios morfológicos son posteriores y se producen a nivel de la corteza radicular, como la reactivación de la división celular y la formación del primordio nodular (Geurts y Franssen, 1996; Limpens

y Bisseling, 2003). Las respuestas de la planta en presencia del factor Nod revelan que mientras la bacteria progresa a través del hilo de infección, en las células corticales se inician los cambios necesarios para permitir la infección bacteriana. En forma similar, nuestros resultados indican que la activación del gen *guaB* debe producirse en etapas tempranas de la nodulación, dado que la expresión del gen *guaB* dirigida por el promotor *nodA* recupera el fenotipo simbiótico salvaje en la cepa mutante CIAT899-10.T, mientras que la expresión del gen bajo la dirección del promotor *bacA*, el cual se activa en días subsiguientes al promotor *nod*, determina la complementación parcial del mutante. Por ende, para una nodulación efectiva de *R. tropici* en plantas de poroto no solo es necesaria la presencia del gen *guaB* funcional, sino que también es importante el tiempo de expresión del mismo.

En *R. etli*, el gen *amtB*, involucrado en el transporte de amonio, es inactivado en las primeras etapas de la simbiosis. La expresión ectópica de este gen afecta el desarrollo del nódulo alterando la habilidad de la bacteria de invadir las células del nódulo (Taté *et al.*, 1999^c). Recientemente Ludwig *et al.* (2003) encontraron que los dobles mutantes de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en los genes *aap* y *bra*, los cuales codifican para transportadores de aminoácidos tipo ABC, se encuentran afectados en la fijación de nitrógeno. En forma similar, las mutaciones en los genes *teu* de *R. tropici* afectan la competitividad de la bacteria en la nodulación de plantas de poroto. Estos genes codifican para transportadores de ribosas y se inducen en etapas tempranas de la simbiosis, en presencia de los exudados radiculares de *P. vulgaris* y *M. atropurpureum* (Rosenblueth *et al.*, 1998). Los ejemplos mencionados, en combinación con nuestros resultados, demuestran la importancia de la expresión de varios genes bacterianos no específicos de la simbiosis para una interacción simbiótica efectiva. Nuestros datos indican además que el tiempo de expresión de estos genes es relevante, lo que apoya el concepto del proceso simbiótico como una serie de múltiples etapas que se desarrollan en forma secuencial y ordenada, y que se encuentran mediadas por el intercambio continuo de señales entre ambos simbioses.

En los nódulos determinados de poroto, se ha observado que algunos marcadores moleculares de la planta, así como genes de los rizobios, no se expresan en forma simultánea en las células del nódulo (Taté *et al.*, 1994;

Kavroulakis *et al.*, 2000). El promotor del operón *nifR3-ntrBC* de *R. etli* es activo en las bacterias presentes en el hilo de infección, y en los simbiosomas jóvenes del primordio nodular, mientras que en los nódulos maduros la expresión del operón está limitada a las capas celulares más periféricas (Patriarca *et al.*, 1996). Por otra parte, en nódulos inducidos por mutantes que presentan una alteración en la capacidad infectiva se observa que las células meristemáticas no son invadidas en forma simultánea, lo que podría indicar una susceptibilidad diferente de las células del nódulo a la invasión bacteriana (Taté *et al.* 1999^a; 1999^b). Estas evidencias, junto a las observaciones histológicas realizadas por Cermola *et al.*, (2000) indican que los nódulos determinados, al igual que los indeterminados, presentan regiones con diferentes grados de desarrollo. Nuestros resultados demuestran que la expresión del gen *guaB* de *R. tropici* dirigida por el promotor *bacA* permite al mutante *guaB* infectar algunas regiones del nódulo. Considerando que el nódulo de poroto presenta simultáneamente estadios distintos de desarrollo, nuestros resultados podrían indicar que la cepa CIAT899-10.T (pMC45) que expresa el gen *guaB* en forma tardía aún encuentra regiones del nódulo con células susceptibles a la infección.

En *S. meliloti*, el análisis transcriptómico de las bacterias en vida libre y durante la simbiosis, indica que los genes de síntesis de purinas –incluido *guaB*- y numerosos genes bacterianos involucrados en el metabolismo de ADN son reprimidos en los nódulos maduros de alfalfa (Becker *et al.*, 2004). Nuestros resultados parecen indicar que la expresión del gen *guaB* de *R. tropici* no es indispensable en las etapas tardías del desarrollo del nódulo de poroto, dado que la expresión de este gen bajo el control del promotor *nodA* recupera el fenotipo simbiótico salvaje en el mutante *guaB*, y dicho promotor es inactivo en los nódulos maduros.

Finalmente, si bien la función del gen *guaB* de *R. tropici* en la simbiosis no se encuentra completamente elucidada, en base a los resultados presentados en este capítulo podemos especular en la existencia de una señal dependiente de la expresión del gen *guaB* en la interacción simbiótica con plantas que forman nódulos determinados. Esta señal podría ser necesaria para el reconocimiento de la bacteria por las células del primordio nodular e iniciar en las células vegetales los cambios necesarios para permitir la liberación de la bacteria desde el hilo de infección al citoplasma vegetal.

CAPÍTULO VI

El rol del gen *guaB* en otras
asociaciones simbióticas
fijadoras de nitrógeno

INTRODUCCIÓN

R. tropici CIAT899 es una cepa de amplio rango de hospedante con capacidad para nodular varios géneros de leguminosas, entre las cuales se incluyen plantas de nódulos determinados (ej. poroto, caupí) e indeterminados (leucaena). Previamente demostramos que la cepa CIAT899-10.T presenta un fenotipo simbiótico defectivo (Ndv⁻) en poroto y caupí. Contrariamente, induce nódulos tipo salvaje en leucaena que posee la propiedad de formar nódulos indeterminados (Riccillo *et. al.*, 2000). A partir de estos resultados, nos preguntamos si el requerimiento de la expresión del gen *guaB* para una asociación efectiva se encuentra ligado al tipo de nodulación. En este contexto, analizamos el fenotipo simbiótico del mutante de *R. tropici* CIAT899-10.T en la interacción con otro de sus hospedantes naturales, siratro, en el cual induce la formación de nódulos determinados. Asimismo investigamos el efecto de la mutación en el gen *guaB* de una especie distinta a *R. tropici* sobre su asociación con su respectiva planta hospedadora, puntualmente en la interacción entre *S. meliloti* 1021 con alfalfa, leguminosa que origina forma nódulos indeterminados.

A fin de facilitar la comprensión del presente capítulo se hacen seguidamente breves referencias a las características de los mutantes *pur* de *S. meliloti* descriptas por varios autores y al metabolismo de purinas en plantas.

Auxótrofos de purinas en *S. meliloti* 1021

Como fuera descripto en el Capítulo I, en general los auxótrofos de purinas del género *Rhizobium* son también defectivos en el proceso de infección de la raíz. Una posible excepción es el caso de la interacción *Rhizobium meliloti*-alfalfa, en donde los mutantes *pur* inducen la formación de hilos de infección e invaden las células del nódulo en forma similar al tipo salvaje, pero resultan afectados negativamente en sus capacidades de fijación de nitrógeno (Swamynathan y Singh, 1992; Dickstein *et. al.*, 1991).

La bibliografía revela antecedentes que intentan establecer una relación entre la etapa de fijación de nitrógeno y la vía de síntesis de las purinas en los rizobios (Soberón *et al.*, 1997; 2001; Cosseau *et al.*, 2002). La presencia de una cadena respiratoria con alta afinidad por el oxígeno, como lo es la citocromo oxidasa *cbb3* codificada por el operón *fixNOQP*, capacita a los bacteroides para respirar

eficientemente en el medio microaeróbico presente en el interior de las células del nódulo (Preisig *et al.*, 1993). En la especie *R. etli* la expresión de *cbb3* se encuentra aumentada en los mutantes auxotrofos para purinas (Soberón *et al.*, 1997), los cuales también son defectivos en la simbiosis (Noel *et al.*, 1988; Newman *et al.*, 1992; 1995). El análisis de la transcripción del operón *fixNOQP* en diferentes mutantes de la vía *de novo* de las purinas sugieren que el nucleótido AIRCAR actuaría como un efector negativo de la expresión de estos genes (Soberón *et al.*, 1997).

Posteriormente, considerando que en *S. meliloti* se ha elucidado gran parte de los mecanismos moleculares implicados en el control de la expresión del operón *fixNOQP*, Soberón *et al.* (2001) investigaron el efecto del AIRCAR en el sistema *cbb3* de esta especie. La regulación de la expresión de estos genes responde a la disponibilidad de oxígeno mediante la cascada regulatoria que involucra el sistema de dos componentes FixL/FixJ y al activador transcripcional FixK (Foussard *et al.*, 1997). El análisis transcripcional de los genes *nif/fix* en presencia de AIRCAR sugiere que este metabolito afecta la respiración y la fijación de nitrógeno inhibiendo la expresión del activador transcripcional FixK (Soberón *et al.*, 2001).

Recientemente se ha postulado que la molécula efectora -relacionada con la guanina- determinante de la represión de los genes *nif/fix* pueden ser alternativamente AIRCAR, 5'AMP o algún otro precursor del nucleósido. La acción de estos metabolitos parece estar modulada por proteínas tales como la flavoproteína codificada por el gen *fixM* u otras proteínas que actúan modificando estos nucleósidos a formas no inhibitorias para la expresión génica (Cosseau *et al.*, 2002).

El conjunto de resultados previos sugiere la participación de metabolitos de la vía de síntesis de purinas en la regulación de los genes de fijación de nitrógeno, postulando al AIRCAR, o algún otro metabolito precursor, como una molécula señal que ante condiciones de estrés actuaría inhibiendo la respiración y la fijación de nitrógeno en el bacteroide (Cosseau *et al.*, 2002).

Las purinas en las plantas

Las especies de las tribus Phaseoleae, Desmodieae e Indigofereae incluidas en el grupo Phaseoloide (Doyle *et al.*, 2000) se caracterizan por transportar el nitrógeno fijado en forma de ureidos (Atkins, 1991). Con excepción del género *Cyamopsis*, la exportación significativa del nitrógeno fijado como ureidos es una propiedad de los nódulos determinados. La anatomía de estos órganos, caracterizada por una población mixta de células infectadas rodeadas por otras no invadidas, hace posible que se exprese la enzima uricasa cuya actividad requiere de tensiones de oxígeno mayores a las que se encuentra en las células infectadas. En los sistemas determinados, el nitrógeno fijado es incorporado a la síntesis de purinas en las células infectadas, luego los nucleótidos xantina e hipoxantina son oxidados a ureato, el cual es transferido a las células vecinas no infectadas para ser oxidado, por actividad de las uricasas, a alantoína y ácido alantoico (Smith y Atkins, 2002). En estas plantas, la vía de síntesis de purinas se encuentra inducida, en especial las enzimas IMPd, responsable de la oxidación de IMP a xantina) y la Xdh la cual cataliza la oxidación de xantina en ácido úrico (Atkins *et al.*, 1985; Datta *et al.*, 1991; Cao y Schubert, 2001). La inhibición de la enzima Xdh por el allopurinol en nódulos de soja y caupí interrumpe la síntesis de ureidos y provoca la inhibición de la actividad nitrogenasa en las células infectadas, estos resultados han permitido proponer un mecanismo que conecta las actividades de la nitrogenasa y de la oxidación de purinas (Atkins *et al.*, 1992). Asimismo, se encontró que el flujo de nitrógeno fijado por los bacteroides en los nódulos de soja, se encuentra asociado con el control transcripcional del gen *pur5* de la planta (Smith *et al.* 2002).

Estos antecedentes nos demuestran la interrelación entre los procesos de asimilación de nitrógeno por la planta, a través de la síntesis y oxidación de purinas, y la fijación de nitrógeno en los nódulos determinados.

RESULTADOS

El rol del gen *guaB* en la interacción simbiótica *S. meliloti*-alfalfa

A continuación se detalla la estrategia utilizada para la obtención de un mutante *guaB* derivado de la cepa *S. meliloti* 1021. Asimismo, se describe la caracterización del mutante en vida libre así como su comportamiento simbiótico en la interacción con alfalfa.

Obtención de un mutante *guaB* derivado de la cepa *S. meliloti* 1021

Con el propósito de investigar el gen *guaB* en otras interacciones simbióticas, encaramos el aislamiento de mutantes *guaB* de la cepa *S. meliloti* 1021 mediante el método de disrupción fragmento específico. En la figura 1 se presenta un esquema de la estrategia utilizada. En una primera etapa se amplificó y clonó un fragmento interno del gen. A partir del dato de secuencia nucleotídica del único gen *guaB* anotado en el genoma de *S. meliloti*, se diseñaron los oligonucleótidos ORFF (5'-AGAGGAACTGGCCATGGCGC-3') y GuabSMR (5'-GTTGGAAAGCTTCTTCACGCG-3') para amplificar a partir de DNA total genómico un único fragmento de aproximadamente 850pb. Este fragmento fue clonado en el vector comercial pGEM-T easy (Promega), resultando el plásmido pMC28. La identidad del producto amplificado y clonado se confirmó demostrando la presencia esperable de secuencias de reconocimiento para cortes con enzimas de restricción y por su posterior secuenciación. La secuencia amplificada comprende desde 13 pb antes del codón de iniciación (indicado en negrita en la secuencia del cebador) hasta 845 pb de la secuencia codificante del gen.

El fragmento *guaB* amplificado fue interrumpido utilizando el gen APH de resistencia a kanamicina presente en vector pUC-4K (Vieira *et al.*, 1982). El cassette, como fragmento *Bam*HI, se insertó en sentido contrario el único sitio *Bg*III del fragmento *guaB*. El plásmido resultante, pMC32, fue digerido con *Eco*RI liberando el fragmento *guaB*::Km^r; el cual se ligó al vector pK18*mob*, previamente cortado con la misma enzima, en la orientación opuesta a los promotores presentes en el vector (pMC40). La integración del plásmido pMC40 en el gen *guaB* cromosomal, por un único evento de recombinación, interrumpe la transcripción del gen *guaB* salvaje. El plásmido pMC40 se transfirió a *S.*

meliloti 1021 mediante conjugación biparental. Los transconjugantes fueron seleccionados por su resistencia al antibiótico neomicina y por su incapacidad para crecer en medio mínimo suplementado con allopurinol.

Debido al bajo número de colonias transconjugantes Nm^R obtenidas y a la ausencia de mutantes con el fenotipo buscado, se aplicó el procedimiento de enriquecimiento de mutantes auxotróficos en la población de los transconjugantes. Esto se llevó a cabo en medio mínimo en presencia de allopurinol (según se describe en el Capítulo II) obteniéndose dos candidatos auxotróficos a guanina. El reemplazo génico específico en el genoma de los transconjugantes fue confirmado por análisis de hibridación (Figura 2).

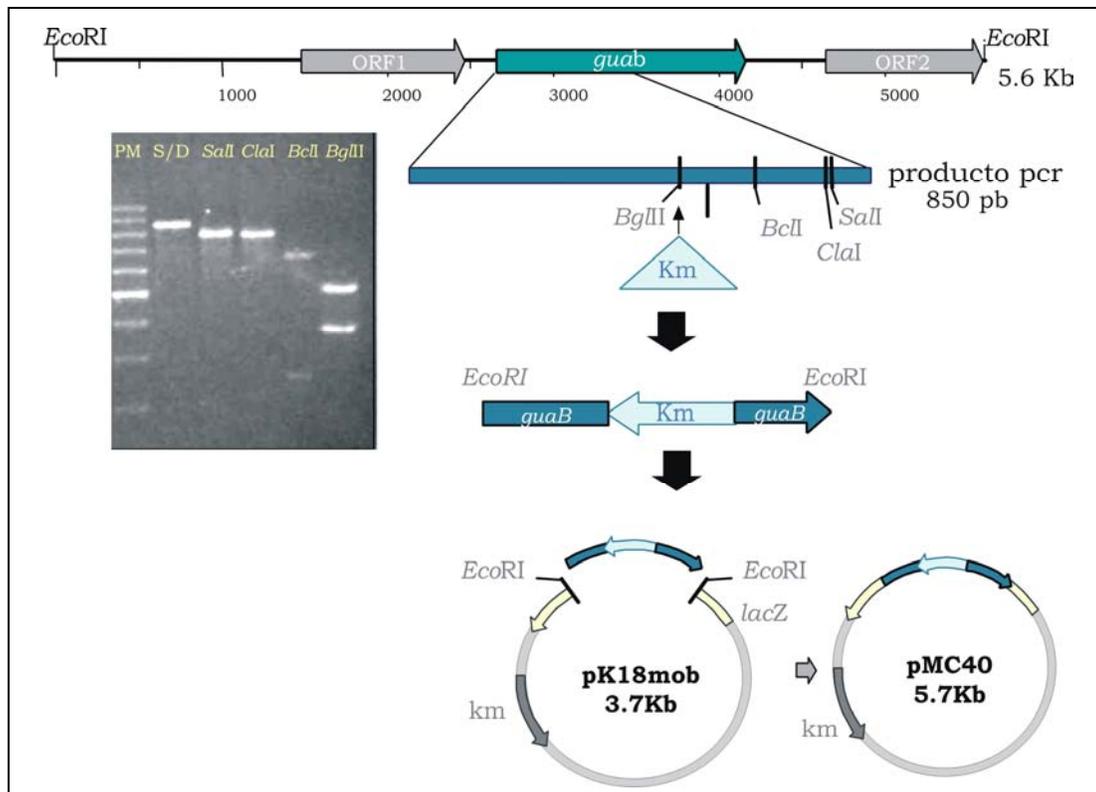


Figura 1. Estrategia utilizada para la obtención del mutante *guaB*. Usando ADN genómico de *S. meliloti* como molde y la reacción de PCR con cebadores específicos, se amplificó un fragmento interno del gen *guaB*. El producto de la PCR fue analizado por cortes con enzimas de restricción y clonado en el vector pGEM-T easy. En una etapa posterior se clonó el cassette con el gen de resistencia a kanamicina, removido del vector pUC-4K, en el único sitio *Bgl*II del fragmento *guaB* de *S. meliloti*. Esta construcción *guaB*::Km se reclonó en el vector pK18mob, el cual es suicida en rizobio. La orientación de clonado es tal que la dirección del gen *guaB* se encuentra en la orientación opuesta a los promotores presentes en el vector originando el plásmido pMC40.

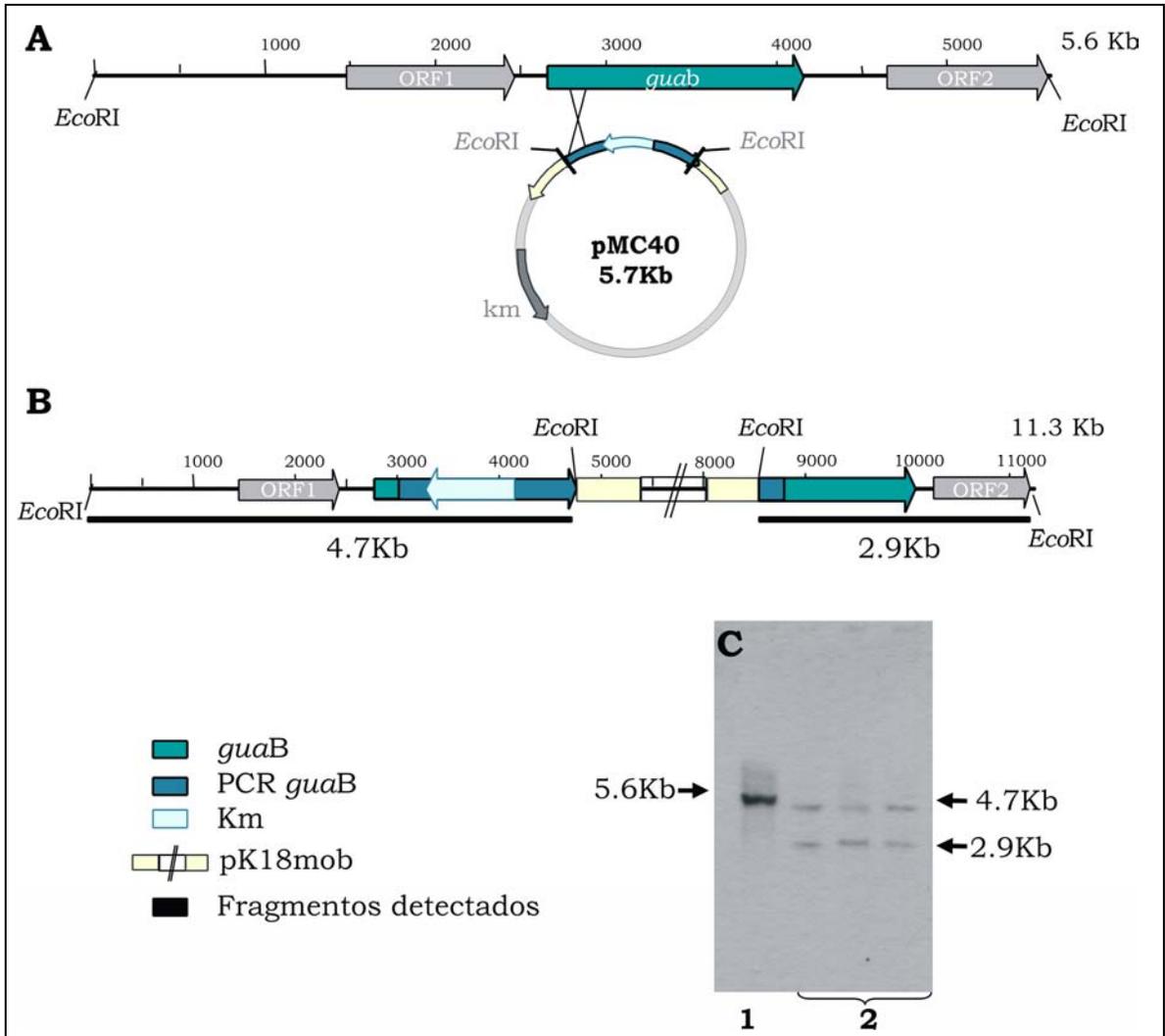


Figura 2. Mutagénesis fragmento específica del gen *guaB* en *S. meliloti*. El plásmido pMC40 (*guaB*::Km) fue transferido por conjugación a la cepa *S. meliloti* 1021 (A). En el panel B se esquematiza el resultado de la inserción del plásmido pMC40 en el gen *guaB* por un evento de recombinación homóloga. Los transconjugantes Nm^r fueron analizados por hibridación tipo Southern (panel C). El ADN de la cepa salvaje (línea 1) y de los transconjugantes seleccionados (línea 2) fue digerido con la enzima *EcoRI* y se utilizó como sonda el fragmento *guaB* amplificado.

También se aplicó un criterio bioquímico para confirmar la mutación *guaB* determinado la actividad IMPd en extractos celulares de las cepas mutante y salvaje. Tal como se muestra en la Figura 3.A, por coloración de actividad enzimática –ver CapítuloII- se reveló la presencia de una banda en el extracto crudo de la cepa salvaje (línea 2) mientras que no se detectó actividad alguna en el caso del extracto de la cepa mutante (línea 1). Este resultado nos confirma, desde el punto de vista bioquímico, la identidad de la cepa seleccionada como mutante GuaB- de *S. meliloti*, de ahora en adelante la identificamos como cepa MC.1021.

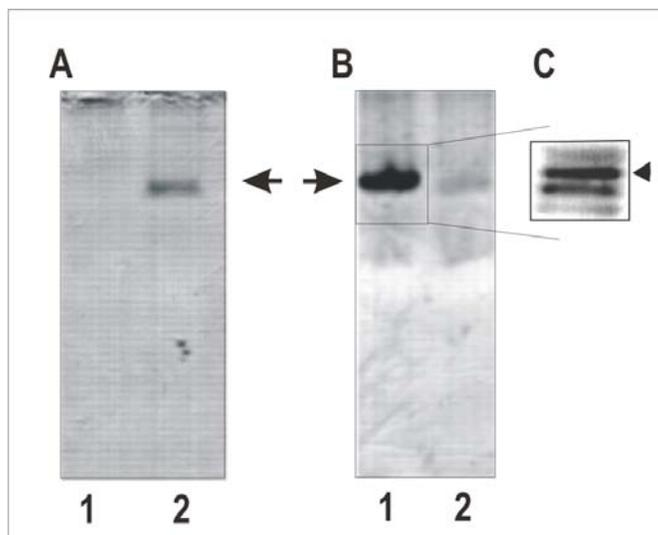


Figura 3. Actividad de las enzimas inosina monofosfato deshidrogenasa (A) y xantina deshidrogenasa (B y C) en extracto crudo de *S. meliloti*. Los extractos de las cepas mutante MC. 1021 (1) y salvaje 1021 (2), conteniendo 20 μ g de proteínas, fueron sometidas a electroforesis en gel de nativo de poliacrilamida al 10.5%. La detección se realizó utilizando los sustratos inosina monofosfato y xantina para la detección de las enzimas IMPd y Xdh, respectivamente. Las flechas indican las bandas correspondientes a la actividad enzimática detectada. En el panel C la actividad xantina deshidrogenasa en extracto crudo de la cepa mutante fue determinado en un gel nativo de poliacrilamida al 5%, en estas condiciones se observaron las tres bandas correspondientes a las distintas formas tetraméricas de la enzima. Se indica (con cabeza de flecha) la banda con mayor actividad.

El mutante *guaB* de *S. meliloti* 1021 es auxótrofo para guanina

Las cepas se cultivaron a 28°C en medio GTS líquido y sólido, respectivamente. Como se muestra en la Figura 5.A el mutante *guaB* de *S. meliloti* es auxótrofo en medio mínimo líquido y en medio sólido muestra un crecimiento retardado, lento y con menor desarrollo de tamaño. El crecimiento normal se recupera con la adición de guanina al medio (Figura 5.B y 6.B). Del mismo modo, la suplementación con xantina permite recuperar el crecimiento salvaje lo que señala que la mutación en el gen *guaB* no afecta la expresión del gen *guaA* cuyo producto, la enzima guanina monofosfato sintetasa, cataliza la conversión de los nucleótidos XMP a GMP (Figura 6.C). Por otra parte, ensayamos la complementación de la cepa MC.1021 con el gen *guaB* de *R. tropici*, transfiriendo por conjugación el plásmido replicativo multicopia pMC9 el cual porta el fragmento *EcoRI* cromosomal que incluye dicho gen (descrito en Capítulo III). El resultado fue que de manera similar a la complementación con guanina, el gen heterólogo restauró la capacidad del mutante de crecer en medio mínimo (Figura 6.A)

***S. meliloti* utiliza la ruta alternativa de síntesis de guanina vía la enzima Xdh**

La enzima xantina deshidrogenasa/oxidasa (Xdh) es un $\alpha_2\beta_2$ heterotetrámero que cataliza las reacciones de oxidación de hipoxantina a xantina y de xantina a ácido úrico (Leimkühler y Klipp, 1999). Las subunidades de la xantina deshidrogenasa en *S. meliloti* se encuentran codificados por dos operones, el operón *xdhA1-xdhB1-xdhC* que codifica para las dos subunidades XdhA1 y XdhB1 y el operón mixto, *bdhA-xdhA2-xdhB2*, el cual codifica para la enzima D-3-hidroxi-butirato deshidrogenasa y para las subunidades XdhA2 y XdhB2 (Aneja y Charles, 1999; Sukdeo y Charles, 2003).

Considerando que el mutante *guaB* de *S. meliloti* es auxótrofo para guanina, investigamos si la vía alternativa de síntesis de guanina mediada por la enzima xantina deshidrogenasa es activa en esta cepa. Con este objetivo determinamos en la cepa mutante la actividad Xdh en extractos celulares y examinamos el efecto de suplementar al medio del cultivo con precursores de la enzima.

Determinación de la actividad xantina deshidrogenasa

Los ensayos de actividad Xdh se realizaron con extractos crudos obtenidos de rizobios cosechados en la fase exponencial de crecimiento. Las bacterias fueron incubadas en medio mínimo suplementado con guanina para permitir el crecimiento del mutante MC.1021. La detección de actividad se realizó en geles nativos de poliacrilamida al 10.5% utilizando como sustrato xantina. Como se muestra en la figura 3.B, tanto la cepa mutante como la salvaje tienen actividad Xdh. La banda de actividad fue más intensa en el mutante, lo que señalaría una activación de la enzima Xdh cuando la ruta salvaje (vía IMPd) se encuentra bloqueada.

Asimismo, el uso de geles con una concentración menor de poliacrilamida (5 %) nos permitió observar tres bandas con actividad de Xdh, los cuales se corresponderían a las combinaciones posibles de las subunidades codificadas por los dos operones descritos más arriba. (Figura 3.C). El análisis de la cepa salvaje resultó en tres bandas de intensidades comparables entre ellas (dato no mostrado) mientras que en la cepa mutante resultó claramente visible la intensidad de una de ellas (la de menor migración en la Figura 3.C), respecto a las otras dos bandas. Charles *et al.* (2003) estudiaron mutantes en la región concluyendo que la banda superior corresponde al tetrámero codificado por el operón *xdhA1-xdhB1-xdhC*, mientras que las bandas inferiores son combinaciones de subunidades que incluyen los productos de los genes del operón *bdhA-xdhA2-xdhB2*. Este resultado nos permite concluir que sólo uno de los dos operones codificantes de subunidades Xdh, se activaría en el mutante defectivo *guaB*, el que comprende los genes *xdhA1-xdhB1-xdhC*.

La suplementación del medio con adenina e hipoxantina restauran el crecimiento del mutante GuaB

La demostración de que la enzima Xdh es activa en *S. meliloti*, nos permite suponer que el mutante es capaz de convertir hipoxantina a xantina (Figura 4). Ensayamos el efecto de la suplementación al medio con allopurinol, un análogo estructural de la hipoxantina e inhibidor de la enzima xantina deshidrogenada. La presencia del allopurinol no afectó el crecimiento de la cepa salvaje, dado que la ruta de síntesis de guanina que involucra a la IMPd es funcional. Por el

contrario en la cepa mutante el inhibidor inhibió el escaso crecimiento que se observa en medio GTS/agar (Figura 6.D), demostrando que el pobre crecimiento observado en medio sólido resultaría de la actividad Xdh.

Estos resultados nos llevan a concluir que aunque la vía de síntesis de guanina mediada por la Xdh se encuentra activa en el mutante *guaB* de *S. meliloti*, la ruta alternativa no alcanzaría para sostener el crecimiento del mutante, a diferencia de lo observado en *R. tropici*. Para evaluar esta suposición, ensayamos al mutante en su capacidad de crecer en medio mínimo suplementado con los nucleótidos precursores de la vía de salvataje, adenina e hipoxantina. Los ensayos fueron realizados en medio GTS líquido y en medio GTS/agar, en condiciones de temperatura normales. Los resultados de los mismos se presentan en la tabla 1.

La suplementación con adenina e hipoxantina le permitió al mutante recuperar el crecimiento en medio mínimo (Figura 5.C). Asimismo, ensayamos el agregado de allopurinol en estos cultivos, encontrando el efecto inhibitorio del crecimiento (Figura 5.D), lo cual señala la participación de la Xdh. Por el contrario, la presencia del inhibidor no afectó el crecimiento de los cultivos suplementados con los nucleótidos xantina o guanina, los cuales son incorporados, independientemente de la participación de la Xdh, directamente a la ruta de síntesis de GMP mediante la acción de la fosforibosiltransferasas específicas (Tabla 1).

Concluyendo, la ruta alternativa para la síntesis de guanina vía la enzima Xdh es funcional en *S. meliloti*. Sin embargo, la prototrofia del mutante *guaB* se revierte con precursores exógenos sugiriendo que los niveles celulares de los mismos no son suficientes para satisfacer el crecimiento en condiciones de carencia de un gen *guaB* funcional.

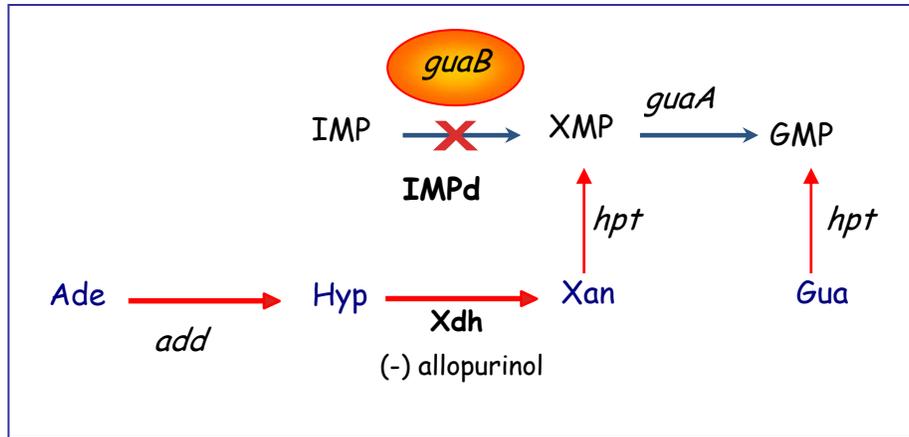


Figura 4: Vía alternativa de síntesis de guanina mediada por la enzima Xdh. En azul se muestran los nucleótidos precursores utilizados en los ensayos de crecimiento del mutante *GuaB⁻* de *S. meliloti*. Se indica (X) la etapa bloqueada en el mutante MC.1021.

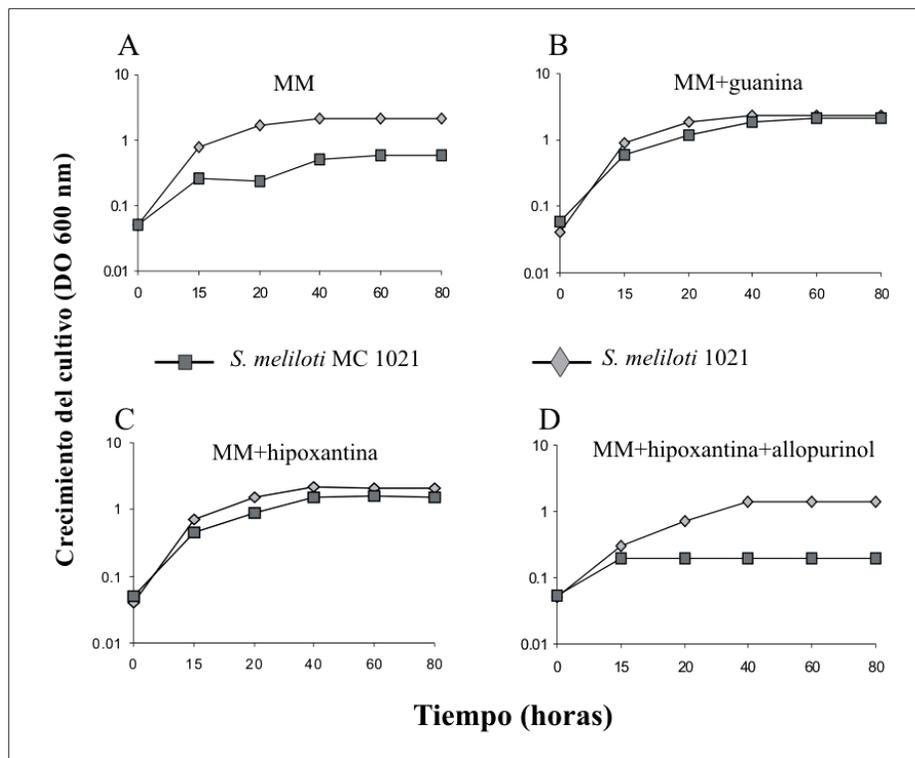


Figura 5. Crecimiento de la cepa MC.1021 en medio mínimo (MM) GTS suplementado con guanina e hipoxantina. Los cultivos de las cepas 1021 salvaje y mutante MC.1021 fueron diluidos a una densidad óptica inicial de 0.08 unidades de absorbancia. El crecimiento a 28°C en medio mínimo GTS (A), suplementado con guanina 0.14 mM (B), hipoxantina 0.14 mM (C) o hipoxantina más alopurinol 100 mM (D) fue evaluado midiendo la absorbancia a 600nm. Los datos presentados corresponden al valor promedio de tres repeticiones con una desviación estándar menor a 10%.

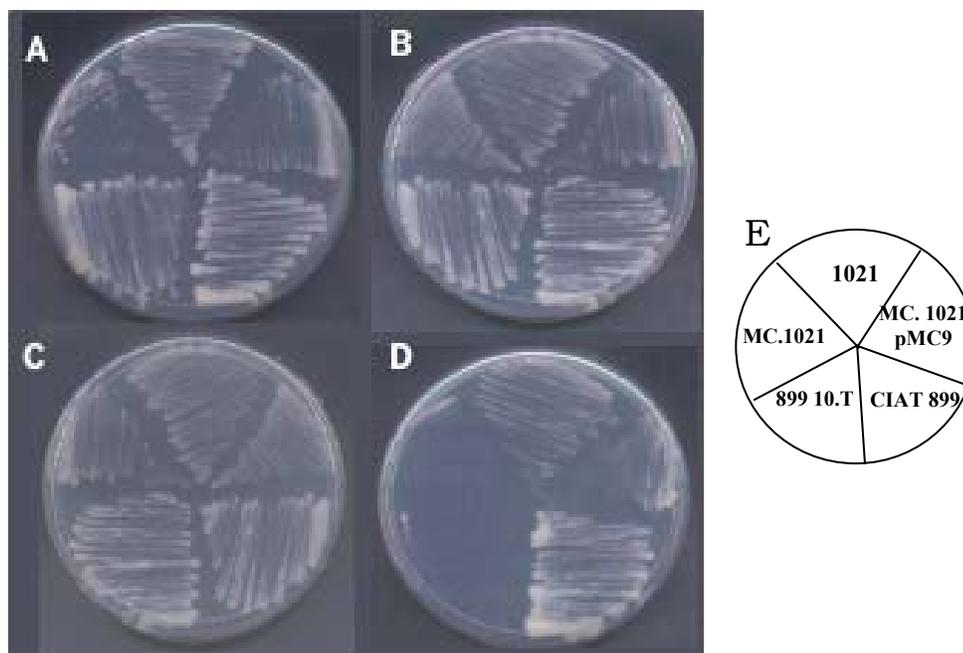


Figura 6. Ensayo de complementación y suplementación del mutante MC.1021.

Las cepas de *S. meliloti*, salvaje 1021, MC.1021, MC1021 (pMC9), y de *R. tropici*, CIAT899 y CIAT899-10.T, fueron incubadas en medio mínimo GTS/agar (A), GTS con guanina (0.14mM) (B), GTS con xantina (0.14mM) (C) o GTS con allopurinol (1mM) (D). En el esquema de la derecha se señala la disposición de las cepas en las placas de cultivo.

Tabla 1. Efecto de la suplementación con purinas en el crecimiento de las cepas mutante MC.1021 y salvaje 1021. Las cepas fueron incubadas en medio mínimo (GTS) a 28°C. Los nucleótidos y el allopurinol fueron adicionados al medio en una concentración final 0.14mM y 0.1mM respectivamente.

Suplementación	<i>S. meliloti</i> 1021 <i>S. meliloti</i> GuaB ⁻	
	Crecimiento	
ninguna	+	defectivo
allopurinol	+	-
guanina	+	+
xantina	+	+
hipoxantina	+	+
adenina	+	+
guanina más allopurinol	+	+
xantina más allopurinol	+	+
hipoxantina más allopurinol	+	-
adenina más allopurinol	+	-

El mutante *GuaB*⁻ de *S. meliloti* induce la formación de nódulos efectivos en alfalfa

En los experimentos descritos en esta sección examinamos el efecto de la mutación *guaB* en *S. meliloti* sobre las propiedades simbióticas con alfalfa. En primer término, realizamos un análisis de la cinética de nodulación, encontrando que tanto el tiempo de aparición como el número de nódulos formados por planta eran comparables a los formados por la cepa silvestre. Los valores máximos de nódulos por planta se alcanzaron aproximadamente a los treinta días desde la inoculación (Figura 7). Asimismo, la observación de los nódulos maduros inducidos por la cepa mutante no reveló diferencias obvias comparándolos con los de la cepa salvaje, la cepa mutante induce nódulos de color rojizo en su interior característicos de los nódulos efectivos que poseen leghemoglobina, de tamaño y aspecto externo similar a los nódulos salvajes.

Realizamos un examen más detallado de los nódulos empleando microscopía óptica y electrónica de transmisión, los resultados de estas observaciones son presentados en las figuras 8 y 9. Los nódulos inducidos por la cepa *guaB* presentaron hilos de infección y las distintas regiones en las cuales se observaron bacterias en los diferentes estados de maduración. Las células del nódulo correspondientes a la zona meristemática joven presentan células infectadas con bacteroides jóvenes, de forma redondeada, y regiones ricas en ribosomas, de espacios peribacteroidal fino, en general conformando simbiosomas simples. Por otro lado, en las células totalmente infectadas se encuentran bacteroides alargados, de mayor tamaño, formando en algunos casos simbiosomas múltiples, con espacios peribacteroidales visibles (Figura 8.A y B). Estos rasgos propios de nódulos normales se corresponden con la observación del nódulo completo. Así, como se muestra en la Figura 9 en un corte longitudinal del nódulo se observan las zonas características del nódulo indeterminado consistente en meristema, zona de invasión, zona de fijación y zona de senescencia. Similar a lo observado en los nódulos salvajes, la región de infección del nódulo mutante presenta gran cantidad de células invadidas, observándose además, la acumulación de gránulos de almidón en el citoplasma celular.

Los resultados mostrados en esta sección indican que la mutación en el gen *guaB* de *S. meliloti* no afecta su capacidad de nodular alfalfa. Asimismo, evaluamos la capacidad de fijación de estos nódulos mediante medidas de actividad de nitrogenasa en ensayos de reducción de acetileno. Encontramos que los valores promedio de actividad de nitrogenasa determinados en los nódulos mutantes (650 nmol/planta por hora) son equivalentes a los valores de los nódulos salvajes inducidos por las cepas mutante (679 nmol/planta por hora), indicando que la cepa *GuaB*⁻ de *S. meliloti* es efectiva en la simbiosis con alfalfa. Estos datos concuerdan con el aspecto general de las plantas inoculadas con la cepa mutante, las cuales no presentan síntomas de deficiencia de nitrógeno a diferencia de las plantas testigos sin inocular. A partir de estos resultados concluimos que la mutación en el gen *guaB* de *S. meliloti* no afecta su interacción simbiótica con alfalfa.

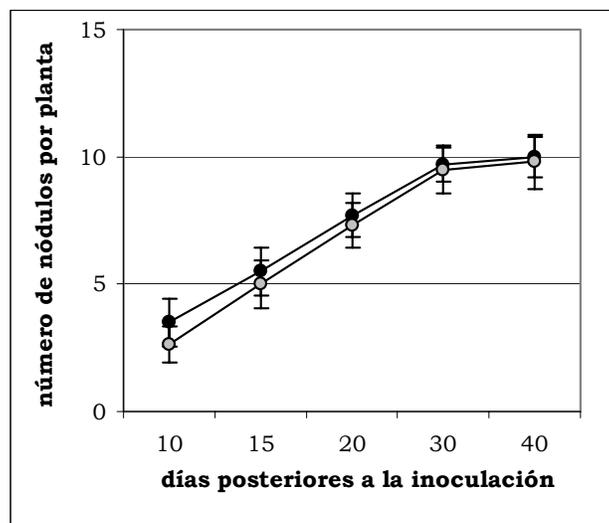


Figura 7. Cinética de nodulación de plantas de alfalfa inoculadas con las cepas mutante *guaB* (○) y salvaje *S. meliloti* 1021 (●). Las plantas fueron mantenidas en bolsas plásticas transparentes y se regaron periódicamente con solución mineral de Fahraeus. Los datos graficados corresponden al valor promedio de tres repeticiones (45 plantas totales).

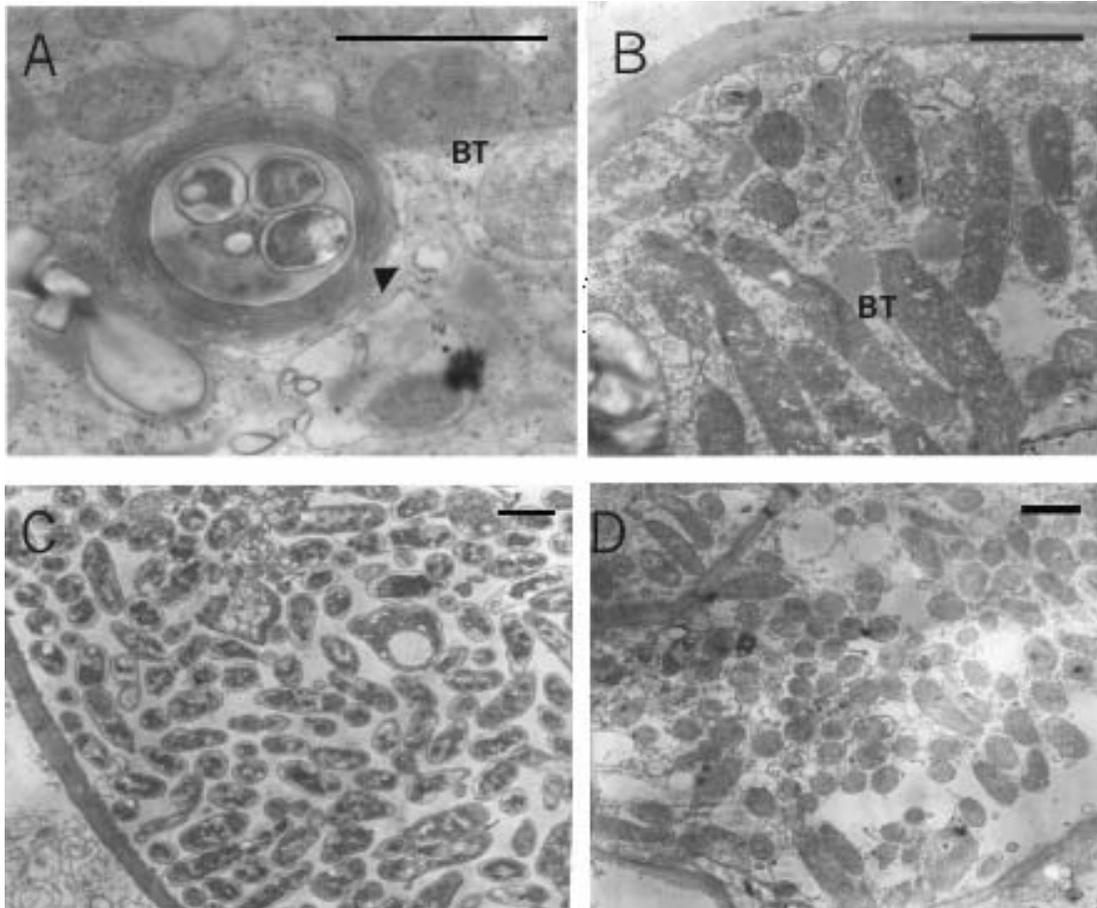


Figura 8. Micrografía electrónica de nódulos de alfalfa. Nódulos inducidos por las cepas mutante MC1021 (**A, B y C**) y salvaje *S. meliloti* 1021 (**D**). **A.** Se observa una célula recientemente infectada, donde se indica un hilo de infección intracelular (flecha), rodeado por bacteroide jóvenes (BT). **B.** Célula con simbiosomas diferenciados; se observan los bacteroides alargados con gránulos de polihidroxibutiratos. **C y D.** Células completamente invadidas por bacteroides de las cepas mutante 1021 *guaB* (**C**) o salvaje (**D**). Barra 2 μm .

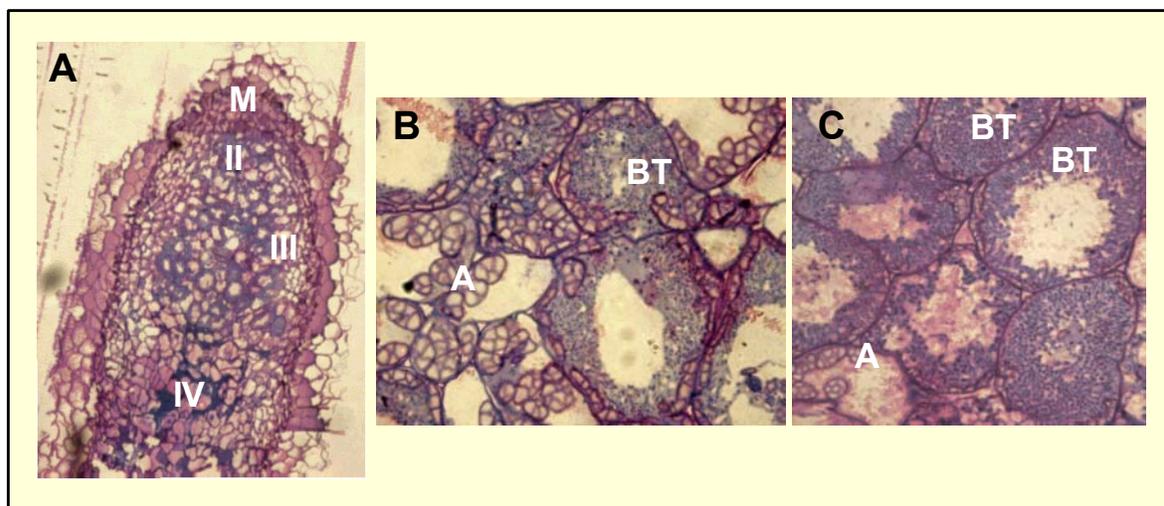


Figura 9. Nodulación de alfalfa por el mutante MC. 1021. Los nódulos inducidos por las cepas mutante (A y B), y salvaje (C), fueron cortados en secciones semi-finas y teñidos con azul de toluidina 0.5%. A. Se observan las zonas características del nódulo: (M) meristema, (II) zona de invasión, (III) zona de fijación, (IV) zona de senescencia. En la región de fijación se observan las células invadidas con bacteroides (BT) y los gránulos de almidón (A).

Requerimiento del gen *guaB* de *R. tropici* en la interacción con siratro

Con el propósito de profundizar el estudio del fenotipo simbiótico de la cepa CIAT899-10.T, realizamos ensayos de nodulación con otro de sus hospedantes, siratro (*Macroptilium atropurpureum*) el cual forma nódulos determinados.

A los 40 días post inoculación, las plantas inoculadas con el mutante CIAT899-10.T presentaron nódulos numerosos y pequeños, si bien fueron similares en la coloración interna y distribución en la raíz a los nódulos salvajes (Figura 10). Los nódulos fueron fijados y se realizaron cortes para la observación microscópica. Este análisis mostró que la cepa mutante fue capaz de invadir las células del nódulo. En ambas cepas, los nódulos presentan la estructura anatómica típica de los nódulos determinados, con una región central constituida por células conteniendo bacteroides rodeadas a su vez por células no infectadas, las cuales contienen numerosos amiloplastos (Figura 11.A y B). En la microscopía electrónica, se observan simbiosomas con bacteroides múltiples, la formación de estructuras de conexión así como eventos de fusión entre simbiosomas cercanos (Figura 11.C y D).

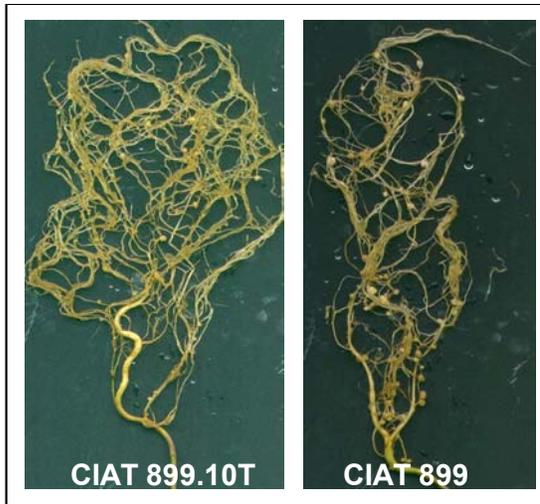


Figura 10. Nodulación de plantas de siratro por las cepas salvaje y mutante *guaB* de *R. tropici*. Los nódulos inducidos por la cepa mutante CIAT899 10.T (panel izquierdo) son numerosos y pequeños en relación con la cepa salvaje (panel de la derecha).

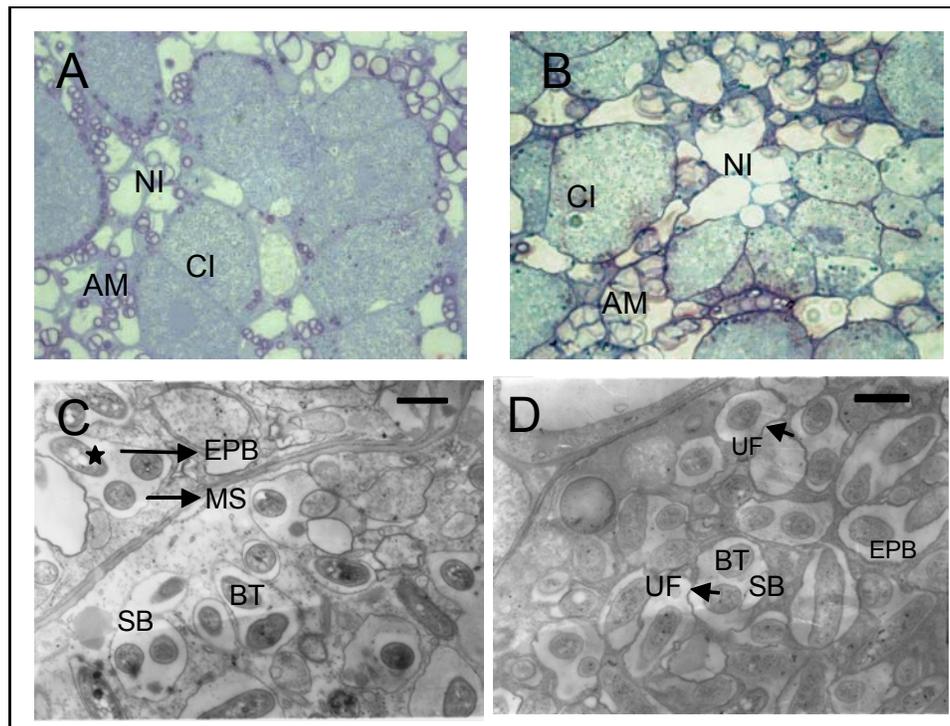


Figura 11. Micrografías ópticas y electrónicas de nódulos de siratro inducidos por *R. tropici*. En nódulos inducidos por las cepas salvaje (A) y mutante *guaB* (B) de *R. tropici* se observa la presencia de numerosas células invadidas (CI) por bacteroides; alrededor de las mismas se presentan células no infectadas (NI) con gránulos de almidón en el citoplasma (AM). En las figuras C y D se observan detalles de los simbiosomas (SB) en células del nódulo salvaje (C) y mutante (D). El asterisco indica las reservas de polihidroxibutirato (PHB) en los bacteroides (BT); asimismo se señala con flecha el espacio peribacteroidal (EPB), la membrana del simbiosoma (MS) y las uniones estrechas entre bacteroides cercanos (UF). Barra, 1 μ m.

Determinamos la ocupancia del nódulo mediante el recuento de bacterias. Los nódulos fueron cosechados, esterilizados superficialmente y plaqueados en medio TY-agar suplementado con los antibióticos correspondientes. Las plantas inoculadas con las bacterias salvajes presentaron 10^8 bacterias por nódulo, mientras en los nódulos de la cepa mutante el número de bacterias fue de 10^6 . Asimismo, evaluamos la eficiencia de fijación de nitrógeno del mutante comparando los valores de peso seco de las plantas y mediante la determinación de la actividad nitrogenasa de los nódulos. A los 50 días de la inoculación el promedio de peso seco de la parte aérea de las plantas inoculadas con la cepa mutante fue inferior (59 mg/planta) al valor observado en la cepa salvaje (104 mg/planta). Estas diferencias encontradas en los valores de peso seco de las plantas se correlacionan con las determinaciones de actividad nitrogenasa en los nódulos. En los ensayos de reducción de acetileno, en porcentajes relativos el mutante tiene entre el 30 y el 50% de la cepa salvaje.

Concluyendo, el mutante *guaB* de *R. tropici* es infectivo en la nodulación con *Macropodium atropurpureum*, se observa la formación de bacteroides y los nódulos son fijadores. Sin embargo, la menor ocupancia en el nódulo (dos ordenes menos de magnitud) indica que la mutación en el gen *guaB* afecta la capacidad invasiva de la bacteria. Esta característica defectiva se refleja en la disminución de los valores de fijación de nitrógeno en los nódulos mutantes.

Discusión

En el presente capítulo investigamos la importancia de la expresión del gen *guaB* bacteriano en las asociaciones *S. meliloti*-alfalfa y *R. tropici*-siratro. Para la especie *S. meliloti* 1021 se encuentra disponible la secuencia genómica completa, lo que facilitó la mutagénesis específica del gen *guaB*. El mutante *guaB*, denominado MC. 1021, es auxótrofo para guanina, a diferencia de lo observado con el mutante de *R. tropici*. Sin embargo, encontramos actividad Xdh en los extractos de la cepa salvaje *S. meliloti* y del mutante MC.1021. Por otra parte, la suplementación al medio de cultivo de la cepa mutante con los nucleótidos adenina e hipoxantina (el cual es uno de los substratos de la enzima Xdh) le permitió al mutante recuperar el crecimiento salvaje. Asimismo, la adición de allopurinol, un inhibidor específico de la Xdh, inhibe el crecimiento de la cepa mutante *guaB*. Estos resultados demuestran que la vía alternativa mediada por la enzima Xdh es funcional en *S. meliloti*, sin embargo es probable que el nivel de los precursores de la enzima sea bajo y que a diferencia de *R. tropici*, en *S. meliloti* estos niveles no sean suficientes para sostener el crecimiento prototrófico en la cepa mutante *guaB*. Claramente estos resultados indican que la mutación en un mismo gen puede producir modificaciones fisiológicas diferentes en diferentes especies de rizobios.

Por otra parte, en nuestro ensayo de actividad de Xdh nos resultó llamativo encontrar que los niveles detectados en el mutante derivado de *S. meliloti* resultaron superiores a los de la cepa salvaje, mientras que en el caso de *R. tropici* y su respectivo mutante *guaB* no se observaron diferencias obvias de actividad Xdh entre los mismos. Asimismo, encontramos que solo una de las formas de la enzima, la codificada por el operón *xdhA1-xdhB1-xdhC*, se encuentra inducida. Estas observaciones indicarían que la expresión de la actividad Xdh es inducida en *S. meliloti* cuando la vía de síntesis *de novo* de guanina se encuentra interrumpida. Asimismo, podemos especular que la síntesis de GMP a partir de xantina vía la enzima Xdh es más eficiente en la especie *R. tropici* comparada con *S. meliloti*. La función de la *xdh* ha sido descrita en *E. coli* (Xi *et al.*, 2000), estos autores proponen que la enzima es importante en la síntesis de GMP a partir de adenina, lo cual sería similar a lo observado en *R. tropici*.

Ex planta, los mutantes auxótrofos de purinas de *R. etli* crecen en presencia del exudado radicular de poroto, sin embargo en la simbiosis son incapaces de invadir las células del nódulo (VandenBosch *et al.*, 1985; Noel *et al.*, 1988); se especula que probablemente los intermediarios de purinas producidos por la planta de poroto no son transportados a la bacteria dentro de la raíz y que el fenotipo defectivo en la infección se deba a la auxotrofia del mutante (Noel *et al.*, 1988). Por el contrario, los mutantes *pur* de *S. meliloti* son capaces de invadir las células del nódulo de alfalfa, si bien se encuentran afectados en su capacidad de fijar nitrógeno (Dickstein *et al.*, 1991). Los resultados de nuestros ensayos de inoculación demostraron que la mutación del gen *guaB* en *S. meliloti* no afecta la nodulación ni la eficiencia de fijación en la simbiosis con alfalfa. Considerando la condición de auxotrofia de la cepa mutante, este resultado nos señala que, a diferencia de lo propuesto en poroto, en alfalfa existiría un aporte de purinas por parte de la planta que complementan al mutante en la etapa de infección y durante la estadía en las células del nódulo.

El fenotipo defectivo del mutante CIAT899 10.T en *Macroptilium* (siratro) es menos severo que en poroto. El mutante invade las células vegetales y los nódulos resultantes son efectivos en la fijación de nitrógeno. Sin embargo, ciertos parámetros tales como los ensayos de actividad nitrogenasa, la determinación de peso seco de las plantas y el recuento de bacterias totales por nódulo mostraron valores significativamente menores en la cepa mutante, demostrando un efecto negativo de la mutación en el gen *guaB* sobre la capacidad invasiva del mutante en los nódulos de siratro.

Nuestros resultados señalan, en primer término que el requerimiento de la expresión del gen *guaB* no es un fenómeno general, y segundo, que existe una probable asociación con la ontogenia del tipo de nódulo, determinado o indeterminado. La expresión del gen *guaB* es dispensable en las asociaciones de nódulos indeterminados como *R. tropici*-leucaena y *S. meliloti*-alfalfa. Por el contrario, en la asociación de *R. tropici* con leguminosas que forman nódulos determinados, como lo son siratro, caupí, y poroto, la expresión del gen *guaB* es necesaria para completar eficientemente el proceso simbiótico.

Se ha descrito que el efecto de algunos genes bacterianos es variable según se trate del proceso simbiótico con una u otra leguminosa hospedante (Pooyan

et al., 1994; García *et al.*, 1996; Finnie *et al.*, 1997). Así, el mutante *exoB* de *B. japonicum*, el cual presenta alterada la síntesis de los exopolisacáridos, es Fix⁺ en la simbiosis con *Glicine max*, mientras en plantas de *Glicine soja* induce estructuras tipo-nódulos vacías de bacterias (Parniske *et al.*, 1994). En forma similar, en *S. meliloti* la expresión del gen *typA*, ortólogo del gen *bypA* de *E. coli*, presenta un rol variable en la simbiosis de *M. truncatula*, afectando la infección o la fijación de nitrógeno de acuerdo a la variedad ensayada, contrariamente no afecta significativamente la interacción con otras variedades de la misma especie (Kiss *et al.*, 2004).

Se ha propuesto que el entorno que encuentra la bacteria durante la infección y la etapa de diferenciación del bacteroide dentro de las células del nódulo difiere entre las especies leguminosas (pH, nutrientes, concentración osmótica, estrés oxidativo) (Schubert, 1986; Taté *et al.*, 1999^a; Kiss *et al.*, 2004). En este contexto, se puede asumir que la mutación en el gen *guaB* afecta la capacidad adaptativa de las bacterias al medio interno de algunos nódulos.

Alternativamente, el gen *guaB* podría cumplir un rol específico en la simbiosis. En *Shigella flexneri* la mutación en los genes *guaAB* afecta la capacidad invasiva y la multiplicación celular de la bacteria (Noriega *et al.*, 1996; Cersini *et al.*, 1998). En forma similar, es posible especular que *R. tropici*, durante la interacción con sus hospedantes que forman nódulos determinados, produce alguna señal dependiente de la expresión del gen *guaB*, necesaria para invadir eficientemente las células del nódulo.

Conclusiones Generales

Conclusiones generales

A partir del trabajo de esta tesis –centrado en el estudio de uno de los varios genes de la vía biosintética de purinas– concluimos que sus resultados contribuyen al conocimiento de la biología de los rizobios. La capacidad de los rizobios de establecer una simbiosis fijadora de nitrógeno con leguminosas hospedadoras, constituye una propiedad particular de los mismos, que los distingue del resto de los organismos procarióticos. Los estudios sobre los determinantes genéticos de esta capacidad han permitido la descripción de un conjunto de genes cuyas funciones son específicas para la simbiosis (genes *nod/nif/fix*), y también demostrado que ciertos genes que forman parte del metabolismo general son esenciales para una simbiosis exitosa. El hallazgo de que el gen *guaB* de *Rhizobium tropici* es importante para la simbiosis ayudó a darle una relevancia adicional más allá de la conocida función en la formación de precursores de macromoléculas esenciales para la célula. La demostración que la alteración negativa del gen *guaB* se manifiesta en una deficiencia en las etapas tardías del proceso de infección de la raíz de poroto, agregó otra propiedad que refuerza el interés del caso. En los párrafos siguientes se hará una revisión de los aspectos que en esta tesis se identifican como aportes originales al conocimiento en un contexto generalizado y en particular dentro de la rizobiología.

El gen *guaB* de *R. tropici* mapea entre dos marcos de lectura activos cuyas secuencias no se encuentran relacionadas con genes de la vía de síntesis de guanina. El gen (ORF1) que precede a *guaB* codifica para una metalobetalactamasa, la organización ORF1-gen *guaB* se conserva en los rizobios *S. meliloti*, y *A. tumefaciens*. Asimismo, a diferencia de lo observado en *E. coli*, donde los genes *gua* se encuentran organizados en un operón *guaBA*, los genes *gua* de *R. tropici* se encuentran localizados en regiones cromosomales separadas. La expresión del gen *guaB*, en forma similar a otros genes que participan en vías biosintéticas, experimenta una regulación negativa por las purinas que corresponden a productos finales de la vía. Por otra parte, aunque es claro que *R. tropici* requiere guanina para crecer en condiciones de alta temperatura, el estrés térmico no actúa como un factor activante de la expresión del gen *guaB*, indicando que la expresión constitutiva de este gen es suficiente

para mantener la síntesis de guanina requerida durante el crecimiento en condiciones de estrés.

La respuesta celular al estrés térmico es un mecanismo generalizado en los seres vivos, consiste en un aumento en la síntesis de un grupo de proteínas (HSPs), la mayoría de las cuales se encuentran altamente conservada entre las especies. En los rizobios, la actividad de varias de estas proteínas, incluyendo DnaK y GroEL, son necesarias para expresar la capacidad de fijación de nitrógeno por parte de los bacteroides del nódulo. La ausencia de actividad IMPd no afecta, en tiempos cortos de estrés, la síntesis de proteínas de estrés térmico en *R. tropici*, incluyendo las proteínas DnaK y GroEL. Sin embargo, la síntesis de proteínas en períodos prolongados de estrés depende de la disponibilidad de guanina, lo que demuestra la importancia de la guanina en la fisiología celular durante las condiciones de shock térmico.

En la interacción simbiótica, el requerimiento de la expresión del gen *guaB*, demostrado para *R. tropici*, no es un fenómeno generalizado entre los rizobios y probablemente se encuentra asociado con la ontogenia del nódulo, determinado o indeterminado, dado que la expresión del gen *guaB* es dispensable en las asociaciones de nódulos indeterminados como es el caso de los formados por leucaena o alfalfa, mientras que en las asociaciones con leguminosas tropicales que forman nódulos determinados, como lo son siratro, caupí, y poroto, el defecto en el gen *guaB* aparece ligado al fenotipo simbiótico defectivo. Estos resultados invitan a especular en la existencia de una señal generada por el rizobio -dependiente de *guaB*- necesaria para su liberación dentro de las células del nódulo determinado.

Por otra parte, la ausencia de actividad IMPd pone de relieve potencialidades metabólicas propias de cada especie de rizobio que en uno u otro caso, se manifiestan alternativamente como fenotipos auxotróficos o prototróficos. El análisis de *S. meliloti* permitió demostrar que, de manera diferente a lo encontrado en *R. tropici*, la actividad Xdh no es suficiente para conferir un fenotipo prototrófico. Se puede asumir que la Xdh como enzima de vía alternativa tiene alcances funcionales diferentes entre estas especies, y que en el caso de *R. tropici* la eficiencia de esta vía de salvataje es mayor que en *S. meliloti*.

Evidentemente, el producto de algunos genes cumple funciones que cruzan horizontalmente diversos compartimentos de la célula. Más allá de los resultados obtenidos en esta tesis, surgen preguntas y perspectivas de investigaciones nuevas. Entendemos que es importante profundizar los estudios dirigidos a revelar cuál es el rol preciso del producto del gen *guaB* en la tolerancia al estrés térmico a través de enfoques modernos tales como análisis transcriptómico y proteómico. Asimismo, investigar a través del uso de mutantes *guaB* de diversas especies de rizobios, su respectiva asociación con la planta hospedadora en particular aquellos casos en que forman nódulos determinados pero, exportan el nitrógeno fijado no como ureidos sino como amidas. El estudio de la simbiosis *Mesorhizobium loti-Lotus japonicum* podría representar una avenida de estudio dirigido a responder esta pregunta.

En su conjunto estos estudios permitirían abordar al conocimiento global e integrado del funcionamiento celular microbiológico en un contexto moderno delineado conceptualmente por Systems Microbiology (*Systems Microbiology*, a report from the American Academy of Microbiology, 2004).

Referencias Bibliográficas

Referencias Bibliográficas

- Aguilar, O.M.; López, M.V. y Riccillo, P.M.** 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J. Biotechnol.* 91: 181-188.
- Alexander, M.** 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Editor. Mexico 18 D.F.
- Amarger, N.; Macheret, V. y Laguerre, G.** 1997. *Rhizobium gallicum* sp. nov. and *Rhizobium giardinii* sp. nov. from *Phaseolus vulgaris* nodules. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 996-1006.
- Ane, J.M.; Kiss, G.B.; Riely, B.K.; Penmetsa, R.V.; Oldroyd, G.E.; Ayax, C.; Levy, J.; Debelle, F.; Baek, J.M.; Kalo, P.; Rosenberg, C.; Roe, B.A.; Long, S.R.; Denarie, J. y Cook, D.R.** 2004. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science.* 303: 1364-1367.
- Araujo, R.S.; Robleto, E.A. y Handelsman, J.** 1994. A hydrophobic mutant of *Rhizobium etli* altered in nodulation competitiveness and growth in the rhizosphere. *Applied and Env. Microbiology.* 60: 1430-1436.
- Aravind, L.** 1999. An evolutionary classification of the metallo- β -lactamase fold proteins. *In Silico Biol.* 1: 69-91.
- Arayankoon, T.; Schomberg, H.H. y Weaver, R.W.** 1990. Nodulation and nitrogen fixation of guar at high root temperature. *Plant Soil* 126: 209-213.
- Ardourel, M.; Demont, N.; Debelle, F.; Maillet, F.; de Billy, F.; Prome, J.C.; Denarie, J. y Truchet, G.** 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell.* 6: 1357-1374.
- Atkins, C.A.; Shelp, B.J. y Storer, P.J.** 1985. Purification and properties of inosine monophosphate oxido-reductase from nodules of cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Arch Biochem Biophys* 236: 807-814.
- Atkins, C.A.** 1991. Ammonia assimilation and export of nitrogen from the legume nodule. En: MJ Dilworth, AR Glenn, Eds. *Biology and Biochemistry of Nitrogen Fixation.* Elsevier, Amsterdam, p. 293-319.
- Atkins, C.A.; Fernando, M.; Hunt, S. y Layzell, D.B.** 1992. A metabolic connection between nitrogenase activity and the synthesis of ureides in nodulated soybean. *Physiol Plant* 84: 441-447.
- Atkins, C.A.; Smith, P. y Storer, P.J.** 1997. Reexamination of the intracellular localization of *de novo* purine synthesis in cowpea nodules. *Plant Physiol.* 113: 127-135.
- Barbosa, T.M. y Levy, S.B.** 2000. Differential expression of over 60 chromosomal genes in *Escherichia coli* by constitutive expression of MarA. *J. Bacteriol.* 182: 3467-3474.
- Batut, J.; Daveran-Mingot, M.L.; David, M.; Jacobs, J.; Garnerone, A.M. y Kahn, D.** 1989. *fixK*, a gene homologous with *fnr* and *crp* from *Escherichia coli*, regulates nitrogen fixation genes both positively and negatively in *Rhizobium meliloti*. *EMBO J.* 8: 1279-1286.
- Batut, J. y Boistard, P.** 1994. Oxygen control in *Rhizobium*. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 66: 129-150.
- Beck, C.; Marty, R.; Klausli, S.; Hennecke, H. y Gottfert, M.** 1997. Dissection of the transcription machinery for housekeeping genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 179: 364-369.
- Becker, A.; Schmidt, M.; Wolfgang, J.; y Puhler, A.** 1995. New gentamicin-resistance and *lacZ* promoter-probe cassettes suitable for in-sertion mutagenesis and generation of transcriptional fusions. *Gene* 162:37-39.

- Becker, A.; Bergès, H.; Krol, E.; Bruand, C.; Rüberg, S.; Capela, D.; Lauber, E.; Meilhoc, E.; Ampe, F.; de Bruijn, F.; Fourment, J.; Francez-Charlot, A.; Kahn, D.; Küster, H.; Liebe, C.; Pühler, A.; Weidner, S.; y Batut, J.** 2004. Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 292-303.
- Beringer, J. E.** 1974. R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84:188-198
- Bishop, P.E.; Jarlenski, D.M. y Hetherington, D.R.** 1982 Expression of an alternative nitrogen fixation system in *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 150(3): 1244-1251.
- Bittinger MA, Milner JL, Saville BJ, Handelsman J.** 1997. *rosR*, a determinant of nodulation competitiveness in *Rhizobium etli*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 180-186.
- Bladergroen, M.R. y Spaink, H.P.** 1998. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminosae symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1: 353-359.
- Bolotin, A.; Quinquis, B.; Renault, P.; Sorokin, A.; Ehrlich, S.D.; Kulakauskas, S.; Lapidus, A.; Goltsman, E.; Mazur, M.; Pusch, G.D.; Fonstein, M.; Overbeek, R.; Kyprides, N.; Purnelle, B.; Prozzi, D.; Ngui, K.; Masuy, D.; Hancy, F.; Burteau, S.; Boutry, M.; Delcour, J.; Goffeau, A. y Hols, P.** 2004. Complete sequence and comparative genome analysis of the dairy bacterium *Streptococcus thermophilus*. *J. Nat. Biotechnol.* 22: 1554-1558.
- Bonner, W.M. y Laskey, R.A.** 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur J Biochem.* 46:83-8.
- Brewin, N.J.** 1998. Tissue and cell invasion by *Rhizobium*: The structure and development of infection threads and symbiosomes. En: *The Rhizobiaceae*. Spaink, H.P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 417-429.
- Broughton, W.J.** 2003. Roses by Other Names: Taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* 185: 2975-2979.
- Broughton, W.J.; Hernández, G.; Blair, M.; Beebe, S.; Gepts, P. y Vanderleyden, J.** 2003. Beans (*Phaseolus* spp.) model food legumes. *Plant and Soil* 252: 55-128.
- Cabanes, D.; Boistard, P. y Batut, J.** 2000. Identification of *Sinorhizobium meliloti* Genes Regulated during Symbiosis. *J Bacteriol.* 182: 3632-3637.
- Cain, B.; Norton, P.J.; Eubanks, W.; Nick, H.S. y Allen, C.M.** 1993. Amplification of the *bacA* gene confers bacitracin resistance to *Escherichia coli*. *J Bacteriol*;175:3784-3789.
- Callebaut, I.; Moshous, D.; Mornon, J.P. y De Villartay, J.P.** 2002. Metallo- β -lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the β -CASP family. *Nucleic Acids Res.* 30: 3592-3601.
- Cao, Y. y Schubert, K.R.** 2001. Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding soybean nodule IMP dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta.* 1520:242-246.
- Cashel, M.; Gentry, D.R.; Hernandez, V.J. y Vinella, D.** 1996. The Stringent Response. En: *Escherichia coli* and *Salmonella*., cellular and molecular biology. Neidhardt, F.C.; Curtis III R.; Ingraham, J. L.; Lin, E. C.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Reznicoff, W. S.; Riley, M.; Schaechter, M. y Umberger, H.E. Eds. ASM Press, Washington, D. C. p.1458-1496.
- Cebolla, A.; Vinardell, J.M.; Kiss, E.; Olah, B.; Roudier, F.; Kondorosi, A. y Kondorosi, E.** 1999. The mitotic inhibitor *ccs52* is required for endoreduplication and ploidy-dependent cell enlargement in plants. *EMBO J.* 18: 4476-4484.
- Cermola, M.; Fedorova, E.; Tate, R.; Riccio, A.; Favre, R. y Patriarca, E.J.** 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 733-741.

- Cersini, A.; Salvia, A.M. y Bernardini, M.L.** 1998. Intracellular multiplication and virulence of *Shigella flexneri* auxotrophic mutants. *Infect Immun.* 66:549-57.
- Cevallos, M. A.; Encarnacion S.; Leija, A.; Mora, Y. y Mora, J.** 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly- β -hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* 178: 1646-1654.
- Charon, C.; Johansson, C.; Kondorosi, E.; Kondorosi, A. y Crespi, M.** 1997. *enod40* induces dedifferentiation and division of root cortical cells in legumes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 8901-8906.
- Chen, W-M.; Laevens, S.; Lee, T.M.; Coenye, T.; de Vos, P.; Mergeay, M.; y Vandamme, P.** 2001. *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species and sputum of a cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiology.* 51: 1729-1735.
- Chen, W-M.; Moulin, L.; Bontemps, C.; Vandamme, P.; Béna, G. y Boivin-Masson, C.** 2003. Legume symbiotic nitrogen fixation by β -proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185: 7266-7272.
- Cheon, C.I.; Lee, N.G.; Siddique, A.B.; Bal, A.K. y Verma, D.P.** 1993. Roles of plant homologs of Rab1p and Rab7p in the biogenesis of the peribacteroid membrane, a subcellular compartment formed *de novo* during root nodule symbiosis. *EMBO J.* 12: 4125-4135.
- Chomczynsky, P.** 1992. One hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry.* 201: 134-139.
- Christiansen, L.C.; Schou, S.; Nygaard, P. y Saxild, H.H.** 1997. Xanthine metabolism in *Bacillus subtilis*: characterization of the *xpt-pbuX* operon and evidence for purine- and nitrogen-controlled expression of genes involved in xanthine salvage and catabolism. *J. Bacteriol.* 179: 2540-2550.
- Chun, J.Y.; Sexton, G.L.; Roth, L.E. y Stacey, G.** 1994. Identification and characterization of a novel *Bradyrhizobium japonicum* gene involved in host-specific nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 176: 6717-6729.
- Cosseau, C.; Garnerone, A.M. y Batut, J.** 2002. The *fixM* flavoprotein modulates inhibition by AICAR or 5'AMP of respiratory and nitrogen fixation gene expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol Plant Microbe Interact.* 15:598-607.
- Crespi, M.D.; Jurkevitch, E.; Poiret, M.; d'Aubenton-Carafa, Y.; Petrovics, G.; Kondorosi, E. y Kondorosi, A.** 1994. *enod40*, a gene expressed during nodule organogenesis, codes for a non-translatable RNA involved in plant growth. *EMBO J.* 13: 5099-5112.
- Crespi, M. y Gálvez, S.** 2000. Molecular mechanisms in root nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 19: 155-166.
- Csanadi, G.; Szecsi, J.; Kalo, P.; Kiss, P.; Endre, G.; Kondorosi, A.; Kondorosi, E. y Kiss, G.B.** 1994. ENOD12, an early nodulin gene, is not required for nodule formation and efficient nitrogen fixation in alfalfa. *Plant Cell.* 6: 201-213.
- Daiyasu, H.; Osaka, K.; Ishino, Y. y Toh, H.** 2001. Expansion of the zinc metallo-hydrolase family of the β -lactamase fold. *FEBS Lett.* 503: 1-6.
- D'Argenio, D.A. y Miller, S.I.** 2004. Cyclic di-GMP as a bacterial second messenger. *Microbiology.* 150: 2497-2502.
- Datta, D.B.; Triplett, E.W. y Newcomb, E.H.** 1991. Localization of xanthine dehydrogenase in cowpea root nodules: implications for the interaction between cellular compartments during ureide biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 4700-4702.
- Davey, M.R.; Cocking, E.C. y Busch, E.** 1973. Symbiosis between *Rhizobium* and non legume, *Trema Aspera*. *Nature* 244: 459-461.
- Davies, I.J. y Drabble, W.T.** (1996) Stringent and growth-rate-dependent control of the *gua* operon of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 142: 2429-2437.
- Dean, D.R. y Jacobson, M.R.** 1992. Biochemical genetics of nitrogenase. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G.; Burris, R.H. y Evan, H.J. Eds. Chapman y Hall. New York, London, p.763-834.

- Debelle, F.; Plazanet, C.; Roche, P.; Pujol, C.; Savagnac, A.; Rosenberg, C.; Prome, J.C. y Denarie, J.** 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the N-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiology*. 22: 303-314
- Deng, W.; Liou, S.R.; Plunkett, G.; Mayhew, G.F.; Rose, D.J.; Burland, V.; Kodoyianni, V.; Schwartz, D.C.; Blattner, F.R.** 2003. Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J. Bacteriol.* 185: 2330-2337.
- Derre, I.; Rapoport, G. y Msadek, T.** 1999. CtsR, a novel regulator of stress and heat shock response, controls *clp* and molecular chaperone gene expression in gram-positive bacteria. *Mol. Microbiol.* 31: 117-131.
- Dickstein, R.; Scheirer, D. C.; Fowle, W. H. y Ausubel, F. M.** 1991. Nodules elicited by *Rhizobium meliloti* heme mutants are arrested at an early stage of development. *Mol. Gen. Genet.* 230: 423-432.
- Djordjevic, S.P.; Ridge, R.W.; Chen, H.; Redmond, J.W.; Bately, M. y Rolfe, B.G.** 1988. Induction of pathogenic-like responses in the legume *Macroptilium atropurpureum* by a transposon-induced mutant of the fast-growing, broad-host-range *Rhizobium* strain NGR234. *J. Bacteriol.* 170: 1848-1857.
- Djordjevic, S.; Weinman, J.; Djordjevic, M. y Rolfe, B.** 1996. The addition of 5-aminoimidazole-4-carboxamide-riboside to nodulation defective purine auxotrophs of NGR234 restores prototrophy but leads to novel root outgrowths on sirartro. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 114-124.
- Djordjevic, M.A.; Chen, H.C.; Natera, S.; Van Noorden, G.; Menzel, C.; Taylor, S.; Renard, C.; Geiger, O.; the *Sinorhizobium* DNA Sequencing Consortium y Weiller, G.F.** 2003. A global analysis of protein expression profiles in *Sinorhizobium meliloti*: discovery of new genes for nodule occupancy and stress adaptation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 508-524.
- Downie, J.A** 1998. Functions of Rhizobial nodulation genes. . En: *The Rhizobiaceae*. Spaink, H.P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 387-402.
- Doyle, J.F.** 1998 Phylogenetic perspectives on nodulation: evolving views of plants and symbiotic bacteria. *Trends in Plant Science Reviews*. 3: 12.
- Eady, R. R.** 1996. Structure-function relationships of alternative nitrogenases. *Chem. Rev.* 96, 3013-3030.
- Ebbole, D.J. y Zalkin, H.** 1989. *Bacillus subtilis pur* operon expression and regulation. *J. Bacteriol.* 171: 2136-2141.
- Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* 1: 584-588.
- Ehrhardt, D.W.; Wais, R. y Long S.R.** 1996. Calcium spiking in plant root hairs responding to *Rhizobium* nodulating signals. *Cell* 85: 673-681.
- El Ghachi, M.; Bouhss, A.; Blanot, D. y Mengin-Lecreulx, D.** 2004. The *bacA* gene of *Escherichia coli* encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. *J. Biol. Chem.* 279:30106-13.
- Endre, G.; Kereszt, A.; Kevei, Z.; Mihacea, S.; Kalo, P. y Kiss, G.B.** 2002. A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. *Nature*. 417:962-966.
- Engelke, T.; Jording, D.; Kapp, D. y Pühler, A.** 1989. Identification and sequence analysis of the *Rhizobium meliloti dctA* gene encoding the C4-dicarboxylate carrier. *J. Bacteriol.* 171: 5551-5560.
- FAO.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org/>
- Ferguson, G.P.; Datta, A.; Baumgartner, J.; Roop, R.M.; Carlson, R.W. y Walker, G.C.** 2004. Similarity to peroxisomal-membrane protein family reveals that *Sinorhizobium* and *Brucella* BacA affect lipid-A fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:5012-7.

- Finnie, C.; Hartley, N.M.; Findlay, K.C. y Downie, J.A.** 1997. The *Rhizobium leguminosarum prsDE* genes are required for secretion of several proteins, some of which influence nodulation, symbiotic nitrogen fixation and exopolysaccharide modification. *Mol. Microbiol.* 25: 135-146.
- Fischer, H.M.; Babst, M.; Kaspar, T.; Acuna, G.; Arigoni, F. y Hennecke, H.** 1993. One member of a *gro-ESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *EMBO J.* 12: 2901-2912.
- Fisher, R.F.; Rushing, B.; Ogawa, J.; Barnett, M. y Long, S.R.** 1994. Nodulation gene expression in *Rhizobium meliloti*. En: *Advances in molecular genetics of plant-microbe interactions*. Daniels, M.J.; Downie, J.A. y Osbourn, A.E. Eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. p. 99-102.
- Foussard, M.; Garnerone, A.M.; Ni, F.; Soupene, E.; Boistard, P. y Batut, J.** 1997. Negative autoregulation of the *Rhizobium meliloti fixK* gene is indirect and requires a newly identified regulator, FixT. *Mol. Microbiol.* 25: 27-37.
- Freestone, P.; Trinei, M.; Clarke, S.C.; Nystrom, T. y Norris, V.** 1998. Tyrosine phosphorylation in *Escherichia coli*. *J Mol. Biol.* 279: 1045-1051.
- Frugier, F.; Poirier, S.; Satiat-Jeunemaitre, B.; Kondorosi, A. y Crespi.** 2000. A Kruppel-like zinc finger protein is involved in nitrogen-fixing root nodule organogenesis. *Genes Dev.* 14: 475-482.
- Gage DJ.** 2004. Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 68: 280-300.
- Galibert, F.; Finan, T.M.; Long, S.R.; Pühler, A.; Abola, P.; Ampe, F.; Barloy-Hubler.** 2001. The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* 293: 668-672.
- Garcia, M.; Dunlap, J.; Loh, J. y Stacey, G.** 1996. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 625-636.
- Gepts, P. y Debouck, D.** 1991 Origin, domestication, and evolution of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). En: *Common Beans: Research for Crop Improvement*. Eds. van Schoonhoven, A. y Voyses O. C. A. B. Int., Wallingford, UK and CIAT, Cali, Colombia. p. 7-53.
- Geurts, R. y Franssen, H.** 1996. Signal transduction in *Rhizobium*-induced nodule formation. *Plant Physiol.* 112: 447-453.
- Glazebrook, J.; Ichige, A. y Walker, G.C.** 1993. A *Rhizobium meliloti* homolog of the *Escherichia coli* peptide-antibiotic transport protein SbmA is essential for bacteroid development. *Genes Dev.* 7: 1485-1497.
- Gordon, A.J., Minchin, F.R., James, C.L. y Komina, O.** 1999. Sucrose synthase in legume nodules is essential for nitrogen fixation. *Plant Physiol.* 120: 867-878.
- Graham, P.H.; Viteri, S.E.; Mackie, A.A.; Vargas, T. y Palacios, A.** 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 5: 121-128.
- Grant, A.J.; Farris, M.; Alefounder, P.; Williams, P.H.; Woodward, M.J.; y O'Connor, C. D.** 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol. Microbiol.* 48: 507-521.
- Hadri, A-E. y Bisseling, T.** 1998. Response of the plant to Nod factors. En: *The Rhizobiaceae*. Spaink, H.P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 403-416.
- Hadri, A-E., Spaink, H.P., Bisseling, T. y Brewin, N.J.** 1998. Diversity of root nodulation and rhizobial infection processes. En: *The Rhizobiaceae*. Spaink, H.P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 347-360
- Hahn, M. y Studer, D.** 1986. Competitiveness of a *nif* *Bradyrhizobium japonicum* mutant against the wild-type strain. *FEMS Microbiol. Lett.* 33: 143-148.

- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. J. Mol. Biol. 166:557-580.
- Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K., y Burns R.C.** 1968. The C₂H₂-C₂H₄ assay for N₂ fixation: laboratory and field evaluation. Plant Physiol. 43:1185-1207.
- Hecker, M. y Volker, U.** 1998. Non-specific, general and multiple stress resistance of growth-restricted *Bacillus subtilis* cells by the expression of the sigmaB regulon. Mol. Microbiol. 29: 1129-1136.
- Hernandez-Armenta, R.; Wien H.C., y Eaglesham, A.R.J.** 1989. Maximum temperature for nitrogen fixation in common bean. Crop Sci. 29: 1260-1265.
- Hernández-Lucas, I.; Segovia, L.; Martínez-Romero, E.; Pueppke, S.** 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. App. Env. Microbiol. 61: 2775-2779.
- Hirsch, A.M.** 1992. Development biology of legume nodulation. New Phytol. 122: 211-237.
- Hirsch, A.M.** 1999. Role of lectins and rhizobial exopolysaccharides in legume nodulation. Curr. Opin. Plant Biol. 2: 320-326
- Hirsch, A.M.; Lum, M.R. y Downie, J.A.** 2001. What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special?. Plant Physiology 127: 1484-1492.
- Hirsch, A.M. y Elliott, T.** 2002. Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 184: 5077-5087.
- Hungria, M.; Franco, A.A. y Sprent, J.I.** 1993. New sources of high temperature tolerant rhizobia for *Phaseolus vulgaris* L. Plant Soil 149: 103-109.
- Hungria, M.; Andrade, D.S., Chueirea, L.M.; Probanzac, A.; Guttierrez-Mañero, F.J. y Megías, M.** 2000. Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. Soil Biology and Biochemistry 32: 1515-1528
- Hunt, S. y Layzell, D.B.** 1993. Gas exchange of legume nodules and the regulation of nitrogenase activity. Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol. 44: 483-511.
- Huss-Danell, K.** 1997. Actinorhizal symbioses and their N₂ fixation. New Phytologist 136, 375-405.
- Hutchings, M.I. y Drabble, W.T.** 2000. Regulation of the divergent *guaBA* and *xseA* promoters of *Escherichia coli* by the cyclic AMP receptor protein. FEMS Microbiol. Lett. 187: 115-122.
- Ichige, A. y Walker, G.** 1997. Genetic analysis of the *Rhizobium meliloti* *bacA* gene: functional interchangeability with the *Escherichia coli* *sbmA* gene and phenotypes of mutants. J. Bacteriol. 179:209-216.
- ICSB. The Agrobacterium and Rhizobium of the International Committee of Systematic Bacteriology.** <http://honeybee.helsinki.fi/users/lindstro/Rhizobium/index.htm>.
- Jefferson, R.; Kavanagh, T. y Bevan, M.** 1987. GUS fusions: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6:3901-3907.
- Jin, Q.; Yuan, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Shen, Y.; Lu, W.; Wang, J.; Liu, H.; Yang, J.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang, J.; Yang, G.; Wu, H.; Qu, D.; Dong, J.; Sun, L.; Xue, Y.; Zhao, A.; Gao, Y.; Zhu, J.; Kan, B.; Ding, K.; Chen, S.; Cheng, H.; Yao, Z.; He, B.; Chen, R.; Ma, D.; Qiang, B.; Wen, Y.; Hou, Y. y Yu, J.** 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri*: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. Nucleic Acids Res. 30: 4432-4441.
- Johansen, L.E.; Nygaard, P.; Lassen, C.; Agerso, Y. y Saxild, H.H.** 2003. Definition of a second *Bacillus subtilis* *pur* regulon comprising the *pur* and *xpt-pbuX* operons plus *pbuG*, *nupG* (*yxjA*), and *pbuE* (*ydhL*). J Bacteriol. 185: 5200-5209.
- Jordan, D. C.** 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Eds. Williams y Willams Pub. Baltimore, London. 1: 1234-256.

- Kamst, E.; Spaink, H.P. y Kafetzopoulos, D.** 1998. Biosynthesis and secretion of rhizobial lipochitin-oligosaccharide signal molecules. *Subcell Biochem.* 29: 29-71.
- Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Asamizu, E.; Kato, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Idesawa, K.; Ishikawa, A. y Kawashima, K.** 2000. Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.* 7: 331-338.
- Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Sato, S.; Minamisawa, K.; Uchiumi, T.; Sasamoto, S.; Watanabe, A.; Idesawa, K.; Iriguchi, M. y Kawashima, K.** 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res.* 9: 189-197.
- Kanzaki, N. y Miyagawa, K.** 1990. Nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* IMP dehydrogenase gene. *Nucleic Acids Res.* 18: 6710.
- Kapp, D., Niehaus, K., Quandt, J., Muller, P. y Puhler, A.** 1990. Cooperative action of *Rhizobium meliloti* nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected alfalfa nodules. *Plant Cell.* 2: 139-151.
- Kavroulakis, N.; Flemetakis, E.; Aivalakis, G. y Katinakis, P.** 2000. Carbon metabolism in developing soybean root nodules: the role of carbonic anhydrase. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:14-22.
- Kerppola, T. y Kahn, M.** 1988. Symbiotic phenotypes of auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* 104A14. *J. of General Microbiology* 134: 913-919.
- Kijne, J.W.** 1992. The *Rhizobium* infection process. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G.; Burris, R.H. y Evan, H.J. Eds. Chapman y Hall. New York, London. p. 349-398.
- Kim, C-H; Kuykendall, L.; Shah, K. y Keister, D.** 1988. Induction of symbiotically defective auxotrophic mutants of *Rhizobium fredii* HH303 by transposon mutagenesis. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 423-427.
- Kiss, E.; Mergaert, P.; Oláh, B.; Kereszt, A.; Staehelin, C.; Davies, A.E.; Downie, J.A.; Kondorosi, Á. y Kondorosi, É.** 1998. Conservation of *noIR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:1186-1195.
- Kiss, E.; Huguet, T.; Poinot, V. y Batut, J.** 2004. The *typA* gene is required for stress adaptation as well as for symbiosis of *Sinorhizobium meliloti* 1021 with certain *Medicago truncatula* lines. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17: 235-244.
- Kiss, G. B.; Vincze, É.; Kálman, Z.; Forrai, T., y Kondorosi, Á.** 1979. Genetic and biochemical analysis of mutants affected in nitrate reduction in *Rhizobium meliloti*. *J. Gen. Microbiol.* 113:105-118.
- Knowles, R. y Barraquio, W.L.** 1994. Free-living dinitrogen-fixing bacteria. En: *Methods of soil analysis. Part. II: Microbiological and Biochemical properties*. Weaver, R.W. y Cols. Eds. Madison, WI: Soil Science Society of America.
- Kondorosi, E.; Banfalvi, Z. y Kondorosi, A.** 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: Identification. *Mol. Gen. Genet.* 193: 445-452.
- Kouchi, H. y Hata, S.** 1993. Isolation and characterization of novel nodulin cDNAs representing genes expressed at early stages of soybean nodule development. *Mol Gen Genet* 238:106-119.
- La Favre, A.K. y Eaglesham, A.R.J.** 1986. The effects of high temperatures on soybean nodulation and growth with different strains of bradyrhizobia. *Canadian J. of Microbiology.* Ottawa. 32: 22-27.
- Labidi, M.; Laberge, S.; Vezina, L.P. y Antoun, H.** 2000. The *dnaJ* (*hsp40*) locus in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* is required for the establishment of an effective symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1271-1274.
- Laemmli U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

- Laeremans, T. y Vanderleyden, J.** 1998 Review: infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 787-808.
- Laguerre, G.; Nour, S.M.; Macheret, V.; Sanjuan, J.; Drouin, P.; Amarger, N.** 2001 Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology.* 147: 981-993.
- Levy, J.; Bres, C.; Geurts, R.; Chalhoub, B.; Kulikova, O.; Duc, G.; Journet, E.P.; Ane, J.M.; Lauber, E.; Bisseling, T.; Denarie, J.; Rosenberg, C. y Debelle, F.** 2004. A putative Ca²⁺ and calmodulin-dependent protein kinase required for bacterial and fungal symbioses. *Science* 303: 1361-1364.
- Lewis-Henderson, W.R. y Djordjevic, M.A.** 1991. A cultivar-specific interaction between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and subterranean clover is controlled by *nodM*, other bacterial cultivar specificity genes, and a single recessive host gene. *J. Bacteriol.* 173: 2791-2799.
- Lhuissier, F.G.P.; De Ruijter, N.C.A.; Sieberer, B.J.; Esseling, J.J. y Emons, A.M.C.** 2001. Time course of cell biological events evoked in legume root hairs by *Rhizobium* Nod factors: state of the art. *Ann. Bot.* 87: 289-302.
- Limpens, E. y Bisseling, T.** 2003. Signaling in symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* 6:343-50.
- Lodwig, E.M.; Hosie, A.H.F.; Bourdes, A.; Findlay K.; Allaway, D.; Karunakaran, R.; Downie, J.A. y Poole, P.S.** 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* 422: 722-726.
- Mantsala, P. y Zalkin.** 1992. Cloning and sequence of *Bacillus subtilis purA* and *guaA*, involved in the conversion of IMP to AMP and GMP. *J. Bacteriol.* 174: 1883-1890.
- Margolis, N., Hogan, D., Tilly, K. y Rosa, P.A.** 1994. Plasmid location of *Borrelia* purine biosynthesis gene homologs. *J. Bacteriol.* 176: 6427-6432.
- Marie, C.; Barny, M.A. y Downie, J.A.** 1992. *Rhizobium leguminosarum* has two glucosamine synthases, GlmS and NodM, required for nodulation and development of nitrogen-fixing nodules. *Mol. Microbiol.* 6:843-51.
- Marroqui, S.; Zorreguieta, A.; Santamaria, C.; Temprano, F.; Soberon, M.; Megias, M. y Downie, J.A.** 2001. Enhanced symbiotic performance by *Rhizobium tropici* glycogen synthase mutants. *J. Bacteriol.* 183: 854-864.
- Marsh, J.L.; Erfle, M. y Wykes, E.J.** 1984. The pIC plasmid and phage vectors with versatile cloning sites for recombinant selection by insertional inactivation. *Gene* 32: 481-485.
- Martínez-Romero, E.; Segovia, L.; Mercante, F.M.; Franco, A.A.; Graham, P. y Pardo, M.A.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41: 417-426.
- Martínez-Romero, E.** 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant and Soil* 252: 11-23.
- Meade, H.; Long, S.; Ruvkun, G.; Brown, S. y Ausubel, F.** 1982. Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J. Bacteriol.* 149:114-122.
- Mehra, R.K. y Drabble, W.T.** 1981. Dual control of the *gua* operon of *Escherichia coli* K12 by adenine and guanine nucleotides. *J. Gen. Microbiol.* 123: 27-37.
- Meng, L.M. y Nygaard, P.** 1990. Identification of hypoxanthine and guanine as the co-repressors for the purine regulon genes of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 4: 2187-2192.
- Meng, L.M.; Kilstrup, M. y Nygaard, P.** 1990. Autoregulation of PurR repressor synthesis and involvement of *purR* in the regulation of *purB*, *purC*, *purL*, *purMN* and *guaBA* expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 187: 373-379.
- Michiels, J.; Verreth, C. y Vanderleyden, J.** 1994. Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1206-1212.

- Miller, J.** 1972. Experiments in gene fusions. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Minton, N. P.** 1984. Improved plasmid vectors for the isolation of translational *lacZ* fusions. *Gene* 31:269-273.
- Missiakas, D. y Raina, S.** 1997. Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of *E. coli*: role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB. *EMBO J.* 16: 1670-1685.
- Mitra, R.M. y Long, S.R.** 2004. Plant and bacterial symbiotic mutants define three transcriptionally distinct stages in the development of the *Medicago truncatula/Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *Plant Physiol.* 134:595-604.
- Miyamoto, T.; Matsuno, K.; Imamura, M.; Kim, S.; Honjoh, K. y Hatano, S.** 1998. Purification and some properties of IMP dehydrogenase of *Bacillus cereus*. *Microbiol. Res.* 153: 23-27.
- Model, P.; Jovanovic, G. y Dworkin, J.** 1997. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Mol. Microbiol.* 24:255-261.
- Morett, E. y Buck, M.** 1989. *In vivo* studies on the interaction of RNA polymerase-sigma 54 with the *Klebsiella pneumoniae* and *Rhizobium meliloti nifH* promoters. The role of NifA in the formation of an open promoter complex. *J. Mol. Biol.* 210: 65-77.
- Morimoto, T., Loh, P.C., Hirai, T., Asai, K., Kobayashi, K., Moriya, S. y Ogasawara, N.** 2002. Six GTP-binding proteins of the Era/Obg family are essential for cell growth in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 148: 3539-3552.
- Morita, M.; Kanemori, M.; Yanagi, H. y Yura, T.** 1999. Heat-induced synthesis of sigma32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of *rpoH* mRNA secondary structure. *J. Bacteriol.* 181: 401-410.
- Moulin, L.; Munive, A.; Dreyfus, B.; y Boivin-Masson, C.** 2001. Nodulation of legumes by members of the β -subclass of Proteobacteria. *Nature* 411: 948-950.
- Mouritzen, P. y Rosendahl, L.** 1997. Identification of a transport mechanism for nh_4^+ in the symbiosome membrane of pea root nodules. *Plant Physiol.* 115: 519-526.
- Mueller, H.J. y Hinton, J.** 1941. A protein-free medium for primary isolation of the Gonococcus and Meningococcus. *Proc. Soc. Expt. Biol. Med.*, 48: 330-333.
- Muller, P.; Hynes, M.; Kapp, D.; Niehaus, K. y Piehler, A.** 1988. Two classes of *Rhizobium meliloti* infection mutants differ in exopolysaccharide production and in coinoculation properties with nodulation mutants. *Gen. Genet.* 211: 17-26.
- Munchbach, M., Nocker, A. y Narberhaus, F.** 1999. Multiple small heat shock proteins in rhizobia. *J Bacteriol.* 181: 83-90.
- Myrold, D.D.** 1994. Frankia and the actinorhizal symbiosis. En: *Methods of Soil Analysis: Part 2. Microbiological and Biochemical properties.* Weaver, R.W.; Angle, J.S. y Bottomley, P.J. Eds. Soil Sci. Soc. Am., Madison, USA. p. 291-328.
- Nakahigashi, K.; Yanagi, H. y Yura, T.** 1998. Regulatory conservation and divergence of sigma32 homologs from gram-negative bacteria: *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 180: 2402-2408.
- Nakahigashi, K.; Yanagi, H. y Yura, T.** 2001. DnaK chaperone-mediated control of activity of a sigma (32) homolog (RpoH) plays a major role in the heat shock response of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 183: 5302-5310.
- Nap, J.P. y Bisseling, T.** 1990. Development biology of a plant-prokaryotic symbiosis: the legume root nodule. *Science* 250: 948-954.
- Narberhaus, F.; Weighofer, W.; Fischer, H.M. y Hennecke, H.** 1996. The *Bradyrhizobium japonicum rpoH1* gene encoding a sigma 32-like protein is part of a unique heat shock gene cluster together with *groESL1* and three small heat shock genes. *J. Bacteriol.* 178: 5337-5346.

- Narberhaus, F.; Krummenacher, P.; Fischer, H.M. y Hennecke, H.** 1997. Three disparately regulated genes for sigma 32-like transcription factors in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* 24: 93-104.
- Narberhaus F.** 1999. Negative regulation of bacterial heat shock genes. *Mol. Microbiol.* 31: 1-8.
- Natera, S.H.; Guerreiro, N. y Djordjevic, M.A.** 2000. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9: 995-1009.
- NCCLS.** National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Eleventh Informational Supplement. NCCLS Document M100-S11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa. 2001.
- Neidhardt, F.C. y VanBogelen, R. A.** 1987. Heat shock response. En *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C.; Ingraham, J.L.; Low, K.B.; Magasanik, B.; Schaechter, M. y Umberger, H.E. Eds. Am. Soc. For Microbiol., Washington. p. 1334-1345.
- Newman, J.D.; Schultz, B.W. y Noel, K.D.** 1992. Dissection of nodule development by supplementation of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* purine auxotrophs with 4-aminoimidazole-5-carboxamide riboside. *Pant Physiology.* 99: 401-408.
- Newman, J.D.; Diebold, R.J.; Schultz, B.W. y Noel, K.D.** 1994. Infection of soybean and pea nodules by *Rhizobium* spp. purine auxotrophs in the presence of 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside. *J. Bacteriol.* 176: 3286-3294.
- Newman, J.D.; Rosovitz, M.J. y Noel, K.D.** 1995. Requirement for rhizobial production of 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AICAR) for infection of bean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 407-414.
- Nicholas, K.B.; Nicholas Jr., H.B. y Deerfield II, D.W.** 1997. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW. News* 4: 14.
- Niner, B.M. y Hirsh, A.M.** 1998. How many *Rhizobium* genes, in addition to *nod*, *nif/fix*, and *exo*, are needed for nodule development and function? *Symbiosis* 24: 51-102.
- Noel, K.D.; Diebold, R.J.; Cava, J.R. y Brink, B.A.** 1988. Rhizobial purine and pyrimidine auxotrophs: nutrient supplementation, genetic analysis, and the symbiotic requirement for the novo purine biosynthesis. *Archives of Microbiology* 149: 499-506.
- Noonan, B.; Motherway, M. y O'Gara, F.** 1992. Ammonia regulation of the *Rhizobium meliloti* nitrogenase structural and regulatory genes under free-living conditions: involvement of the *fixL* gene product? *Mol. Gen. Genet.* 234: 423-428.
- Noriega, F.R.; Losonsky, G.; Lauderbaugh, C.; Liao, F.M.; Wang, J.Y. y Levine, M.M.** 1996. Engineered deltaguaB-A deltavirG *Shigella flexneri* 2a strain CVD 1205: construction, safety, immunogenicity, and potential efficacy as a mucosal vaccine. *Infect Immun.* 64: 3055-3061.
- Ogawa, J. y Long, S.R.** 1995. The *Rhizobium meliloti* *groELc* locus is required for regulation of early nod genes by the transcription activator NodD. *Genes Dev.* 9: 714-29.
- Oke, V. y Long, S.R.** 1999^a. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opinion in Microbiology* 2: 641-646.
- Oke, V. y Long, S.R.** 1999^b. Bacterial genes induced within the nodule during the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol Microbiol* 32: 837-849.
- Oke, V.; Rushing, B.G.; Fisher, E.J.; Moghadam-Tabrizi, M. y Long, S.R.** 2001. Identification of the heat-shock sigma factor RpoH and a second RpoH-like protein in *Sinorhizobium meliloti*. *Microbiology.* 147: 2399-2408.
- Ono, Y.; Mitsui, H.; Sato, T. y Minamisawa, K.** 2001. Two RpoH homologs responsible for the expression of heat shock protein genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Gen Genet.* 264: 902-912.

- Ora Son, Hyo-Sook Yang, Hyun-Jung Lee, Mi-Young Lee, Ki-Hye Shin, Sook-Lye Jeon, Myung-Sok Lee, Soon-Young Choi, Jong-Yoon Chun, Hobang Kim, Chung-Sun An, Soon-Kwan Hong, Nam-Soo Kim, Sang-Kyun Koh, Moo Je Cho, Sunghan Kim, Desh Pal S. Verma, Choong-Il Cheon.** 2003. Expression of *srab7* and *SCaM* genes required for endocytosis of *Rhizobium* in root nodules. *Plant Science* 165: 1239–1244
- Pain, A.** 1978. Symbiotic properties of antibiotic resistant and auxotrophic mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *J. of Appl. Bacteriol.* 47: 53-64.
- Parniske, M.; Schmidt, P.E.; Kosch, K. y Müller, P.** 1994. Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 7:631-638.
- Patriarca, E. J.; Tatè, R.; Fedorova, E.; Riccio, A.; Defez, R. y Iaccarino, M.** 1996. Downregulation of the *Rhizobium ntr* system in the determinate nodule of *Phaseolus vulgaris* identifies a specific developmental zone. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 9:243-251.
- Patriarca, E.J.; Tate, R. y Iaccarino, M.** 2002. Key role of bacterial NH_4^+ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Mol. Biol Rev.* 66: 203-222.
- Pellock, B.J.; Cheng, H.P. y Walker, G.C.** 2000. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J. Bacteriol.* 182: 4310-4318.
- Peoples, M.B.; Herridge, D.F. y Lodha, J.K.** 1995. Biological nitrogen fixation: An efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant and Soil* 174: 3-28.
- Perret, X.; Staehelin, C. y Broughton, W.J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity microbiol. *Mol. Biol. Rev.* 64: 180-201.
- Pfennig, P.L. y Flower, A.M.** 2001. BipA is required for growth of *Escherichia coli* K12 at low temperature. *Mol. Genet. Genomics.* 266: 313-317.
- Piha, M.I. y Munnus, D. N.** 1987. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil.* 98: 183-194.
- Polhill, R.M. y Raven, P.H.** 1981. *Advances in Legume Systematics.* Royal Botanic Gardens, Kew. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Great Britain.
- Poole, P. y Allaway, D.** 2000. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv. Microb. Physiol.* 43: 117-163.
- Pooyan, S.; George, M. y Borthakur, D.** 1994. Isolation and characterization of a gene for nodule development linked to *ndvA* and *ndvB* genes in *Rhizobium* sp. strain TAL1145. *Symbiosis.* 17: 201-215.
- Postgate, J.** 1998. *Nitrogen Fixation.* Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Poupot, R.; Martinez-Romero, E. y Prome, J.C.** 1993. Nodulation factors from *Rhizobium tropici* are sulfated or nonsulfated chitopentasaccharides containing an N-methyl-N-acylglucosamine terminus. *Biochemistry* 32: 10430-10435.
- Preisig, O.; Anthamatten, D. y Hennecke, H.** 1993. Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3309–3313.
- Priefer, U. B.; Simon, R. y Pühler, A.** 1985. Extension of the host range of *Escherichia coli* vectors by incorporation of RSF1010 replication functions. *J. Bacteriol.* 163:324–330.
- Pueppke, S.G. y Broughton, W.J.** 1999. *Rhizobium* sp. strain NGR234 and *R. fredii* USDA257 share exceptionally broad, nested host ranges. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 293–318.
- Pühler, A.; Arlat, M.; Becker, A.; Göttfert, M.; Morrissette, J.P. y O’Gara, F.** 2004. What can bacterial genome research teach us about bacteria-plant interactions? *Current Opinion in Plant Biology.* 7: 137–147.
- Radutoiu, S.; Madsen, L.H.; Madsen, E.B.; Felle, H.H.; Umehara, Y.; Gronlund, M.; Sato, S.; Nakamura, Y.; Tabata, S.; Sandal, N. y Stougaard, J.** 2003. *Plant*

- recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*. 425: 585-592.
- Ramirez-Romero, M.A.; Bustos, P.; Girard, L.; Rodriguez, O.; Cevallos, M.A. y Davila, G.** 1997. Sequence, localization and characteristics of the replicator region of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli*. *Microbiology* 143: 2825-2831.
- Rasmussen, B.A. y Bush, K.** 1997. Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 41: 223-232.
- Rees, D.C. y Howard, J.B.** 2000. Nitrogenase: standing at the crossroads. *Curr. Opin. in Chemical Biol.* 4: 559-566.
- Reeve, W.G.; Tiwari, R.P.; Wong, C.M.; Dilworth, M.J. y Glenn, A.R.** 1998. The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology* 144:3335-42.
- Ribbe, M.W. y Burgess, B.K.** 2001. The chaperone GroEL is required for the final assembly of the molybdenum-iron protein of nitrogenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 98: 5521-5525.
- Riccillo, P.M.; Collavino, M.M.; Grasso, D.H.; England, R.; de Bruijn, F.J. y Aguilar, O.M.** 2000. A *guaB* mutant strain of *Rhizobium tropici* CIAT899 pleiotropically defective in thermal tolerance and symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13: 1228-1236.
- Riccillo, P.M.** 2001. Identificación de factores genéticos y bioquímicos de *Rhizobium tropici* CIAT 899 involucrados en la tolerancia a estreses ambientales. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.
- Richmond, C.S., Glasner, J.D., Mau, R., Jin, H. y Blattner, F.R.** 1999. Genome-wide expression profiling in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 27: 3821-3835.
- Riely, B.K.; Ane, J.M.; Penmetza, R.V. y Cook, D.R.** 2004. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signaling to center stage. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7: 408-413.
- Rosenblueth, M.; Hynes, M.E. y Martinez-Romero, E.** 1998. *Rhizobium tropici* *teu* genes involved in specific uptake of *Phaseolus vulgaris* bean-exudate compounds. *Mol. Gen. Genet.* 258: 587-598.
- Rosenblueth, M. y Martinez-Romero, E.** 2004. *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization *Arch Microbiol* 181: 337-344.
- Rusanganwa, E, y Gupta, R.S.** 1993. Cloning and characterization of multiple *groEL* chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti*. *Gene*. 126: 67-75.
- Rushing, B. G. y Long, S. R.** 1995. Cloning and characterization of the *sigA* gene encoding the major sigma subunit of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 177: 6952-6957.
- Ruvkun, G. B.; Sundaresan, V. y Ausubel, F.** 1982. Directed transposon Tn5 mutagenesis and complementation analysis of *Rhizobium meliloti* symbiotic nitrogen fixation genes. *Cell* 29: 551-559.
- Sadowsky, M. J. y Graham, P.** 1998. Soil Biology of the *Rhizobiaceae*. En: *The Rhizobiaceae*. Spaink, H.P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 155-172.
- Sagpya.** Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Republica Argentina. <http://www.sagpya.mecon.gov.ar>.
- Sanschagrin, F.; Dufresne, J. y Levesque, R.C.** 1998. Molecular heterogeneity of the L-1 metallo-beta-lactamase family from *Stenotrophomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother.* 42: 1245-1248.
- Saxild, H.H. y Nygaard, P.** 1988. Gene-enzyme relationships of the purine biosynthetic pathway in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 211: 160-167.
- Saxild, H.H. y Nygaard, P.** 1991. Regulation of levels of purine biosynthetic enzymes in *Bacillus subtilis*: effects of changing purine nucleotide pools. *J. Gen. Microbiol.* 137: 2387-2394.

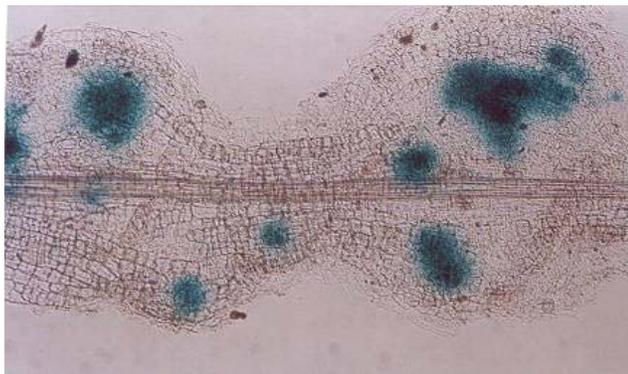
- Saxild, H.H.; Brunstedt, K.; Nielsen, K.I.; Jarmer, H. y Nygaard, P.** 2001. Definition of the *Bacillus subtilis* PurR operator using genetic and bioinformatic tools and expansion of the PurR regulon with *glyA*, *guaC*, *pbuG*, *xpt-pbuX*, *yqhZ-foID*, and *pbuO*. *J. Bacteriol.* 183: 6175-6183.
- Schäfer, A.; Tauch, A.; Jäger, W.; Kalinowski, J.; Thierbach, G. y Pühler, A.** 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145:69-73.
- Schafer, M.P.; Hannon, W.H. y Levin, A.P.** 1974. *In vivo* and *in vitro* complementation between *guaB* and *in vivo* complementation between *guaA* auxotrophs of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 117: 1270-1279.
- Schauser, L.; Roussis, A.; Stiller, J. y Stougaard, J.** 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature.* 402: 191-195.
- Schlaman, H.R.; Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.** 1992. Regulation of nodulation gene expression by NodD in rhizobia. *J. Bacteriol.* 174:5177-5182.
- Schlaman, H.R.; Phillips, D.A. y Kondorosi, É.** 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. En: *The Rhizobiaceae*. Spalink, H.P.; Kondorosi, A. y Hooykaas, P.J.J. Eds. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. p. 361-386.
- Schubert, K. R.** 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis transport and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37: 539-574.
- Schultz, A.C.; Nygaard, P. y Saxild, H.H.** 2001. Functional analysis of 14 genes that constitute the purine catabolic pathway in *Bacillus subtilis* and evidence for a novel regulon controlled by the *puCR* transcription activator. *J. Bacteriol.* 183: 3293-3302.
- Schultze, M. y Kondorosi, A.** 1998. Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual Review of Genetics* 32: 33-57.
- Schumacher, M.A.; Choi, K.Y.; Zalkin, H. y Brennan, R.G.** 1994. Crystal structure of LacI member, PurR, bound to DNA: minor groove binding by alpha helices. *Science.* 266: 763-770.
- Segal, G. y Ron, E.Z.** 1998. Regulation of heat-shock response in bacteria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 851: 147-151.
- Segovia, L.; Young, J.P. y Martinez-Romero, E.** 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 374-377.
- Senecoff, J.F. y Meagher, R.B.** 1993. Isolating the *Arabidopsis thaliana* genes for *de novo* purine biosynthesis by suppression of *Escherichia coli* mutants. *Plant Physiol.* 102: 387-399.
- Senecoff, J.F.; McKinney, E.C. y Meagher, R.B.** 1996. *De novo* purine synthesis in *Arabidopsis thaliana*: II. The *pur7* gene encoding 5' phosphoribosyl-4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues. *Plant Physiol.* 112: 905-917.
- Sharma, S.B. y Signer, E.R.** 1990. Temporal and spatial regulation of the symbiotic genes of *Rhizobium meliloti* in planta revealed by Tn5-*gus*. *Gene Dev.* 4:344-356.
- Simon, R.; Priefer, U. y Pühler A.** 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio/Technology* 1:784-791.
- Simon, R.; O'Connell, M.; Labes, M. y Puhler, A.** 1986. Plasmid vectors for the genetic analysis and manipulation of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Methods Enzymol.* 118: 640-59.
- Simon, R.; Quandt, J. y Klipp, W.** 1989. New derivatives for transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram negative bacteria. *Gene* 80:161-169.
- Smit, G.; Logman, T.J.J.; Boerrigter, E.T.I.; Kijne, J.W. y Lugtenberg, B.J.J.** 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum*

- biovar *vicae* Ca²⁺-dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family *Rhizobiaceae* to plant root hair tips. *J. Bacteriol.* 171: 4054-4062.]
- Smith, P.K.; Krohn, R.I.; Hermanson, G.T.; Mallia, A.K.; Gartner, F.H.; Provenzano, M.D.; Fujimoto, E.K.; Goeke, N.M.; Olson, B.J. y Klenk, D.C.** 1987. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 163:279.
- Smith, P.M.C, Mann, A.J.; Goggin, D.E. y Atkins, C.A.** 1998. AIR synthetase in cowpea nodules: a single gene product targeted to two organelles? *Plant. Mol. Biol.* 36: 811-820.
- Smith, P.M.C.; Winter, H.; Storer, P.J.; Bussell, J.D.; Schuller, K.A. y Atkins, C.A.** 2002. Effect of Short-Term N₂ Deficiency on Expression of the Ureide Pathway in Cowpea Root Nodules. *Plant Physiol.* 129: 1216-1221.
- Smith, P.M.C y Atkins, C.A.** 2002. Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiol.* 128: 793-802.
- Soberón, M.; Lopez, O.; Miranda, J.; Tabche, M.L. y Morera, C.** 1997. Genetic evidence for 5- aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide (AIRCAR) as a negative of cytochromo terminal oxidase *cbb₃* production in *Rhizobium etli*. *Mol. Gen. Genet.* **254**: 665-673.
- Soberon, M.; Morera, C.; Kondorosi, A.; Lopez, O. y Miranda, J.** 2001. A purine-related metabolite negatively regulates *fixNOQP* expression in *Sinorhizobium meliloti* by modulation of *fixK* expression. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 572-576.
- Soltis, D.E.; Soltis, P.S.; Morgan, D.R.; Swensen, S.M.; Mullin, B.C.; Dowd, J.M. y Martin, P.G.** 1995. Chloroplast gene sequence data suggest a single origin of the predisposition for symbiotic fixation in angiosperms, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92: 2647-2651.
- Soupeñe, E.; Foussard, M.; Boistard, P.; Truchet, G. y Batut, J.** 1995. Oxygen as a key developmental regulator of *Rhizobium meliloti* N₂ fixation gene expression within the alfalfa root nodule. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3759-3763.
- Spaink, H.P.; Wijffelman, C.A.; Pees, E.; Okker, R.J.H. y Lugtenberg, B.J.J.** 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* 328: 337-340.
- Spaink H.P. y Lugtenberg, B.J.** 1994. Role of the lipo-chitin oligosaccharide signal molecules in root nodule organogenesis. *Plant. Mol. Biol.* 26: 1413-1422.
- Spaink, H.P.** 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 54:257-88.
- Sprent, J.I. y Sprent. P.** 1990. Nitrogen fixing organisms: Pure and applied aspects. Chapman and Hall, London, UK.
- Sprent, J.I.** 1992. Evolution of nitrogen fixing symbioses. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Stacey, G.; Burriss, R.H. y Evan, H.J. Eds. Chapman y Hall. New York, London, p. 461-496.
- Steenhoudt, O. y Vanderleyden, J.** 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.* 24: 487-506.
- Stoltzfus, J.R.; So, R.; Malarvithi, P.P.; Ladha, J.K. y de Bruijn, F.** 1997. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biological nitrogen fixation. *Plant and Soil.* 197: 25-36.
- Stougaard J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol.* 124: 531-540.
- Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K. y Parniske.** 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* 417: 959-62.
- Streeter, J.** 1988. Inhibition of legume formation and N₂ fixation by nitrate. *Crit. Rev. Plant Sci.* 7:1-23.

- Summers, M.L.; Elkins, J.G.; Elliot, B.A. y McDermott, T.R.** 1998. Expression and regulation of phosphate stress inducible genes in *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1094-1101.
- Sutton, W.D.; Pankhurst, C.E. y Craig, A.S.** 1981. The *Rhizobium* bacteroid state. En: *The biology of Rhizobiaceae*. Giles, K.L. y Atherly, A.G. Eds. New York. p. 149-177.
- Swamynathan, S.K. y Singh, A.** 1992. *R. meliloti* purine auxotrophs are Nod⁺ but defective in nitrogen fixation. *J. Genet.* 71: 11-21.
- Taté, R.; Patriarca, E. J.; Riccio, A.; Defez, R. y Iaccarino, M.** 1994. Development of *Phaseolus vulgaris* root nodules. *Mol. Plant-Microbe-Interact.* 7:582-589.
- Tate, R.; Riccio, A.; Caputo, E.; Cermola, M.; Favre, R. y Patriarca, E.J.** 1999^a. The *Rhizobium etli trpB* gene is essential for an effective symbiotic interaction with *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12: 926-933.
- Tate, R.; Riccio, A.; Caputo, E.; Iaccarino, M. y Patriarca, E.J.** 1999^b. The *Rhizobium etli metZ* gene is essential for methionine biosynthesis and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:24-34.
- Taté, R.; Cermola, M.; Riccio, A.; Iaccarino, M.; Merrick, M.; Favre, R. y Patriarca, E.J.** 1999^c. Ectopic expression of the *Rhizobium etli amtB* gene affects the symbiosome differentiation process and nodule development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12:515-525.
- Tesfa-Selase, F. y Drabble, W.T.** 1992. Regulation of the *gua* operon of *Escherichia coli* by the DnaA protein. *Mol. Gen. Genet.* 231, 256-264.
- Thomas, M.R.** 1994. Simple, effective cleanup of DNA ligation reactions prior to electro-transformation of *E. coli*. *BioTechniques* 16:988-990.
- Thomas, M.S. y Drabble, W.T.** 1985. Nucleotide sequence and organization of the *gua* promoter region of *Escherichia coli*. *Gene* 36: 45-53.
- Tiedeman, A.A. y Smith, J.M.** 1985. Nucleotide sequence of the *guaB* locus encoding IMP dehydrogenase of *Escherichia coli* K12. *Nucleic Acids Res.* 13: 1303-1316.
- Tomoyasu, T.; Ogura, T.; Tatsuta, T. y Bukau, B.** 1998. Levels of DnaK and DnaJ provide tight control of heat shock gene expression and protein repair in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 30: 567-581.
- Towbin, H.; Staehelin, T. y Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of protein from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 4350-4354.
- Trouchet, G.; Roche, P.; Lerouge, P.; Vasse, J.; Camut, S.; de Billy, F.; Promb, J. y Dbnarib, J.** 1991. Sulfated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* 351: 670-673.
- Tung, W.L. y Chow, K.C.** 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet.* 11: 128-129.
- Turner, G.L. y Gibson, A.H.** 1980. En: *Biological Nitrogen Fixation*. Bergersen, F.J. Eds. *Methods for Evaluating*, Wiley, London, UK.
- Tyerman, S.D.; Whitehead, L.F. y Day, D.A.** 1995. A channel-like transporter for NH₄⁺ on the symbiotic interface of N₂-fixing plants. *Nature* 378: 629-632.
- Tyler, B.** 1978. Regulation of the assimilation of nitrogen compounds. *Annu. Rev. Biochem.* 47: 1127-1162.
- Udvardi, M.K. y Day, D.** 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 493-523.
- van Rhijn, P.J.; Feys, B.; Verreth, C. y Vanderleyden, J.** 1993. Multiple copies of *nodD* in *Rhizobium tropici* CIAT899 and BR816. *J. Bacteriol.* 175: 438-447.
- van Rhijn, P. and J. Vanderleyden.** 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* 59: 124-142.
- van Rhijn, P.; Goldberg, R.B. y Hirsch, A.M.** 1998. Lotus corniculatus nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell.* 10: 1233-1250.

- van Spronsen, P.C.; Gronlund, M.; Pacios Bras, C.; Spaink, H.P. y Kijne, J.W.** 2001. Cell biological changes of outer cortical root cells in early determinate nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 839-847.
- van Spronsen, P.C.; Tak, T.; Rood, A.M.M.; van Brussel, A.A.N.; Kijne, J.W. y Boot, K.J.M.** 2003. Salicylic acid inhibits indeterminate-type nodulation but not determinate-type nodulation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 83-91.
- van Workum, W.A.T.; van Slageren, S.; van Brussel, A.A.N. y Kijne, J.W.** 1998. Role of exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciaeviciae* as host plant-specific molecules required for infection thread formation during nodulation of *Vicia sativa*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11: 1233-1241.
- Vandamme, P.; Goris, J.; Chen, W. M, de Vos, P. y Willems, A.** 2002. *Burkholderia tuberum* sp. nov. and *Burkholderia phymatum* sp. nov.; nodulate the roots of tropical legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 25: 507-512.
- VandenBosch, K. A.; Noel, K. D.; Kaneko, Y. y Newcomb, E. H.** 1985. Nodule initiation elicited by noninfective mutants of *Rhizobium phaseoli*. *J. Bacteriol.* 162: 950-959.
- Vasse, J.; de Billy, F.; Camut, S. y Truchet, G.** 1990. Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *J. Bacteriol.* 172: 4295-4306.
- Verma, D.P. y Hong, Z.** 1996. Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends Microbiol.* 4: 364-368.
- Vieira, J. y Messing, J.** 1982. The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* 19: 259-268.
- Vincent, J.** 1970. A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. Burgess and Son, Oxford, Great Britain.
- Vitousek, P.M.; Aber, J.D.; Howarth, R.W.; Likens, G.E.; Matson, P.A.; Schindler, D.W.; Schlesinger, W.H. y Tilman, G.D.** 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: causes and consequences. Science Office. Issues in Ecology. Issue 1.
- Waelkens, F.; Voets, T.; Vlassak, K.; Vanderleyden, J. y van Rhijn, P.** 1995. The *nodS* gene of *Rhizobium tropici* strain CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena leucocephala*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 8: 147-154.
- Wais, R.J.; Wells, D.H. y Long, S.R.** 2002. Analysis of differences between *Sinorhizobium meliloti* 1021 and 2011 strains using the host calcium spiking response. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 1245-1252.
- Waters, J.K.; Hughes, B.L.; Purcell, L.C.; Gerhardt, K.O.; Mawhinney, T.P. y Emerich, D.W.** 1998. Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 12038-12042.
- Weidner, S.; Pühler, A. y Küster, H.** 2003. Genomics insights into symbiotic nitrogen fixation. *Current Opinion in Biotechnology.* 14: 200-205.
- Wheatcroft, R.; McRae, D.G. y Miller, R.W.** 1990. Changes in the *Rhizobium meliloti* genome and the ability to detect supercoiled plasmids during bacteroid development. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 9-17.
- Wilson, K. J.; Sessitsch, A.; Corbo, J. C.; Giller, K. E.; Akkermans, A. D. L. y Jefferson, R. A.** 1995. β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* 141:1691-1705.
- Wood, D.W.; Setubal, J.C.; Kaul, R.; Monks, D.; Chen, L.; Wood, G.E.; Chen, Y.; Woo, L.; Kitajima, J.P.; Okura, V.K.; Almeida Jr., N.F.; Zhou, Y.; Bovee Sr., D.; Chapman, P.; Clendenning, J.; Deatherage, G.; Gillet, W.; Grant, C.; Guenther, D.; Kuttyavin, T.; Levy, R.; Li, M.; McClelland, E.; Palmieri, A.; Raymond, C.; Rouse, G.; Saenphimmachak, C.; Wu, Z.; Gordon, D.; Eisen, J.A.; Paulsen, I.; Karp, P.; Romero, P.; Zhang, S.; Yoo, H.; Tao, Y.; Biddle, P.;**

- Jung, M.; Krespan, W.; Perry, M.; Gordon-Kamm, B.; Liao, L.; Kim, S.; Hendrick, C.; Zhao, Z.; Dolan, M.; Tingey, S.V.; Tomb, J.; Gordon, M.P.; Olson, M.V. y Nester, E.W.** 2001. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2323.
- Worland, S.; Guerreiro, N.; Yip, L.; Djordjevic, M.A.; Djordjevic, S.P.; Weinman, J.J. y Rolfe, B.G.** 1999. *Rhizobium* purine auxotrophs, perturbed in nodulation, have multiple changes in protein synthesis. *Aust. J. Plant Physiol.* 26: 511-519.
- Xi, H.; Schneider, B. L. y Reitzer L.** 2000. Purine catabolism in *Escherichia coli* and function of xanthine dehydrogenase in purine salvage. *J. Bacteriol.* 182: 5332-5341.
- Young, J.M.; Kuykendall, L.D.; Martinez-Romero, E.; Kerr, A. y Sawada, H.** 2001. A revision of *Rhizobium* Frank 1889, with an emended description of the genus, and the inclusion of all species of *Agrobacterium* Conn 1942 and *Allorhizobium undicola* de Lajudie *et al.* 1998 as new combinations: *Rhizobium radiobacter*, *R. rhizogenes*, *R. rubi*, *R. undicola* and *R. vitis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol* 51: 89-103.
- Yura, T. y Nakahigashi, K.** 1999. Regulation of the heat-shock response. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 153-158.
- Yura, T.; Kanemori, M. y Morita, M.T.** 2000. The heat shock response: regulation and function. En: *Bacterial stress responses*. Storz, G. y Hengge-Aronis, R. Eds. American Society for Microbiol. Washington. p. 3-19.
- Zahran, H. H.** 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 968-989.
- Zalkin, H y Dixon, J.E.** 1992. *De novo* purine nucleotide biosynthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 42: 259-287.
- Zalkin, H. y Nygaard, P.** 1996. Biosynthesis of purine nucleotides. En: *Escherichia and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F. C. Eds. American Society for Microbiol. Washington, DC. p. 561-579.
- Zuber, U. y Schumann, W.** 1994. CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 176: 1359-1363.



Actividad Gus en primordios de nódulos de poroto inducidos por la cepa *R. tropici* con la fusión *pr.nodA-guaB-gusA*.