



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Caracterización funcional de la globina VHb de *Vitreoscilla*
en *Rhizobium etli* CFN42 en condiciones de estrés
nitrosativo

Tesis para obtener el título de:
LICENCIADO (A) EN BIOLOGÍA

Presenta:
SUSANA RODRÍGUEZ ROJAS VERTIZ

Director (a) de tesis:
DRA. MARÍA DE LOURDES GIRARD CUESY



Mayo 2016

Este trabajo se realizó en el Centro de Ciencias Genómicas, perteneciente a la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. María de Lourdes Girard Cuesy.

Esta investigación fue realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, Proyecto IN206914 “Implicaciones moleculares del estrés hídrico en la simbiosis *Rhizobium* – frijol”. Beca de licenciatura / realización de tesis.

Agradecemos a M.P.E. Salas y M. Rodríguez por el apoyo técnico brindado.

Agradecimientos

A mis padres y a mi hermano porque siempre me han apoyado y me han dado todo su cariño y amor.

A la Dra. Lourdes Girard (Malu) por el apoyo que he recibido. Por su trabajo en la dirección de esta tesis. Y por el impulso que me das para mejorar cada día.

A las compañeras de laboratorio, Paz Salas, Marisa Rodríguez, Alma Reyes, Patricia Rivera y especialmente a Chouhra Talbi, por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por todo su apoyo, su paciencia y su amistad.

A todos mis amigos de Xicotepec, Puebla, Cuernavaca y Iowa por su gran amistad y apoyo.

A toda mi familia porque han formado parte del logro de este trabajo. Especialmente a la familia Rojas Vertiz Mostalac por todo su apoyo y cariño que he recibido de ustedes siempre.

A los profesores de la Escuela de Biología BUAP por toda la formación académica que obtuve durante la carrera.

A la M. en C. Dalia Molina Romero y Dra. Rocío Pérez y Terrón por la revisión y comentarios de esta tesis.

Índice

Resumen

1. Introducción

1.1 Ciclo de Nitrógeno

1.2 Fijación biológica de nitrógeno

1.3 Fijación simbiótica de nitrógeno

1.4 Mecanismos de protección ante el oxígeno en los nódulos

1.4.1 Barrera de difusión del oxígeno

1.4.2 Leghemoglobina

1.4.3 Oxidasa terminal *cbb₃*

1.5 Desnitrificación

1.6 Estrés abiótico

1.6.1 Estrés oxidativo

1.6.2 Estrés nitrosativo

1.7 Hemoglobina bacteriana

1.7.1 Hemoglobina de *Vitreoscilla*

1.8 Proteína UvrA

1.9 Modelo de estudio: *Rhizobium etli*

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

2.2 Objetivos particulares

3. Hipótesis

4. Diagrama de trabajo

5. Material y métodos

5.1 Cepas bacterianas y plásmidos

5.2 Medios de cultivo

5.3 Antibióticos

5.4 Conservación de cepas bacterianas

5.5 Condiciones de cultivo

5.6 Oligonucleótidos

5.7 Técnicas de biología molecular

5.7.1 Obtención de DNA genómico

5.7.2 Obtención de DNA plasmídico

5.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

5.7.4 Clonación en un vector específico para productos de PCR

5.7.5 Enzimas de restricción de DNA

5.7.6 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

5.7.7 Obtención de fragmentos de DNA en geles de agarosa

5.7.8 Ligación

5.7.9 Transformación bacteriana

5.7.9.1 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5 α

5.7.9.2 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5 α

5.7.10 Conjugación bacteriana

5.7.11 Visualización de plásmidos grandes en geles horizontales

5.7.12 PCR en transcriptasa reversa (RT-PCR)

5.7.12.1 Obtención de RNA

5.7.12.2 Síntesis de cDNA

5.7.12.3 PCR

5.8 Preparación de cultivo de planta

5.8.1 Esterilización de semillas y germinación

5.8.2 Preparación de inóculos bacterianos

5.8.3 Cultivo de planta

5.9 Aplicación de estrés nitrosativo en cultivo de planta

5.10 Contenido de leghemoglobina

6. Resultados

6.1 Obtención de cepas de *Rhizobium etli*

6.2 Análisis de expresión de los genes de *Vitreoscilla vhb* y *uvrA* en *R. etli*

6.3 Efecto de la presencia de la globina Vhb en *R. etli* en la expresión de genes implicados en la respuesta a estrés.

6.4 Efecto de Vhb en la sobrevivencia de *R. etli* en presencia de un generador de óxido nítrico

6.5 Análisis fenotípico de plantas de frijol inoculadas con cepas de *R. etli* que expresan el gen de la *vhb* en condiciones de estrés nitrosativo

6.6 Efecto de la presencia de la globina Vhb en *R. etli* en la expresión de genes implicados al estrés en condiciones simbióticas

6.7 Sensibilidad a rayos UV de las cepas de *R. etli* que expresan el gen *uvrA*

7. Discusión

8. Conclusión general

9. Perspectivas

8. Bibliografía

10. Resultados adicionales. Artículo: Alma Reyes-González, Chouhra Talbi, Susana Rodríguez, Patricia Rivera, David Zamorano-Sánchez, Lourdes Girard. Expanding the regulatory network that controls nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*: elucidating the role of the two-component system hFixL-FxkR. *Microbiology*. **Published Ahead of Print**: 24 March, 2016 doi: [10.1099/mic.0.000284](https://doi.org/10.1099/mic.0.000284) (En prensa).

11. Anexos

11.1 Abreviaturas

11.2 Formulas químicas

11.3 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo

11.4 Oligonucleótidos usados en este trabajo

11.5 Soluciones y medios de cultivo

- 11.4.1 Medios de cultivo
- 11.4.2 Soluciones para purificación de plásmidos por lisis alcalina
- 11.4.3 Buffer de corrida para electroforesis de DNA
- 11.4.4 Soluciones para preparar células competentes de *E. coli* DH5 α
- 11.4.5 Soluciones utilizadas en conjugación bacteriana
- 11.4.6 Soluciones para geles tipo Eckhardt
- 11.4.7 Solución para la purificación de RNA de nódulo
- 11.4.8 Solución para determinación de contenido de Lb
- 11.4.9 Solución nutritiva para el cultivo de plantas

Resumen

La relación simbiótica entre rhizobia y leguminosas puede proveer altas cantidades de nitrógeno a la planta y tiene un alto impacto sobre la agricultura. Las relaciones simbióticas fijadoras de nitrógeno son susceptibles a estreses ambientales, como son radiaciones ultravioleta, especies reactivas de oxígeno (ROS) y especies reactivas de nitrógeno (RNS). La presencia de ROS y RNS que causan estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente, tienen efectos negativos en la fijación simbiótica de nitrógeno a través de la inactivación de la enzima nitrogenasa. Se ha propuesto que las hemoglobinas bacterianas y las reductasas de óxidos de N_2 pueden ayudar a aliviar del estrés nitrosativo. La hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb) es la hemoglobina bacteriana más estudiada, y se ha encontrado que protege ante estrés nitrosativo en *E. coli*. 63 pares de bases río abajo de *vhb* y en la dirección opuesta se encuentra el gen *uvrA* de *Vitreoscilla*. Las proteínas UvrABC reconocen y anclan al DNA dañado y lo reparan. La expresión heteróloga de *vhb-uvrA* de *Vitreoscilla* en bacteroides de *R. etli* CE3 incrementa la actividad de la nitrogenasa. Previamente, hemos demostrado que *R. etli* CFN42 es una bacteria no desnitrificante, que contiene las reductasas de nitrito (NirK) y óxido nítrico (NorC). Estas reductasas tienen un papel detoxificante de óxidos de N_2 , previniendo la acumulación de RNS en el interior de la célula. El objetivo de este trabajo es evaluar la participación de VHb y UvrA de *Vitreoscilla* en la protección de *R. etli* CE3 a estrés nitrosativo y radiación UV tanto en vida libre como en simbiosis. Para este fin, se clonaron los genes como uni-copia en el cromosoma de *R. etli* usando el transposón miniTn7T, y en multi-copia usando un plásmido pTR101. Nuestros resultados indicaron que tanto el gen *vhb* como *uvrA* no confieren una ventaja en proteger a *R. etli* CE3 de estrés nitrosativo y radiación UV. Por consiguiente, concluimos que los genes nativos de *R. etli* que están implicados en la respuesta a estos estreses son suficientes.

1. Introducción

1.1 Ciclo del nitrógeno

El nitrógeno desde el punto de vista cuantitativo es el elemento más abundante en la atmósfera terrestre (80% en volumen) (Baudouin et al, 2007); además, es fundamental para los seres vivos ya que es un componente esencial de los ácidos nucleicos y de las proteínas, incluso de ciertos tipos de carbohidratos y lípidos. Participa en diversas actividades enzimáticas, lo que implica su intervención en la estructura y el metabolismo celular. El ciclo del nitrógeno incluye una serie de reacciones de reducción y oxidación de esta molécula, permitiendo incorporarse a la biósfera por medio de la fijación química o biológica que genera amonio (NH_4) y retorna a la atmósfera por medio de la desnitrificación (Figura 1.1).

No obstante, el nitrógeno es una fuente nutritiva muy escasa, y constituye después del agua el principal limitante de la producción agrícola. Esto se debe a que el nitrógeno atmosférico se encuentra en forma de gas N_2 , que es la forma más pura y abundante. Debido a su triple enlace ($\text{N}\equiv\text{N}$) es muy estable y requiere de un alto consumo de energía para romperse, razón por la cual la mayoría de los seres vivos no lo pueden utilizar directamente.

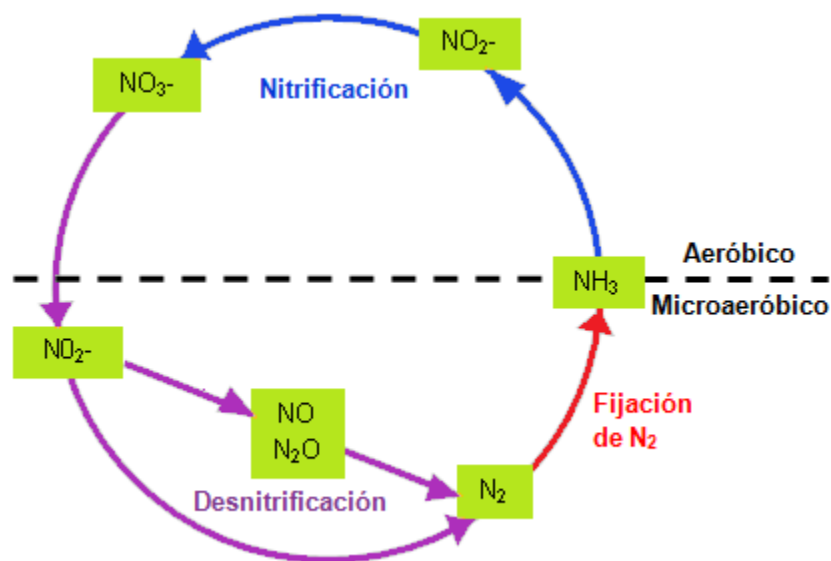


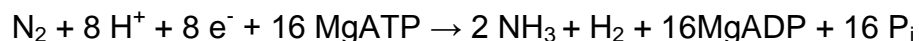
Figura 1.1. Ciclo del N_2

1.2 Fijación biológica de nitrógeno

La fijación de N_2 , en general, se encarga de la reducción del N_2 a NH_4^+ . Este proceso se lleva a cabo por causas naturales como relámpagos y erupciones volcánicas, por el proceso de Haber-Bosch, o por la fijación biológica de N_2 (FBN).

La FBN es mediada por el complejo enzimático denominado nitrogenasa, la cual tiene la capacidad de romper el triple enlace del N_2 . Esta enzima se encuentra en un grupo selecto de bacterias conocidas como diazótrofes, las cuales fijan N_2 , algunas lo hacen en vida libre o a través del establecimiento de una simbiosis con plantas leguminosas. La nitrogenasa consiste de dos componentes, la proteína de hierro (componente II, dinitrogenasa reductasa) y la proteína de hierro-molibdeno (componente I, dinitrogenasa). La nitrogenasa reductasa es codificada por el gen *nifH* y está formada por solo una proteína de hierro (Fe-proteína); mientras que, la dinitrogenasa es codificada por los genes *nifD* y *nifK*, y está formada por dos proteínas una de Hierro (Fe) y otra de Molibdeno (Mo). Dependiendo la disponibilidad en el medio este puede ser sustituido por Vanadio (V) (Dixon y Kahn, 2004; Halbleib y Ludden, 2000) (Fig. 1.2).

La estequiometría de la reacción de fijación de N_2 es la siguiente:



Donde una molécula de H_2 es producido por un mol de N_2 reducido, y dos moléculas de ATP son hidrolizados por cada electrón transferido (Halbleib y Ludden, 2000; Rees y Howard, 2000). El mecanismo enzimático de la nitrogenasa requiere primero de la reducción de la Fe-proteína por donadores de electrones como la ferredoxina o la flavodoxina, después la transferencia de electrones (dependiente de la hidrólisis de MgATP) a la MoFe-proteína, y finalmente la transferencia interna de los electrones en la MoFe-proteína (Fig. 1.2) (Dixon y Kahn, 2004). Una parte importante del poder reductor que se utiliza para fijar N_2 se pierde en forma de H_2 a causa de una reacción colateral e inevitable catalizada por la nitrogenasa, lo que representa una fuente de ineficiencia energética del proceso de fijación biológica. Algunas bacterias poseen un sistema de hidrogenasa capaz de oxidar el H_2 producido, lo que les permite recuperar parte del poder reductor utilizado en su síntesis. De esta manera, se mejora la eficiencia energética del sistema de fijación de N_2 (Layzell y Hunt, 1990).

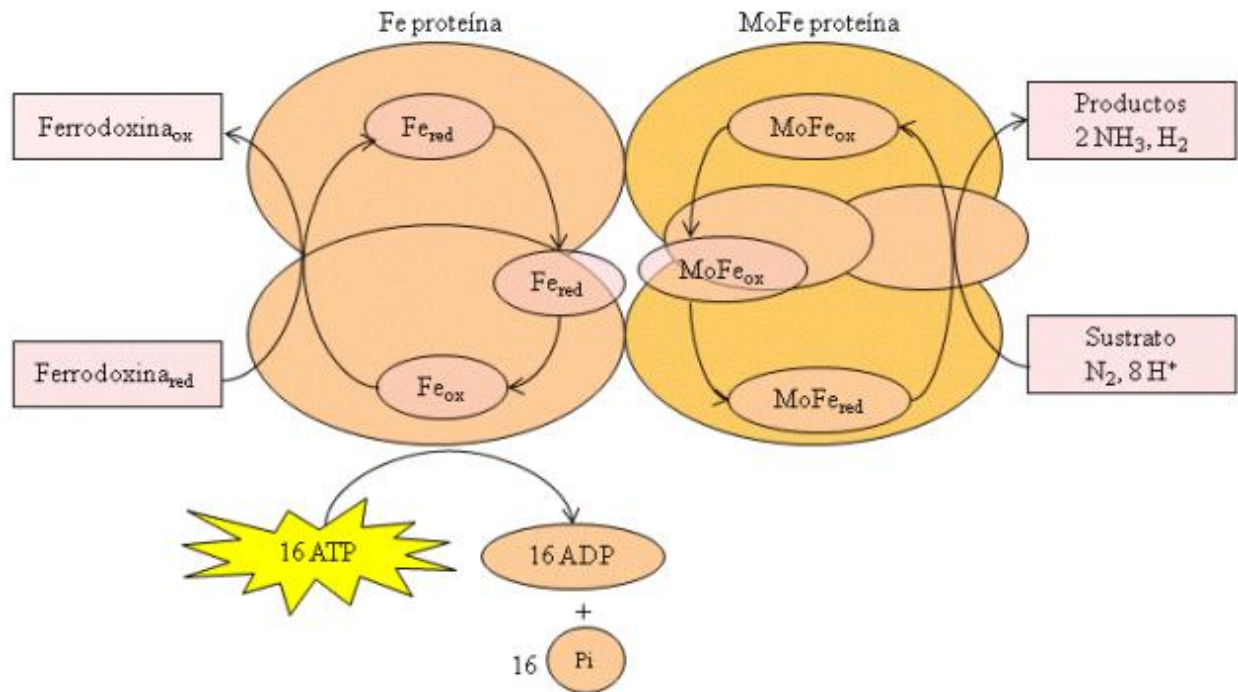


Figura 1.2 Complejo enzimático de la nitrogenasa y reacciones catalizadas (Taiz y Zeiger, 2006).

Como se mencionó anteriormente, la FBN es un proceso que demanda alto gasto de energía. Esta energía se obtiene gracias a la respiración aeróbica, en la que el O₂ es el aceptor final de electrones para la producción de ATP. Sin embargo, los componentes de la nitrogenasa son altamente sensibles al O₂. Por lo que, los diazótrofos han tenido que resolver este conflicto ante la necesidad de mantener la concentración de O₂ a un nivel que no perjudique a la nitrogenasa pero que permita expresar la tasa de respiración para proveer el ATP que se requiere para la actividad enzimática. Los diazótrofos han desarrollado mecanismos para la solución de este dilema. En vida libre, evitan el O₂ a través de la respiración anaeróbica, o por medio de la producción de proteínas que se unen a la nitrogenasa aislando a la enzima espacial y temporalmente, o bien por la formación de heterocistos (Kirchman, 2012). En simbiosis, la fijación de N₂ se lleva a cabo por las bacterias diferenciadas en bacteroides dentro de un órgano especializado llamado nódulo, el cual es formado en las raíces de las plantas leguminosas (revisado en el apartado 1.3). El nódulo provee protección contra el O₂ a través de una barrera de difusión cortical que genera un gradiente longitudinal de oxígeno. La difusión de oxígeno es facilitada por una alta concentración de la nodulina

vegetal leghemoglobina (Lb) en la zona central del nódulo. Mientras que, la respiración bacteroidal se lleva a cabo gracias a la inducción de la oxidasa terminal de alta afinidad *cbb₃* codificada por el operón *fixNOQP* (revisado en el apartado 1.4) (Dixon y Kahn, 2004).

1.3 Fijación simbiótica de nitrógeno

La simbiosis es una de las interacciones biológicas más importantes, ya que los organismos que participan se benefician mutuamente. La interacción simbiótica más estudiada y con mayor profundidad a escala mundial por su importancia agronómica, económica y social, es la que se da por algunas bacterias diazótrofes conocidas como rizobia que son capaces hacer simbiosis fijadora de N₂ con plantas superiores de la familia Leguminosae. Esta asociación mutualista supone una complementación nutricional recíproca, la planta recibe una fuente de N₂ en forma de ureido o amida, mientras que la bacteria dispone de una fuente de carbono y de energía (revisado de Talbi, 2011).

Los rizobia pertenecen a diferentes familias de las subclases alpha- y beta-proteobacteria. En el grupo de beta-proteobacteria podemos encontrar los géneros *Bulkholderia*, *Cupriavidus* y *Herbaspirillum*. Mientras que, dentro del grupo de alpha-proteobacteria se encuentran los géneros *Agrobacterium*, *Allorhizobium*, *Aminobacter*, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer* (anteriormente *Sinorhizobium*), *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Microvirga*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium*, *Rhizobium* y *Shinella* (Rhizobial taxonomy up-to-date).

El establecimiento de una simbiosis efectiva entre ambos simbioses se da por un proceso complejo que implica mecanismos de señalización y reconocimiento, que da lugar a la formación de los nódulos. Los nódulos son estructuras especiales que se encuentran en la raíz de la planta donde resguardan a la bacteria y donde el proceso de fijación de N₂ se lleva a cabo.

La formación del nódulo, inicia con el contacto entre la planta y la bacteria por medio de una comunicación molecular. La planta secreta los compuestos aromáticos de los pelos radicales como son los flavonoides e isoflavonoides. Estos compuestos activan la proteína NodD de la bacteria, que se une a la caja *nod* para inducir la transcripción de

los genes *nodABC* que sintetizan las proteínas para la formación estructural de los factores de nodulación (FN). Los FN se encargan de activar múltiples respuestas en la planta que propician la infección de los rhizobia (Fig. 1.3) (Jones et al 2007; Wang et al, 2012).

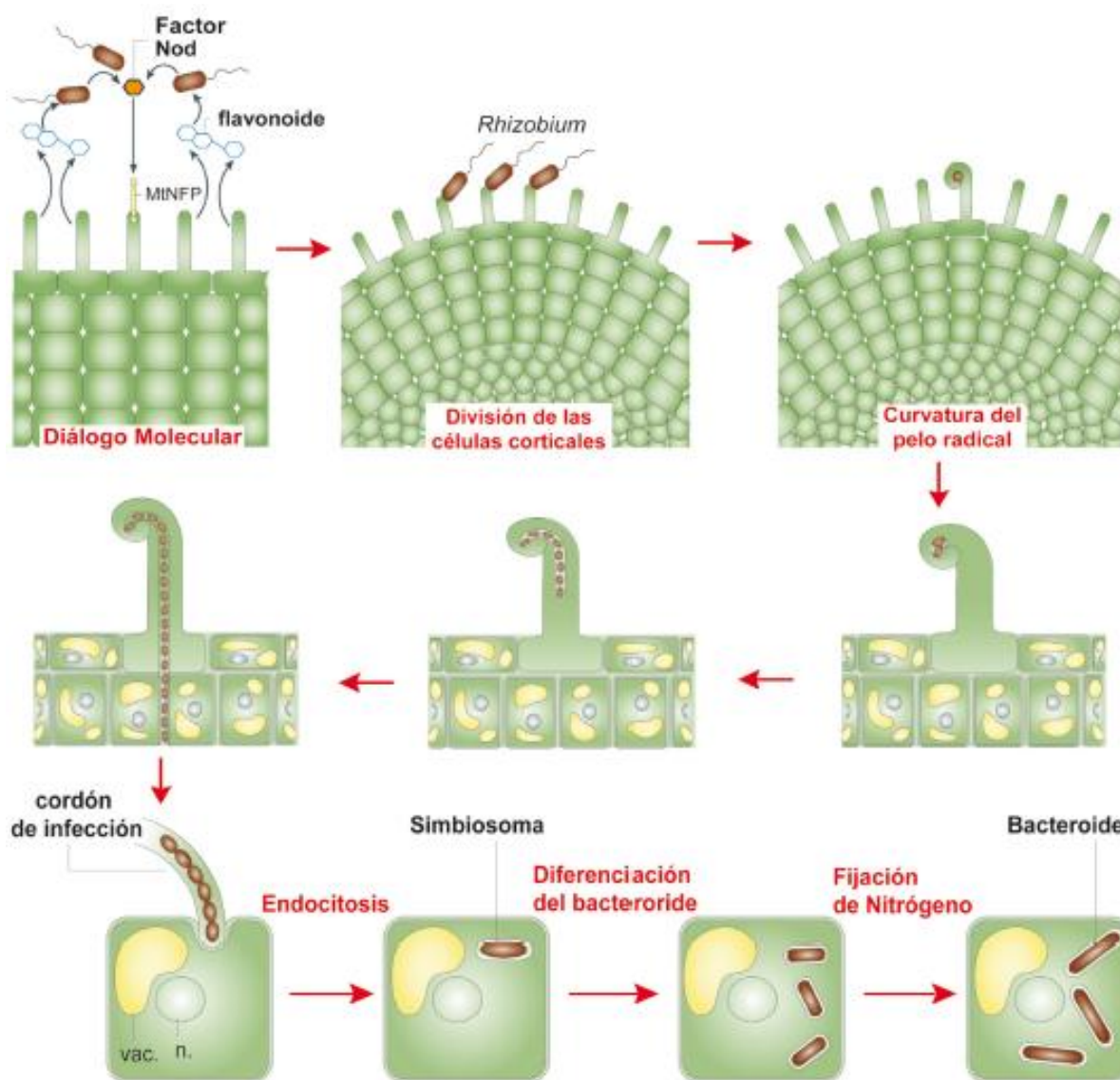


Figura 1.3 Proceso de nodulación y formación de bacteroides (modificado de Jones et al, 2007, por Talbi, 2011).

Al activarse la respuesta de la planta ante los FN, da inicio a la formación del hilo de pre-infección en el que las bacterias son atrapadas. Al mismo tiempo, la expresión génica se altera y las células corticales internas de la raíz son activadas mitóticamente, todo esto permitiendo la formación del primordio nodular (Kassaw y Frugoli, 2013;

Oldroyd et al, 2011; Wang et al, 2012). Las bacterias empiezan a migrar por el hilo de infección hasta llegar a la corteza y al primordio nodular. Posteriormente, son internalizadas por el proceso de endocitosis a las células corticales, donde son rodeadas por la membrana peribacteroidal formada por las células de la planta, formando así el simbiosoma (Jones et al, 2007; Kassaw y Frugoli, 2013). Una vez dentro, la bacteria se diferencia en bacteroide. El bacteroide es una característica específica del estado simbiótico en la que se sintetiza la nitrogenasa y es capaz de fijar nitrógeno atmosférico (Fig. 1.3) (Jones et al, 2007).

Los nódulos poseen tres zonas estructural y fisiológicamente diferenciadas llamadas corteza externa, corteza interna y región central. La corteza externa y la corteza interna están separadas por una columna de células endodérmicas que actúan como la barrera de difusión del oxígeno. Dependiendo de la planta que la bacteria infecte es el tipo de nódulo que se producirá, ya sea indeterminado o determinado. En leguminosas de climas templados, como *Medicago truncatula*, la división celular se da en la corteza interna formando nódulos indeterminados que tienen una forma alargada y heterogénea porque consiste en un gradiente de zonas de desarrollo con un meristemo apical persistente, una zona de infección, una de fijación y una de senescencia (Gage, 2004). Mientras que, en leguminosas de climas tropicales y subtropicales como *Lotus japonicus*, *Vicia faba*, *Glycine max* y *Phaseolus vulgaris*, la división celular comienza en la corteza externa formando nódulos determinados que tienen una forma esférica y homogénea ya que el meristemo periférico deja de funcionar después de que el nódulo se forma (Fig. 1.4) (Gage, 2004).

1.4 Mecanismos de protección ante el oxígeno en los nódulos

1.4.1 Barrera de difusión del oxígeno

La barrera de difusión del oxígeno (BDO) está presente en los nódulos para el mantenimiento de una baja concentración de O_2 en la zona central de las células infectadas. Fue evidenciado por Tjepkema y Yocum (1974), por medio de un seguimiento de la concentración de O_2 desde la superficie hasta el centro del nódulo mediante el uso de microelectrodos selectivos, demostrando que el acceso de O_2 de

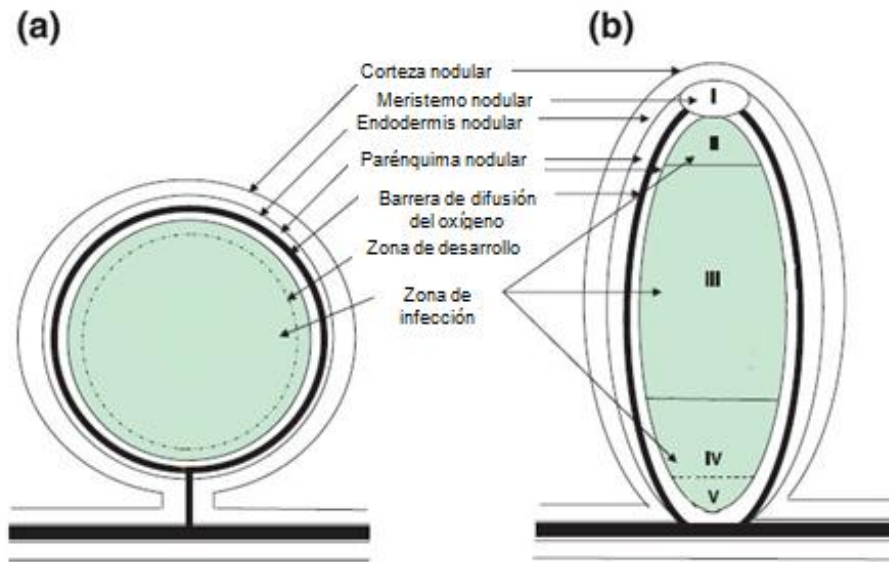


Figura 1.3 Morfología de nódulo determinado (a) e indeterminado (b) (modificado de Puppo et al, 2005).

afuera hacia adentro baja drásticamente a partir de dicha barrera que se encuentra en la corteza media.

La corteza media está formada por una matriz glicoprotéica (Iannetta et al, 1995; VandenBosch et al, 1989) y por tres capas de células de mayor tamaño que las de la corteza interna y externa con paredes engrosadas y grandes espacios intercelulares por donde el O_2 fluye. Bajo condiciones de estrés, las glicoproteínas aumentan en los espacios intercelulares, cerrando la posibilidad al O_2 de difundir a la zona infectada. De esta manera la BDO es capaz de ajustar la resistencia a la difusión del gas, de acuerdo con las condiciones ambientales del crecimiento de la planta (de Lorenzo et al, 1993; Minchin et al, 2008)

1.4.2 Leghemoglobina

La leghemoglobina (Lb) fue identificada en nódulos de soja y se encuentra en los nódulos de todas las leguminosas. La Lb es una proteína constituida por un grupo hemo y por un polipéptido (globina) que se une reversiblemente al O_2 , y se encuentra en el citoplasma de las células infectadas y en bajas concentraciones en el espacio peribactoidal. En etapas tempranas de la simbiosis, la globina se sintetiza por los

ribosomas de las células infectadas y el grupo hemo es sintetizado por ambos simbios (Becana et al 1994; Layzell y Hunt, 1990).

El O_2 es atrapado en la membrana plasmática por la Lb que, transformada en oxileghemoglobina ($Lb-O_2$), libera el O_2 de una manera paulatina a los bacteroides, desde la membrana peribacteroidal a la membrana bacteroidal, donde se encuentra la oxidasa terminal bacteriana (Becana y Klucas, 1992).

Análisis fisiológicos de nódulos de plantas de *L. japonicus* (por medio de ARN de interferencia, LbRNAi) revelaron la contribución de la Lb, demostrando que su ausencia provoca incrementos en la concentración de O_2 , disminución en la razón ATP/ADP y ausencia de actividad de la nitrogenasa (Ott et al, 2005).

1.4.3 Oxidasa terminal *cbb*₃

Las bacterias poseen múltiples cadenas respiratorias cuyas oxidasas terminales presentan distinta afinidad por el O_2 . Lo que les permite adaptar con eficacia la fosforilación oxidativa a las variaciones ambientales (Delgado et al, 1998). En bacteroides de *Bradyrhizobium japonicum* se demostró la presencia de una oxidasa

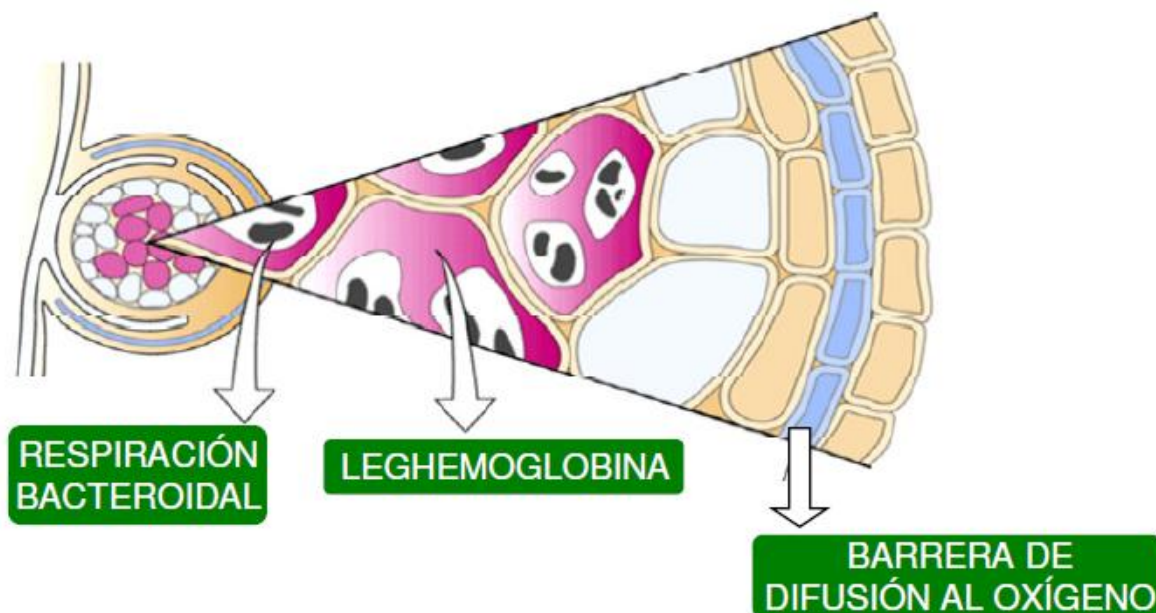


Figura 1.5 Representación esquemática de los mecanismos de protección ante el O_2 en los nódulos (Talbi, 2011).

terminal de alta afinidad por el O_2 , se trata de la citocromo c oxidasa de hemo-cobre *cbb3*. Esta oxidasa es codificada por el operón *fixNOQP*, que se encuentra regulado por el activador transcripcional FixK2 en respuestas a condiciones microaeróbicas (Mesa et al, 2005). La subunidad FixN es una oxidasa tipo b que contiene un grupo hemo y cobre, FixO es un citocromo tipo c que contiene un solo grupo hemo, y FixP es un citocromo tipo c que contiene dos grupos hemos (Preisig et al, 1993).

1.5 Desnitrificación

La desnitrificación es un proceso biológico importante por el que los nitratos y nitritos pueden convertirse en N_2 . Además, resulta ser una alternativa de respiración para algunas bacterias que viven en ambientes microaeróbicos o anaeróbicos donde pueden utilizar al NO_3^- como aceptor final de electrones. Este proceso consiste de una serie de reacciones de reducción por el cual el nitrato (NO_3^-) es reducido a N_2 , pasando por nitrito (NO_2^-), óxido nítrico (NO) y óxido nitroso (N_2O). Esta vía depende de las reductasas de nitrato (Nar), nitrito (Nir), óxido nítrico (Nor) y óxido nitroso (Nos), las cuales son codificados por los genes *napEDABC*, *nirKV*, *norCBQD* y *nosRZDYFLX* respectivamente (Fig. 1.7) (Zumft, 1997).

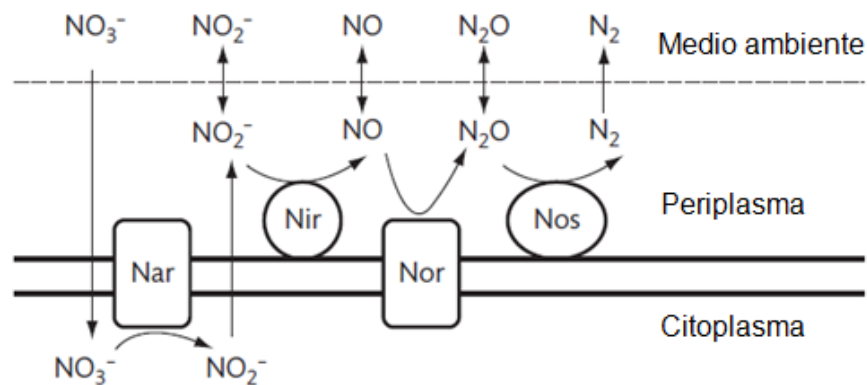


Figura 1.6 Proceso de desnitrificación (modificado de Kirchman, 2012).

La expresión de los genes de desnitrificación en *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*, *Paracoccus* y *Rhodobacter* es regulada por NnrR, un factor transcripcional tipo CRP/FNR, en respuesta a la concentración de O_2 y NO_3^- . Los reguladores tipo CRP/FNR reconocen secuencias promotoras consenso denominadas cajas de anaerobiosis (TTGAT-N4-ATCAA) para activar o reprimir la transcripción de sus genes

blanco (Zumft, 2002). En *B. japonicum*, la expresión de los genes *nirK*, *nosZ* y *norC* es regulado por un sistema FixLJ/K₂, que a su vez controla la expresión de los genes de fijación de N₂ (Zumft, 1997; 2002).

La desnitrificación dentro de los rhizobia es rara. Sólo se ha demostrado en *B. japonicum* la capacidad de reducir el NO₃⁻ a N₂ o NH₄ en ausencia de oxígeno y en presencia de nitrato o algún óxido de N₂ (Bedmar et al, 2005). Algunos rhizobia no contienen todos los genes requeridos para este proceso por lo que realizan una desnitrificación parcial. Por ejemplo, las cepas de *S. meliloti* ATCC 9930 y BALSACA no expresan los genes que codifican para la reductasa de N₂O (Holloway et al, 1996). La cepa *Rhizobium sulae* (formalmente *Rhizobium hedysari*) HCNT1 codifica solo para la reductasa de nitrito (Toffanin et al, 1996). *Rhizobium etli* CFN42 contiene los genes *nirK* y *norCBQD* únicamente (Gómez-Hernández et al, 2011).

Durante la desnitrificación se producen intermediarios como el NO₂⁻ y el NO. Tradicionalmente, se ha considerado al NO como una molécula tóxica. Pero recientemente, se ha mostrado como una molécula señal en los nódulos. Por lo que ha aumentado el interés por conocer el papel que juega en vida libre y en la interacción planta-bacteria. Por ejemplo, se ha observado una clara contribución del NO en el proceso de nodulación de *M. truncatula*-*S. meliloti* (Ferrarini et al, 2008).

1.6 Estrés abiótico

La fijación simbiótica de nitrógeno resulta particularmente sensible a condiciones ambientales adversas como: sequía, salinidad, temperaturas extremas, heladas, presencia de metales pesados o bien de especies reactivas de O₂ (ROS) o de N₂ (RNS) que causan estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente. Estos provocan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que afectan negativamente a este proceso.

1.6.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es causado por la presencia de ROS como son el anión superóxido (O₂⁻), radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno (H₂O₂) producto del metabolismo de transporte de electrones como la fotosíntesis, la respiración y la fijación de N₂, o bien

por sequía, salinidad, rayos ultravioleta (UV), bajas temperaturas, tratamiento por herbicidas y toxicidad por metales (Becana et al, 2000; Geckil et al, 2003).

En los nódulos, la generación de O_2^- y H_2O_2 está dado por altas tasas de respiración que son necesarias para la FSN, la autooxidación de la Lb y la oxidación de varias proteínas con potencial reductor fuerte como la nitrogenasa, la ferredoxina y la hidrogenasa (Becana et al, 2000).

Ha sido reportado que la presencia de ROS en la simbiosis de *Pisum sativum-Rhizobium leguminosarum* y *P. vulgaris-Rhizobium tropici* afecta la FBN inhibiendo la expresión de genes implicados en este proceso biológico, que perjudican la actividad de la nitrogenasa, disminuyen el contenido de Lb y la tasa de fotosíntesis (Marino et al, 2006; Ramírez et al, 2013).

1.6.2 Estrés nitrosativo

El estrés nitrosativo es causado por la presencia de RNS como el óxido nítrico (NO), peroxinitrito ($ONOO^-$) y nitrito. El NO es un radical gaseoso lipofílico de vida corta, que puede atravesar fácilmente las membranas celulares. Está presente en todos los organismos, incluyendo los nódulos de leguminosas, específicamente en la zona de fijación (Baudouin et al, 2006).

En las relaciones simbióticas entre leguminosas y rhizobia, se ha encontrado que concentraciones altas de NO resulta ser una molécula letal generándose como un agente estresante. En *E. coli* demostraron que él NO inhibe el crecimiento celular y la respiración celular al unirse a los citocromos en condiciones de bajo O_2 (Yu et al, 1997). En simbiosis, afecta la fijación de N_2 e induce la senescencia temprana en nódulos de *M. truncatula* (Cam et al, 2012) y *Lotus japonicus* (Kato et al, 2010). En condiciones de estrés hídrico, aumento el contenido de NO en el nódulo inhibiendo la actividad de la nitrogenasa (Sánchez et al, 2010). En *R. etli*, la presencia de NO afecta tanto en el crecimiento microaeróbico como en la fijación de N_2 (Gómez-Hernández et al, 2011).

Se considera que la fuente de síntesis de NO en la interacción planta-rhizobia, es dado por ambos simbioses. En la planta, las vías enzimáticas descritas son por la reductasa de nitrato (RN) y por la cadena de transporte de electrones (CTE) de la mitocondria.

Horchani y cols. (2011) estudiaron la producción de NO en la interacción *M. truncatula*-*S. meliloti*, describiendo que la reducción de nitrato a nitrito es mediado por la RN de la planta, y se reduce a NO a través de la CTE de la mitocondria. En la bacteria, la principal producción de NO es por el proceso de desnitrificación, particularmente en condiciones hipóxicas (Meakin et al 2007; Sánchez et al, 2010).

En conjunto, se ha visto que el papel del NO en el nódulo depende de su concentración dentro de este. Se ha propuesto que el nivel de NO en el nódulo puede ser controlado por la presencia de hemoglobinas y por el proceso de desnitrificación. Dentro de las hemoglobinas, se pueden encontrar a la hemoglobina de *Vitreoscilla* (ver apartado 1.8.1), la flavo-hemoglobina y la Lb. La flavo-hemoglobina se encuentra distribuida en las bacterias, algunas rhizobia como *S. meliloti* contienen flavo-hemoglobina y se ha encontrado que juega un papel importante en la desintoxicación por NO convirtiéndolo a NO₂ u N₂O, para entrar en el proceso de desnitrificación (Meilhoc et al, 2010). La Lb tiene una alta afinidad por el NO formando el complejo Lb-NO, permitiendo así que este no se una a la nitrogenasa (Kanayama et al, 1990; Sánchez et al, 2010). El proceso de desnitrificación participa en la desintoxicación de NO, por ejemplo se ha encontrado que el crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. no fue afectado por la presencia agentes productores de NO como el nitroprusiato de sodio (SNP), mientras que en *S. meliloti* 1021 si afecta (Maiti et al, 2012). En nódulos de *R. etli* CE3, la presencia de NorC es indispensable para que esta bacteria crezca en presencia de SNP, indicando que NorC es necesaria para desintoxicar NO (Gómez-Hernández et al, 2011).

1.7 Hemoglobinas bacterianas

La hemoglobina es una proteína que se une reversiblemente con el O₂, se encuentra en la mayoría de los organismos incluyendo a las bacterias. Se pensaba que las hemoglobina solo estaban presentes en organismos superiores, sin embargo se demostró por evidencia molecular la presencia de una hemoglobina en la bacteria *Vitreoscilla* (Wakabayashi et al, 1986). Actualmente, las hemoglobinas bacterianas se dividen en tres grupos: las globinas de dominio simple, las flavohemoglobinas y las hemoglobinas truncadas.

Las globinas de dominio simple adoptan la forma clásica de las globinas. Se han encontrado en *Campylobacter jejuni* (CHb), *Clostridium perfringens* (CpHb) (Frey et al, 2003a) y la primera hemoglobina bacteriana identificada y más estudiada es de *Vitreoscilla* (VHb) (Wakabayashi et al, 1986). Las flavohemoglobinas son homólogas a las globinas pero tienen fusionado un dominio reductasa con un sitio de unión para “flavin adenine dinucleotide” y NAD(P)H, la más estudiada y caracterizada es la de *E. coli* (Hmp). Las hemoglobinas truncadas son de 20 a 40 aminoácidos más pequeñas que las globinas comunes y se sabe muy poco de ellas, un ejemplo de este grupo se encuentra en *Mycobacterium tuberculosis* (Hernández-Urzúa y Membrillo-Hernández, 2004).

Inicialmente, se creía que las hemoglobinas bacterianas solo tenían la función de transporte y almacenamiento de O₂, sin embargo se ha propuesto que funcionan como sensores ante diferentes estreses ambientales. Por ejemplo, las flavohemoglobinas se les ha atribuido el papel de enzimas desintoxicantes de NO (Stark et al, 2012).

1.7.1 Hemoglobina de *Vitreoscilla*

Vitreoscilla es una bacteria filamentosa gram-negativa de la familia Beggiatoa clase beta-proteobacteria, es un organismo aeróbico estricto que vive en ambientes con poco O₂. El crecimiento de esta bacteria bajo condiciones hipóxicas induce la síntesis de una proteína homodimérica, una hemoglobina. Esta hemoglobina fue identificada inicialmente como un citocromo o por su función como oxidasa terminal. Posteriormente, se encontró que esta proteína tenía una secuencia homóloga a otras hemoglobinas de eucariontes específicamente con la leghemoglobina II de *Lupinus luteus* (yellow lupin, Lb II), por lo que ahora se le conoce como hemoglobina de *Vitreoscilla* (VHb) (Wakabayashi et al, 1986).

VHb es una proteína que se une reversiblemente al O₂ y se encarga de transportarlo a la cadena respiratoria para la producción de ATP. Además, se ha descrito que produce un mayor crecimiento celular y un incremento en la actividad respiratoria (Stark et al, 2011; Wei y Chen, 2008). Se ha logrado expresar el gen de VHb (*vhb*) en organismos como *E. coli* (Anand et al, 2010; Frey et al 2002; Kaur et al, 2002), *Enterobacter*

aerogenes (Geckil et al, 2003), *R. etli* (Ramírez et al, 1999) y *Arabidopsis thaliana* (Wang et al, 2009).

Adicionalmente, se ha encontrado que VHb tiene efectos positivos y negativos en la respuesta a un estrés. Dentro de los efectos positivos, se observó que el crecimiento celular de dos cepas de *E. coli* MG1655 y DH5 α (Frey et al, 2002; Kaur et al, 2002, respectivamente) que expresan VHb no se ven afectados por la presencia de SNP, indicando que la expresión de esta hemoglobina ayuda a las células a resistir la toxicidad por NO. También, Anand y cols. (2010) encontraron que en presencia de H₂O₂, VHb interacciona con OxyR, un regulador positivo de genes encargados de la respuesta a estrés oxidativo como *katG* (catalasa-peroxidasa G) y *sodA* (superóxido dismutasa A). Sugiriendo que la capacidad de VHb en aliviar el estrés oxidativo es alterando el estado de las enzimas antioxidantes.

Dentro de los efectos negativos, encontramos que ante estrés oxidativo se ha observado que la expresión heteróloga de VHb en *E. coli* MG1655 (Frey et al, 2002) no confiere protección en presencia de paraquat (PQ). Kaur y cols. (2002) analizaron la capacidad de degradación de NO de VHb y de una VHb modificada que fue fusionada con un dominio reductasa de la flavohemoglobina de *Ralstonia eutropha* (VHb-R). Encontraron que ambas proteínas protegen contra NO, pero VHb-R tiene una tasa de degradación de NO mayor que VHb. Concluyendo que VHb es un donador de oxígeno en condiciones hipoxicas y desintoxica RNS en asociación con una reductasa. Además, Frey y cols. (2003b) observaron que no hay expresión de VHb en presencia de ROS y RNS, específicamente en PQ, H₂O₂ y SNP.

Ramírez y cols. (1999) estudiaron el efecto de la expresión heteróloga de los genes VHb y UvrA en *R. etli* CE3. Complementaron la cepa con el plásmido pMR4, que contiene ambos genes. El gen *uvrA*, se encuentra 63 pares de bases río abajo de *vhb* y en la dirección opuesta. En cultivos microaeróbicos, observaron un incremento en la actividad respiratoria, en el contenido energético y en la expresión de *nifHc* que participa en la fijación de N₂. En bacteroides aislados de nódulos de plantas de frijol, la cepa complementada presentó un incremento en la actividad de la nitrogenasa, un mayor contenido de nitrógeno y un aumento en el peso seco de planta. Proponen que la

expresión de VHB incrementa la tasa respiratoria aumentando la producción de ATP y llevando a niveles más altos la actividad de la nitrogenasa.

1.8 Proteína UvrA

Las proteínas UvrABC se encargan de reconocer y anclarse al DNA que ha sido dañado y posteriormente repararlo. El nivel de expresión de estos genes se encuentra controlado por la respuesta SOS, un sistema que involucra la regulación positiva de los niveles de expresión de varios genes en respuesta a agentes dañinos que afectan el DNA (Truglio et al, 2006). Adicionalmente, se ha encontrado que UvrA repara daños por rayos UV.

Por ejemplo, en *Lactobacillus helveticus* la expresión de *uvrA* es activado por la exposición a rayos UV, H₂O₂ y pH ácido (Cappa et al, 2005). Se ha reportado que en bacterias patógenas como *Coxiella burnetti* (Park et al, 2010) y *Borrelia burgdorferi* (Hardy y Chaconas, 2013), UvrA confiere protección al nitrito de sodio acidificado y a DEA/NO (dietilamino/óxido nítrico). Sin embargo, de acuerdo a los estudios realizados por Sambir y col. (2011) UvrA no confiere protección a NaNO₂, SNAP (S-nitroso-N-acetilpenicilamina) y SPER/NO (espermina/óxido nítrico) en *B. burgdorferi*, (Sambir et al, 2011), lo cual pudiera deberse al efecto de cada agente donador de RNS. En *S. meliloti*, mutantes en los genes *uvrA*, *uvrB* y *uvrC* son sensibles a la desecación, rayos UV, mitomicina C y 4-NQO (agente químico que imita los efectos de rayos UV) (Humann et al, 2009).

1.9 Modelo de estudio: *Rhizobium etli*

R. etli es una bacteria aeróbica, que establece simbiosis fijadora de nitrógeno formando nódulos determinados en las raíces de *P. vulgaris* (frijol común). Su temperatura óptima de crecimiento es de 29°C, y puede utilizar malato o succinato como fuentes de carbono preferentemente. Es una bacteria que no utiliza el NO₃ como último aceptor de electrones pero si reduce el nitrito a óxido nítrico, y este a su vez a óxido nitroso (Gómez-Hernández et al, 2011). Su genoma está constituido por un cromosoma circular de 4,381 kb y seis plásmidos de alto peso molecular (p42a a p42f) cuyos tamaños van de 184 a 643 kb (González et al, 2006). Los genes que participan en la fijación de N₂ (*nod*, *nif* y *fix*) están presentes mayormente en el plásmido 42d conocido como

plásmido simbiótico (pSym) (Girard et al, 2000; González et al, 2006). Sin embargo, una región del p42f contiene copias reiteradas de genes *fixNOQP*, *fixGHIS-stoR* y *fixK*, así como el sistema regulador de los genes *fix* formado por *hfixL* y *fxkR* (Girard et al, 2000; Granados-Baeza et al, 2007; Zamorano-Sánchez et al, 2012). En este replicón, también están los genes que codifican para la catalasa superoxidasasa, *katG*, relacionada con la respuesta al estrés oxidativo y su regulador transcripcional *oxyR* (Vargas et al, 2003).

Río debajo de los genes *fix*, en este mismo replicón, se encuentran codificados genes implicados en el proceso de desnitrificación como son los operones *nirKV-nnrR* y *norCBQD* (Gómez-Hernández et al, 2011). Estos genes son activados por factores transcripcionales tipo FNR/CRP en respuesta a señales del medio ambiente. FixKf activa al operón *nirK* en condiciones de bajo oxígeno; mientras que NnrR activa a este operón y al operón *norCBQD* en presencia de óxidos N₂. NirK es la enzima encargada de reducir el nitrito a óxido nítrico, y NorCB son indispensables para el crecimiento de *R. etli* en presencia de NO ya que lo reduce a N₂O. En nódulos de frijol la presencia de nitrato causa un incremento en la proporción de complejos Lb-NO. En la cepa silvestre se observa un aumento de más del 40% y de un 75% en una mutante *norC*, mientras que en una mutante *nirK* no se observa incremento en el porcentaje de complejos Lb-NO, esto cuando se compara el porcentaje de complejos Lb-NO en nódulos formados por las mismas cepas pero sin la presencia de NO₃. Este incremento en NO dentro del nódulo afecta la actividad de la nitrogenasa, tanto en la cepa silvestre como en la mutante *norC*. Estas observaciones indican que en *R. etli*, NorC es necesaria para desintoxicar de NO en la bacteria y en el nódulo, y que NirK, a través de su actividad de nitrito reductasa contribuye a la formación de NO en el nódulo.

2. Objetivos

2.1 Objetivo General

Evaluar la participación de las proteínas Vhb y UvrA de *Vitreoscilla* en la protección de *Rhizobium etli* CE3 al estrés nitrosativo y a la radiación UV, tanto en vida libre como en simbiosis.

2.2 Objetivos particulares

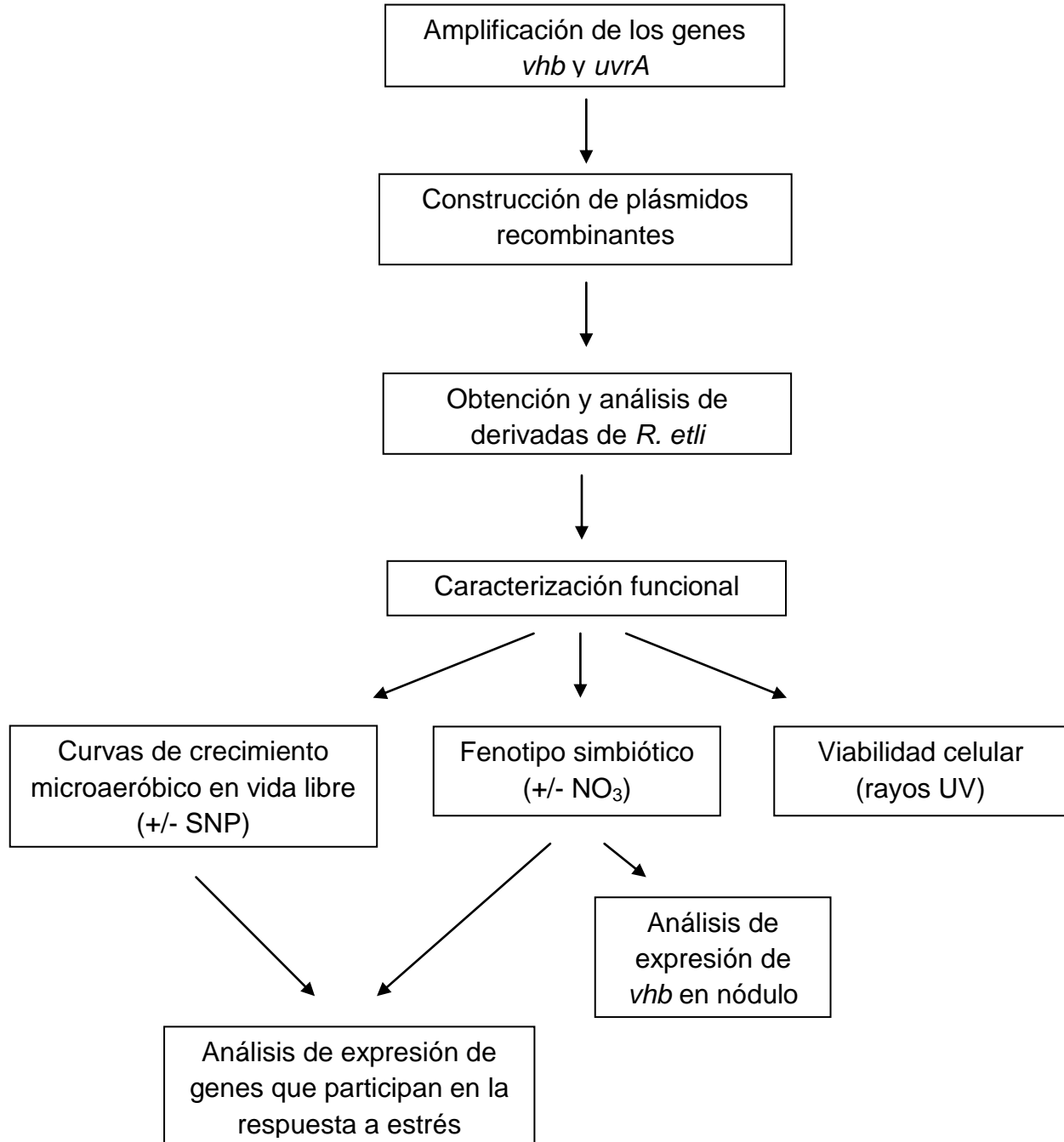
1. Construcción de cepas de *R. etli* CE3 que expresen los genes *vhb* y *uvrA* de *Vitreoscilla*.
2. Analizar la expresión en *R. etli* de los genes *vhb* y *uvrA* de *Vitreoscilla*, así como de sus genes que están implicados en la respuesta a estrés (*btuE*, *sodB*, *prxS*, *katG* y *oxyR*).
3. Evaluar la participación de Vhb en la respuesta al estrés nitrosativo en *R. etli* tanto en vida libre como en simbiosis con plantas de frijol.
4. Evaluar el efecto de los rayos ultravioleta (UV) sobre la viabilidad de *R. etli*.

3. Hipótesis

1) Dado que la expresión heteróloga de VHb y de UvrA en *R. etli* CE3 incrementa la eficiencia simbiótica de la bacteria (Ramírez et al, 1999) y el efecto protector de Vhb al estrés nitrosativo observado en *E. coli* (Anand et al, 2010; Frey et al, 2002; Kaur et al, 2002), entonces la expresión en *R. etli* de la globina VHb protegerá a esta bacteria del estrés nitrosativo.

2) Dado el efecto protector de UvrA contra rayos ultravioleta observado en otras bacterias, entonces la presencia de copias adicionales de este gen en *R. etli* incrementará su resistencia a daño por rayos UV.

4. Diagrama de trabajo



5. Material y métodos

5.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos usados en este trabajo están listados en la tabla 9.3

5.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo son: Luria Bertani (LB) para crecimiento de *E. coli*, PY, para crecimiento de rhizobios, y medio mínimo Y (MMY) para rhizobios (descripción en el apartado 9.5.1).

Los medios de cultivo líquidos se realizaron con la disolución de los solutos con agua destilada, posteriormente se esterizaron a 120°C por 20 min. Para preparar medios sólidos, se adicionó 1.5% de agar bacteriológico al medio líquido, y se esterizaron como se menciona anteriormente.

5.3 Antibióticos

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados por filtración. Las concentraciones de los antibióticos fueron las siguientes: carbenicilina (Cb), 100 µg/ml; espectinomicina (Sp), 100 µg/ml; estreptomina (St), 200 µg/ml; fosfomicina (Fm), 100 µg/ml; kanamicina (Km), 30 µg/ml; nalidíxico (Nal), 20 µg/ml; rifampicina (Rif), 50 µg/ml; tetraciclina (Tc), 10 µg/ml.

5.4 Conservación de cepas bacterianas

Las cepas bacterianas se conservan en glicerol a una concentración final de 40%. Para ellos, se crecen las cepas en presencia de los antibióticos adecuados hasta fase logarítmica de crecimiento. En un criovial se colocan 0.6 ml del cultivo y 0.4 ml de glicerol estéril. Se mezclan y se almacenan a -80°C.

5.5 Condiciones de cultivo

Las cepas de *E. coli* se crecen a 37°C en medio LB. Las cepas de *R. etli* a 30°C en medio PY y MMY. En medio líquido o sólido.

Los cultivos aeróbicos en medio líquido se realizaron en tubos de ensayo de 16 ml o en matraces Erlenmeyer de 150 ml, con un volumen de cultivo no mayor al 30% de la

capacidad máxima. Los cultivos microaeróbicos en medio líquido se llevaron a cabo en tubos de ensayo de 13 ml, sellados con tapón aislante y gaseados con una mezcla de oxígeno-argón (1:99, vol/vol). Los cultivos se crecen con agitación a 200 rpm.

Con el propósito de sincronizar los cultivos de *R. etli* en medio líquido las cepas se refrescan en placas de petri. Posteriormente se inoculan 3 ml de medio PY y se incuban por 12 horas a 30°C con agitación. Con 1 ml de los pre-cultivos se inoculan 50 ml de PY. Se incuban por 12 horas a 30°C con agitación. Cuando fue necesario cultivar en medio mínimo (MMY), estos cultivos, se colectaron por centrifugación, se lavaron con MMY estéril. y se inoculó el volumen deseado de MMY a una DO₅₄₀ inicial de 0.05.

El crecimiento celular fue monitoreado midiendo la densidad óptica (DO) a 540 nm utilizando un espectrofotómetro SmartSpec 3000 (Bio-Rad), en celdas de plástico desechables de 1 cm de paso de luz y un espectrofotómetro Jenway 6320D en tubos de ensayo de 13 ml

5.6 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos específicos para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fueron diseñados con el programa Oligo versión 7. Fueron sintetizados por la Unidad de Síntesis Química IBt-UNAM (Cuernavaca, Morelos, México). Y se utilizaron a una concentración final de 5 pmol/μl. Los oligonucleótidos usados en este trabajo se presentan en la tabla 9.4 .

5.7 Técnicas de biología molecular

La preparación de las soluciones que se utilizaron en las siguientes técnicas están descritas en el apartado 9.5.

5.7.1 Obtención de DNA genómico

Se utilizó el kit comercial GeneJet Genomic DNA Purification Kit de Thermo Scientific. El protocolo para purificación de DNA genómico de bacterias gram-negativa sugerido por el fabricante es el siguiente:

1. En un tubo eppendorf, centrifugar 1.5 ml de cultivo bacteriano por 10 min a 5000 x g. Tirar sobrenadante

2. Resuspender el pellet en 180 μ l de "Digestion Solution". Añadir 20 μ l de "Proteinase K Solution" y mezclar con vortex o pipeta hasta obtener una suspensión uniforme.
3. Incubar la muestra a 56°C con agitación hasta que las células se hayan lisado (aproximadamente 30 min).
4. Añadir 20 μ l de "RNase A Solution", mezclar con vortex e incubar la mezcla 10 min a temperatura ambiente.
5. Añadir 200 μ l de "Lysis Solution" a la muestra. Mezclar con vortex por 15 seg hasta que se obtenga una mezcla homogénea.
6. Añadir 400 μ l de etanol 50% y mezclar con pipeta o vortex.
7. Transferir el lisado preparado a una columna GeneJet Genomic DNA Purification insertado en un tubo de recolección. Centrifugar la columna 1 min a 6000 x g. Tirar el tubo de recolección. Colocar la columna GeneJet Genomic DNA Purification en un nuevo tubo de recolección de 2 ml.
8. Añadir 500 μ l de "Wash Buffer I" (con etanol añadido). Centrifugar por 1 min a 8000 x g. Tirar el sobrenadante y colocar la columna en el tubo de recolección.
9. Añadir 500 μ l de "Wash Buffer II" (con etanol añadido) a la columna. Centrifugar por 3 min a la velocidad máxima (≥ 12000 x g). Tirar el tubo de recolección y transferir la columna de purificación a un tubo de 1.5 ml estéril.
10. Añadir 200 μ l de "Elution Buffer" en el centro de la membrana de la columna para diluir el DNA genómico. Incubar por 2 min a temperatura ambiente y centrifugar por min a 8000 x g.
11. Tirar la columna de purificación. Usar el DNA purificado inmediatamente o guardar a -20°C.

5.7.2 Obtención de DNA plasmídico

Se utilizó la técnica de lisis alcalina:

1. Centrifugar 3 ml de cultivo crecido toda la noche.

2. Resuspender la pastilla celular con 100 µl de la Solución I.
3. Agregar 200 µl de la Solución II, mezclar vigorosamente sin vortex e incubar a temperatura ambiente por 5 min
4. Agregar 200 µl de la Solución III frio, mezclar vigorosamente e incubar en hielo por 5 min.
5. Centrifugar por 10 min.
6. Transferir el sobrenadante a otro tubo eppendorf.

Si las cepas *E. coli* hospederas de los plásmidos son *endA1hsdR17* no es necesario fenolizar y pasar directamente al paso 10. En caso contrario seguir con los siguientes 3 pasos:

7. Agregar al sobrenadante 500 µl de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, mezclar vigorosamente sin vortex.
8. Centrifugar 3 min, recuperar la fase superior.
9. Agregar a la fase superior, 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), mezclar vigorosamente sin vortex.
10. Centrifugar 3 min, recuperar la fase superior.
11. Agregar 1 ml de etanol 100%, mezclar por inversión varias veces.
12. Centrifugar 10 min, desechar líquido.
13. Lavar la pastilla de DNA dos veces con etanol 70%, mezclar con vortex.
14. Centrifugar 2 min, desechar todo el líquido.
15. Secar en el savant 5-10 min.
16. Resuspender en 20-50 µl de TE 10/1 con RNAsa 200 µg/ml.

5.7.3 Reacción en cadena de la polimerasa

El procedimiento general de la técnica de PCR es el siguiente:

1. Preparar el DNA templado, puede provenir directamente de una colonia bacteriana o bien de DNA plasmídico o genómico purificado.

De colonia:

- a. Picar cada una de las colonias seleccionadas con un palillo de dientes estéril.
- b. Resuspender en tubo eppendorf con 50 μ l de agua destilada
- c. Calentar a 95°C durante 10 min.
- d. Centrifugar a 14000 rpm durante 5 min.
- e. Recolectar el sobrenadante necesario para utilizarlo como DNA molde en la reacción de amplificación.

O utilizando DNA purificado con las metodologías descritas anteriormente

2. Hacer la mezcla de reacción de acuerdo a las instrucciones del fabricante, llevar a cabo la reacción de PCR en un termociclador y revisar el producto en un gel de agarosa.

En este trabajo, las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Veriti (Applied Biosystems). Se emplearon las siguientes polimerasas de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

1) Polimerasa de alta fidelidad Accuprime *Taq* DNA Polymerase (Invitrogen) se utilizó con la siguiente mezcla de reacción:

Buffer I (10X)	1X (DNA plasmídico)
Buffer II (10X)	1X (DNA genómico)
MgSO ₄	2 mM
dNTPs (10 mM)	100 μ M
DMSO	6%
Oligonucleótidos	5 pmol/ μ l
Accuprime <i>Taq</i> High Fidelity	0.2 μ l
Templado DNA	0.1 pg – 20 ng (DNA plasmídico) 10 pg – 500 ng (DNA genómico)
Agua esterilizada	=25 μ l

y el siguiente régimen de ciclos:

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	1 min
30	94	30 seg
	45-60	30 seg
	72	90 seg
1	72	10 min

2) Phusion Flash High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Scientific) se utilizó con la siguiente mezcla de reacción:

Phusion Flash PCR Master Mix 2X	1X
Oligonucleótidos	0.5 μ M c/uno
Templado DNA	12.5 ng
Agua esterilizada	= 25 μ l

y el siguiente régimen de ciclos:

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	98	10
40	98	2
	65	2
	60	2
	72	10
1	72	30

5.7.4 Clonación en un vector específico para productos de PCR

Se utilizó el TOPO TA Cloning Kit de Invitrogen que tiene la estrategia de clonación en un solo paso para la inserción directa de productos de PCR en el vector PCR2.1TOPO. Siguiendo el protocolo del fabricante, se realizó la siguiente reacción:

Producto PCR	0.5 - 4 μ l
Vector PCR2.1TOPO	1 μ l
Sales	1 μ l
Agua	=6 μ l

Incubar 20 min a temperatura ambiente, y transformar células competentes.

La clonación en TOPO se basa en las características de la enzima topoisomerasa I, que funciona como una enzima de restricción y una ligasa. Su papel es unirse y despegarse al DNA durante la replicación. La enzima reconoce específicamente la secuencia 5'-(C/T)CCTT-3' y forma un enlace covalente con el grupo fosfato de la timina del extremo

3'. Separa una hebra de DNA, lo que permite que el DNA se relaje, y replica los extremos de la cadena separada y se libera de ella.

Este kit aprovecha la actividad de religación de la topoisomerasa. Los vectores de TOPO son provistos linearizados con la topoisomerasa I unida covalentemente al fosfato 3' en cada extremo. Permitiendo ligar fácilmente los productos de PCR con extremos compatibles.

Además, los productos de PCR se ligan en el sitio de multiclonación. Los sitios de *EcoR1* rodean el sitio de inserción del producto de PCR para facilitar la escisión del inserto.

5.7.5 Enzimas de restricción de DNA

La digestión con enzimas de restricción se llevo a cabo en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron las enzimas de restricción de Thermo Scientific.

5.7.6 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se llevo a cabo mediante electroforesis horizontal en buffer tris-acetatos (TA) 1X en geles de agarosa al 1% preparado en buffer TA1X. Como buffer de carga se utilizó azul de bromofenol (migra aproximadamente a la misma tasa que un DNA de 300 bp) y xilencianol (migra aproximadamente a la misma tasa que un DNA de 4 kb). Como marcador de peso molecular utilizamos el marcador 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). El colorante fluorescente en luz ultravioleta, bromuro de etidio, se añadió después de fundir la agarosa, en un volumen de 5 µl/ 100 ml de gel de agarosa.

Las muestras de DNA presentes en los geles de agarosa se visualizaron con luz UV en un transiluminador. Las fotografías de los geles se realizaron con un equipo de análisis de imagen (GeneSnap-Syngene) que utiliza una videocámara acoplada a un sistema de impresión de imágenes.

5.7.7 Obtención de fragmentos de DNA en geles de agarosa

Se utilizó el GeneJET Gel Extraction Kit de Thermo Scientific y se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante con el siguiente protocolo usando una centrifuga a una velocidad $>12000 \times g$ (10000 – 14000 rpm):

1. Cortar la región del gel que contiene el fragmento de DNA de interés con un bisturí y un transiluminador en el cuarto oscuro. Cortar lo más próximo al DNA para minimizar el volumen de gel. Colocar el pedazo de gel en un tubo eppendorf de 1.5 ml y pesarlo.

2. Añadir un volumen 1:1 (vol/peso) del “Binding Buffer” al gel. Por ejemplo, añadir 100 μl de “Binding Buffer” por cada 100 mg de gel de agarosa.

3. Incubar a 50-60°C por 10 min o hasta que el gel este completamente disuelto. Mezcla el tubo por inversión cada ciertos minutos para agilizar el proceso. Mezclar la solución antes de cargarlo en la columna. Checar el color de la solución. Un color amarillo indica un pH óptimo para la unión de DNA. Si el color de la solución es naranja o violeta, añadir 10 μl de acetato de sodio 3 M, pH 5.2 y mezclar. La mezcla será ahora amarilla.

4. Opcional: usar este paso cuando el fragmento de DNA tenga un tamaño de ≤ 500 pb o >10 kb. Si el fragmento es ≤ 500 pb, añadir un volumen 1:2 de isopropanol 100% a la solución (por ejemplo, 100 μl de isopropanol deben ser agregados a 100 mg de gel solubilizado en 100 μl de “Binding Buffer”) y mezclar. Si el fragmento es >10 kb, añadir un volumen 1:2 de agua a la solución (por ejemplo, 100 μl de agua deben ser agregados por cada 100 mg de gel solubilizado en 100 μl de “Binding Buffer”) y mezclar.

5. Transferir no más de 800 μl de solución de gel solubilizada a la columna de purificación GeneJet. Centrifugar por 1 min. Desechar el líquido del tubo de colecta, y colocar la columna nuevamente al tubo de colecta.

6. Opcional: usar este paso adicional solo si el DNA purificado se usará para secuenciación. Añadir 100 μl de “Binding Buffer” a la columna. Centrifugar 1 min. Desechar el líquido del tubo de colecta, y colocar la columna de nuevo al tubo de colecta.

7. Añadir 700 μl de “Wash Buffer” (diluido con etanol) a la columna. Centrifugar 1 min. Desechar el líquido del tubo de colecta, y colocar nuevamente la columna al tubo de colecta.

8. Centrifugar la columna vacía por 1 min más.
9. Transferir la columna en un tubo eppendorf limpio. Añadir 50 µl “Elution Buffer” en el centro de la membrana de la columna. Centrifugar por 1 min.
10. Tirar la columna y guardar el DNA purificado a -20°C.

5.7.8 Ligación

Se utilizó la ligasa T4 DNA Ligase de Thermo Scientific, y se realizó la siguiente reacción:

Vector lineal	0.25 µg
Inserto	0.5 µg
T4 DNA Ligase	1 µl
Buffer 10X	2 µl
Agua	= 20 µl

Incubar a 14°C toda la noche. Inactivar la reacción 10 min a 65°C.

5.7.9 Transformación bacteriana

5.7.9.1 Preparación de células competentes de *E. coli* DH5α

El procedimiento para obtener células competentes es el siguiente:

1. Inocular en 5 ml de LB la cepa *E. coli* DH5α e incubar a 37°C.
2. Reinocular los 5 ml en 1 L de LB e incubar a 37°C por 3 horas hasta alcanzar una DO₅₄₀ entre 0.550 – 0.6.
3. Todo frío y estéril.
4. Centrifugar 5 min a 5000 rpm.
5. Resuspender en 200 ml de 0.1 M CaCl₂ e incubar 30 min en hielo.
6. Centrifugar 5 min a 5000 rpm, resuspender en 20 ml de 60 mM CaCl₂ + glicerol + Hepes.
7. Centrifugar 5 min a 5000 rpm.

8. Resuspender en 5 ml de 60 mM CaCl₂ + glicerol + Hepes.
9. Hacer alícuotas de 50 µl en tubos eppendorf.
10. Guardar a -70°C.

5.7.9.2 Transformación de células competentes de *E. coli* DH5α

Se realizó el siguiente procedimiento:

1. Descongelar las células competentes en hielo.
2. Añadir a cada tubo, con 50 µl de células competentes, la reacción de ligasa.
3. Incubar 30 min en hielo.
4. Dar un choque térmico a 42°C por 2 min.
5. Pasar los tubos a hielo por 2 min.
5. Agregar 200 µl de medio S.O.C. (Invitrogen)
6. Incubar 1 hora en agitación a 37°C.
7. Platear 100 µl en cajas de Petri con el medio selectivo adecuado.
8. Incubar a 37°C.

5.7.10 Conjugación bacteriana

La transferencia de DNA a *R. etli* se realizó por conjugación triparental y tetraparental. La conjugación triparental se da cuando participan una cepa receptora, una cepa donadora, que no porta los genes para la conjugación ni en el plásmido ni en el cromosoma, y una tercer cepa que porta un plásmido con los genes necesarios para que la conjugación se lleve a cabo. Y tetraparental, cuando participan una cepa receptora, una cepa donadora y dos cepas que portan un plásmido cada uno con los genes necesarios para la conjugación.

En general, la conjugación para cepas de *R. etli* se realizó de la manera siguiente:

1. Inocular por separado las cepas receptora, donadora y las cepas con los plásmidos conjugativos en 2 ml de medio PY.
2. Incubar a 30°C en agitación por 8 – 12 horas.
3. Colocar por separado una alícuota de cada cepa en una caja de Petri con medio solido PY como control.
4. Mezclar las cepas en una proporción 4 (receptora): 2 (donadora): 1 (ayudador) (ej. 300 µl, 150 µl, 75 µl) para el caso de una cruza triparental. En caso de cruza tetraparental, la proporción es 4 (receptora): 2 (donadora): 1 (ayudador1): 1 (ayudador2) (ej. 300 µl, 150 µl, 75 µl, 75 µl).
5. Depositar la mezcla en una gota sobre una caja de Petri con medio solido PY, y dejar secar la gota en la campana.
6. Incubar a 30°C por 24 horas
7. Colectar la población bacteriana con una asa estéril y resuspender en 1 ml de solución estéril de Sulfato de Magnesio (MgSO₄ 10 mM) -Tween (0.01%).
8. Hacer diluciones de la suspensión en una serie de tubos con 900 µl de MgSO₄- Tween. Del tubo donde se resuspendió la cruza se toman 100 µl y se añaden al primer tubo de la serie, se agita con vortex, se toman 100 µl de este tubo y se añaden al segundo y así hasta completar las diluciones.
9. Platear 100 µl de ciertas diluciones (ej. 10⁻⁴ a 10⁻⁶) con un triangulo de vidrio estéril en cajas de Petri de medio solido PY con los antibióticos selectivos.
10. Incubar a 30°C.

5.7.11 Visualización de plásmidos de alto peso molecular en geles horizontales

Para observar el perfil de los plásmidos de las cepas derivadas de *R. etli*, se realizó mediante la técnica modificada de Eckhardt (Hynes et al, 1990):

1. Inocular cepas de *R. etli* en PY con los antibióticos adecuados e incubar toda la noche a 29°C.

2. Preparar un gel horizontal de agarosa al 0.75% en Tris-Boratos (TB) 1X. Dejar gelificando por 1 hora.
3. Retirar el peine y llenar la cámara con buffer TB 1X hasta que toque el gel, sin cubrir los pozos.
4. Agregar a cada pozo 25 µl de SDS 10% Xylencyanol.
5. Precorrer el gel a 100 volts durante 20 min con los polos invertidos (positivo del lado de los pozos).
6. Tomar 200 µl de cultivo.
7. Centrifugar 3 min a 13000 rpm en frío. Retirar sobrenadante con una jeringa.
8. Resuspender la pastilla celular en 500 µl de agua fría con vortex.
9. Adicionar con 1 ml de N-lauroyl sarcosina 0.3% frío y mezclar por inversión (30 veces).
10. Centrifugar 3 min a 13000 rpm. Extraer el sobrenadante con jeringa.
11. Incubar 10 min a -20°C.
12. Agregar a la pastilla celular 40 µl de Ficoll 20% en Tris-EDTA (TE) 1/10.
13. Agregar 10 µl de la Solución lisis [40 µl de lisozyama + 230 µl (RNAsa + azul de bromofenol)].
14. Cubrir el gel con buffer TB 1%.
15. Mezclar 20 veces con la pipeta y colocar 25 µl de la muestra en cada pozo.
16. Correr a T.A. el gel durante 60 min a 40 volts (para hacer que las muestras entren al gel uniformemente). Correr a 100 V por 11 horas en frío .

5.7.12 PCR en transcriptasa reversa (RT-PCR)

5.7.12.1 Obtención de RNA

5.7.12.1.1 En vida libre

A partir de cultivos de las cepas de *R. etli* crecidos en 25 ml de MMY por aproximadamente 8 hrs, se obtuvo RNA de la siguiente manera:

1. Recolectar los cultivos en tubos para centrifuga (nalgene). Adicionar 1 ml de RNA later. Centrifugar a 10000 rpm por 5 min a 4°C. Guardar el pellet a -70°C.
2. Resuspender en agua tratada con DEPC (1 ml), centrifugar a 14000 rpm por 3 min a 4°C en tubos eppendorf (para RNA).
3. Tirar el sobrenadante y resuspender con pipeta el pellet en 1 ml de Trizol por cada 1×10^7 células bacterianas.
4. Incubar la suspensión 5 min a temperatura ambiente.
5. Adicionar 200 µl de cloroformo (exclusivo para RNA) por cada ml de Trizol.
6. Mezclar vigorosamente a mano durante 15 seg.
7. Incubar a temperatura ambiente 2 a 3 min.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 20 min a 4°C.
9. Transferir con cuidado la fase superior, sin tomar de la interfase o de la fase inferior, con una punta limpiar para RNA a un tubo limpio bien rotulado.
10. Adicionar 0.6 ml de isopropanol por cada ml de Trizol y mezclar varias veces por inversión.
11. Incubar por al menos 20 min a -80°C.
12. Centrifugar a 14000 rpm durante 20 min a 4°C.
13. Remover el sobrenadante con cuidado por decantación.
14. Limpiar el pellet con 1 ml de etanol 75% (preparado con H₂O DEPC).
15. Vortexear para despegar el pellet.
16. Centrifugar durante 5 min a 4°C y 9000 rpm.

17. Quitar la mayor cantidad de etanol posible y secar por inversión sobre toalla absorbente limpiar de 30 min a 2 horas (marcar con un plumón donde se encuentre el pellet).

18. Resuspender en 20 a 50 μ l de H₂O DEPC o buffer de elusión de kit para purificación de RNA. Tomar un par de alícuotas de 2 μ l + 1 ml de H₂O DEPC para cuantificar el RNA en un nano-drop (260 nm). Y 2 μ l para correr en un gel de agarosa al 1.3%.

19. Guardar el resto de la muestra a -70°C.

Durante el procedimiento se utilizó material exclusivo para este propósito, previamente tratado con agua DEPC (dietilpirocarbonato).

El RNA obtenido se sometió a tratamiento con DNAsa. La ausencia de DNA se comprobó mediante la amplificación de la muestra utilizando uno de los oligonucleótidos correspondientes.

5.7.12.1.2 De nódulo

a) Homogenización. Este paso es para separar el material de la pared y membrana celular de las proteínas solubles y nucleótidos (que contienen RNA y DNA).

1. Pesar 150 – 200 mg de nódulo.

2. Homogenizar los nódulos en 1 ml de Trizol en un mortero con nitrógeno líquido, añadiendo el trizol en el mortero inmediatamente después de la molienda, y permitiendo que el homogenizado a reposar hasta que se descongele en el mortero.

3. Centrifugar por 15 min a 14,000 rpm a 4°C, transferir el sobrenadante a un nuevo tubo. Tirar la pastilla.

b) Fase de separación. Usando el sobrenadante del paso anterior, el RNA puede ser ahora separado del DNA y proteínas.

4. Añadir 250 μ l de fenol-cloroformo (1:1 vol/vol y pH 4.5), mezclar la solución agitando vigorosamente los tubos a mano por 30 seg.

5. Centrifugar por 15 min a 14,000 rpm a 4°C.

6. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo y añadir 500 µl de Buffer 1, mezclar la solución invirtiendo suavemente los tubos por 1 min.

7. Incubar la mezcla a temperatura ambiente por 10 min.

8. Añadir 200 µl de cloroformo-álcool isoamílico (24:1 vol/vol), mezclar la solución invirtiendo suavemente los tubos por 1 min.

9. Centrifugar por 20 min a 14,000 rpm a 4°C.

10. Transferir sobrenadante a un tubo nuevo. Remueve la fase superior, aproximadamente a un 60% del volumen usado para el trizol (se utilizó 1 ml de trizol, eliminar aproximadamente 0.6 - 0.7 ml de la fase superior). Para esto, usa una pipeta de 200 µl, y cuidadosamente elimine la fase superior en 3 – 4 pasos. Tenga cuidado de no tocar la fase media/interfaz. Una vez que tenga los 600 µl, no presione por más de 100 µl extra de la fase superior, ya que cualquier contaminación de la fase media/interfaz será un desastre.

c) Precipitación del RNA. Ahora que ya tiene la fase acuosa que contiene RNA en los tubos, este paso será precipitar el RNA de esta solución.

11. Añadir 250 µl de isopropanol a la fase acuosa y después añada 200 µl de solución NaCl (1.2 M en agua DEPC).

12. Mezcla invirtiendo suavemente los tubos.

13. Guarda los tubos a -80°C hasta que estés listos para los siguientes pasos. Tome un descanso.

14. Centrifugar por 20 min a 14,000 rpm a 4°C para precipitar la pastilla de RNA.

15. El RNA aparecerá como una pastilla blanca o translúcida en el fondo del tubo.

16. Eliminar el sobrenadante (fase líquida) y guardar la pastilla. El sobrenadante puede ser eliminado vertiéndolo cuidadosamente a un contenedor de residuos. Después, usando una pipeta, puede quitar el resto del sobrenadante. Solo la pastilla debe quedar, con lo menos de líquido posible.

d) Lavado de RNA. Ahora que ya tiene la pastilla de RNA del paso anterior, esta pastilla debe ser lavada para eliminar las sales y el resto de isopropanol.

17. Lavar la pastilla de RNA dos veces con 1 ml de etanol (70%), mezclar por vortex y centrifugar por 5 min a 7,500 rpm a 4°C.

18. Eliminar el etanol con una pipeta.

19. Una vez que el sobrenadante (liquido) haya sido eliminado, seque los tubos al vacio o puede voltear los tubos sobre un papel limpio. Si el RNA está muy seco, será difícil resuspenderlo.

e) Re-disolver el RNA. Después de lavar el RNA del paso anterior, el RNA se precipitará como pastilla pura una vez más, y necesitará resuspenderlo.

20. Una vez que la pastilla este seca, debe parecer gelatinosa. Disolver en 30 µl RNasa libre de agua (usamos agua DEPC). Puedes utilizar tu dedo para chasquear los tubos para disolver la pastilla.

21. Incubar por 10 min a 65°C en un thermo-incubadora.

22. Gire (spin) las muestras en una micro-centrifuga por unos segundos para mezclar la solución condensada de las paredes de los tubos.

23. Cuantificar el RNA en un nano-drop y guardarlo a -80°C, hasta que la integridad del RNA se haya determinado usando un análisis de gel de agarosa.

5.7.12.2 Síntesis de cDNA

Al obtener el RNA purificado y revisado por PCR, se prosiguió con la transcriptasa reversa, siguiendo el siguiente protocolo:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 ml estéril añadir:

RNA total	2 – 5 µg
Hexámeros (0.2 µg/µl)	1 µl
H2O DEPC	= 12 µl

2. Dar un pulso en la centrifuga, calentar a 70°C por 5 min y enfriar inmediatamente en hielo.

3. Una vez fríos, dar un pulso en la centrifuga y añadir:

5X buffer	4 µl
RiboLock Ribonuclease inhibitor	1 µl
dNTP mix (10 mM)	2 µl

4. Mezclar con pipeta

5. Calentar a 25°C durante 5 min.

6. Adicionar 1 µl de transcriptasa reversa y mezclar con pipeta.

7. Calentar a 25°C por 10 min.

8. Incubar a 42°C por 60 min.

9. Inactivar a 70°C por 10 min.

10. Enfriar en hielo y guardar a -20°C.

5.7.12.3 PCR

La amplificación de los genes se llevó a cabo utilizando la enzima High Fidelity Pol (Jena Biosciences) con la siguiente mezcla de reacción:

High Fidelity Buffer 10X	2.5 µl
dNTP	200 µM
Oligonucleótidos	0.2 – 0.5 µM c/uno
Templado DNA	1 – 100 ng
High Fidelity Pol	0.25 µl
Agua esterilizada	= 25 µl

y el siguiente programa en el termociclador:

No. de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo (seg)
1	95	2 min
20-30	95	20 seg
	50-68	30 seg
	68	1 min/kb
1	68	1 min/kb

El producto de la amplificación se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Como marcador de peso molecular se empleo un marcador de 100-1000 pb.

5.8 Preparación de cultivo de planta

5.8.1 Esterilización de semillas y germinación

La esterilización de las semillas de *P. vulgaris* se realizó siguiendo el procedimiento modificado de Talbi (2011):

1. Sumergir las semillas en solución de alcohol etílico durante 1 min.
2. Desechar el alcohol etílico, y adicionar una solución de cloro comercial diluida en agua (3:1, vol/vol) durante 5 min.
3. Desechar el cloro, y lavar abundantemente con H₂O estéril.
4. Remojar las semillas durante 2 horas en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Colocar las semillas en placas de Petri conteniendo agua-agar al 1%.
6. Germinar en oscuridad a 30°C hasta que las radículas alcancen una longitud de 1 a 2 cm.

5.8.2 Preparación de inóculos bacterianos

Los inóculos bacterianos se obtuvieron la siguiente manera:

1. Refrescar cepas en sus medios ricos sólidos correspondientes.
2. Recoger con un asa de vidrio estéril el cultivo con ayuda de medio rico líquido sin antibióticos.
3. Disolver el cultivo fresco en medio rico líquido hasta obtener una suspensión bacteriana de, aproximadamente, 10⁸ células viables por ml.

5.8.3 Cultivo de planta

El cultivo de planta se llevó a cabo en macetas, que se rellenaron con vermiculita. Se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 60 min. Las semillas pregerminadas se sembraron en las macetas en condiciones de esterilidad y se inocularon con 1 ml del inóculo bacteriano correspondiente. Se cubrió con una capa de perlita estéril la capa superficial de vermiculita, para evitar contaminación ambiental. Se colocaron platos

debajo de las macetas para el riego continuo con solución nutritiva Fahraeus y fueron cultivadas en invernadero bajo las siguientes condiciones: temperatura de 22 a 28°C y humedad relativa del 50 al 60% (Peralta et al., 2004).

5.9 Aplicación de estrés nitrosativo en cultivo de planta

Para este estudio, se cultivaron las plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa inoculadas con las cepas de *R. etli*. Se cultivaron en invernadero como se mencionó en el apartado 4.9. A los 14 días de post-inoculación y riego con solución nutritiva Fahraeus (descripción en el apartado 9.5.9), las macetas correspondientes a cada cepa se distribuyeron en dos grupos al azar, un grupo se mantuvo en riego con solución nutritiva y mientras que las plantas del otro grupo fueron regadas con 4 mM de KNO₃, concentración de nitrato que fue reportada previamente para inducir la formación de NO (Gómez-Hernández et al, 2011). A los 12 días de estrés, se determinó el número de nódulos, peso seco de planta y nódulos y concentración de Lb, y se analizó la expresión de algunos genes bacterianos en los nódulos.

El peso seco de planta y nódulos fueron obtenidos después de su secado en horno a 60°C durante 2 días.

5.10 Contenido de leghemoglobina

El contenido de Lb de los nódulos se determinó mediante fluorimetría de la manera descrita por Sánchez y cols. (2010), según el protocolo original de LaRue y Child (1979).

1. Homogenizar los nódulos frescos (0.3 g) en 5 ml de buffer de extracción de leghemoglobina suplementado con 10% de polivinilpirrolidona (PVPP).
2. Centrifugar a 14000 rpm a 4°C por 20 min.
3. Tomar alícuotas de 50 µl del sobrenadante y adicionar 3.15 ml de ácido oxálico al 16.6%.
4. Incubar las muestras a 120°C durante 30 min en una autoclave, como blanco se incluyó una alícuota de extracto sin incubar.
5. Cuantificar la emisión de la fluorescencia de las soluciones una vez enfriadas.

La emisión de fluorescencia se cuantificó en un espectrofluorímetro (Quantech de Turner) a una longitud de onda de excitación de 405 nm y de emisión de 600 nm. La diferencia en la emisión de fluorescencia entre las muestras incubadas y su correspondiente blanco es proporcional a la concentración de Lb de las mismas.

6. Resultados

6.1 Obtención de cepas de *Rhizobium etli*

Se obtuvieron cepas de *R. etli* CE3 que expresan los genes *vhb* y *uvrA* de *Vitreoscilla* en uni-copia insertados en el cromosoma por medio del uso del transposón miniTn7T y en multi-copia usando el vector pTR101. Los genes *vhb* y *uvrA* se obtuvieron por PCR utilizando el plásmido pMR4 de Ramírez y cols. (1999).

Obtención del plásmidos recombinantes.

El gen *vhb* se amplificó por PCR, utilizando el pMR4 como templado y los oligonucleótidos específicos Up-VHbH3 y Lw-VHb-H3, los cuales introducen los sitios de restricción *Hind*III. El producto de 1.2 kb se clonó en el vector pCR2.1TOPO, obteniendo el plásmido TOPO::*vhb*H3 y se transformó a *E. coli* DH5α seleccionando las clonas recombinantes en LbKm³⁰X-gal. La clona seleccionada se digirió con *Hind*III, y se corrió en gel de agarosa en TA. La banda de 1.2 kb correspondiente a *vhb* purificada se ligó al pTR101 digerido con *Hind*III para obtener el plásmido pTR101::*vhb*H3 (Figura 5.1A), y se transformaron a *E. coli* DH5α seleccionando las colonias en LbTc¹⁰. Las clonas obtenidas fueron analizadas por restricción con *Hind*III. El gen *uvrA* se amplificó por PCR, utilizando el pMR4 como templado y los oligonucleótidos específicos Up-UvrAR1 y LwVHbUvr-R1, los cuales introducen los sitios de restricción *Eco*R1. El producto de amplificación de 1.7 kb se clonó en el vector pCR2.1TOPO, obteniendo el plásmido TOPO::*uvrA* y se transformó a *E. coli* DH5α seleccionando las clonas recombinantes en LbKm³⁰X-gal. La clona seleccionada se digirió con *Hind*III y *Bam*HI, utilizando los sitios de restricción del pCR2.1TOPO, y se corrió en gel de agarosa en TA. La banda de 1.7 kb correspondiente a *uvrA* purificada se ligó al pTR101 digerido con *Hind*III-*Bam*HI para obtener el plásmido pTR101::*uvrA* (Figura 5.1A) y se transformó a *E. coli* DH5α seleccionando las colonias en LbTc¹⁰. Las clonas obtenidas fueron analizadas por restricción con *Hind*III- *Bam*HI.. Una vez comprobada la presencia del plásmido por lisis alcalina y digestión con enzimas de restricción de las células *E. coli* DH5α. Se realizaron conjugaciones triparentales, utilizando *R. etli* CE3 como cepa receptora, el plásmido pRK2013 que aporta la función de transferencia, y cada una de las cepas de *E. coli* DH5α con los plásmidos

recombinantes pTR101::*vhbH3* y pTR101::*uvrA*. Las transconjugantes se seleccionaron en PYS^{t200}Tc¹⁰. La comprobación de las derivadas se realizó por la técnica modificada de Eckhardt (Figura 5.2) y por PCR.

Para la clonación del gen *vhb* en el plásmido pUC18TminiTn7T, el gen *vhb* se amplificó por PCR, utilizando el pMR4 como templado y los oligonucleótidos específicos Up_VHb_Sph y Lw_VHb. El producto de 1.2 kb se clonó en el vector pCR2.1TOPO, obteniendo el plásmido TOPO::*vhb* y se transformó a *E. coli* DH5 α seleccionando las clonas recombinantes en LbKm³⁰X-gal. La clona seleccionada se digirió con *EcoRI* (sitio obtenido del vector TOPO), y se corrió en gel de agarosa en TA. La banda de 1.2 kb correspondiente a *vhb* purificada se ligó al vector pUC18TminiTn7T digerido con *EcoRI*, para obtener el plásmido pUC18TminiTn7T::*vhb*, y se transformaron a *E. coli* DH5 α seleccionando las colonias en LbCb¹⁰⁰. Las clonas obtenidas fueron analizadas por restricción con *EcoRI*. El plásmido TOPO::*uvrA* se digirió con *EcoRI*, y el fragmento de 1.7 kb que lleva el gen *uvrA* se cortó del gel y se purificó. Este fragmento se ligó con el vector pUC18TminiTn7T digerido con la misma enzima, para dar lugar al plásmido pUC18TminiTn7T::*uvrA*. Se transformó a *E. coli* DH5 α seleccionando las colonias en LbCb¹⁰⁰. Las clonas obtenidas fueron analizadas por restricción con *EcoRI*.

Clonación del interposón omega Sp/Sm en los plásmidos pUC18TminiTn7T recombinantes construidos.

Con el propósito de tener un marcador de selección que diferencie a la cepa silvestre de las cepas derivadas de *R. etli* CE3 que llevan los genes *vhb* y *uvrA* en el cromosoma, se clonó un cassette Ω Sp/Sm junto a cada gen en los plásmidos pUC18TminiTn7T recombinantes construidos.

Los plásmidos pUC18TminiTn7T::*vhb* y pUC18TminiTn7T::*uvrA* digeridos con *HindIII* fueron ligados con el fragmento *HindIII* de 2 kb del cassette de resistencia a Sp/Sm (Ω Sp/Sm) y se transformó a *E. coli* DH5 α seleccionando las colonias en LbCb¹⁰⁰Sp¹⁰⁰. Se obtuvieron entonces los siguientes plásmidos: pUC18TminiTn7T::*vhb*- Ω Sp y pUC18TminiTn7T::*uvrA*- Ω Sp (Figura 5.1B).

Obtención de derivadas de *R. etli* que expresan los genes *vhb* y *uvrA* de *Vitreoscilla*.

Para obtener las cepas de *R. etli* CE3 que expresan como uni-copia los genes *vhb* y *uvrA*, se utilizó el transposón miniTn7T que se encuentra en el plásmido pUC18T. El sistema miniTn7T permite la integración de una sola copia de un gen en el sitio y orientación específico del cromosoma junto al sitio Tn7 (*attTn7*) que se encuentra río abajo del gen *glmS* (implicado en la síntesis de pared celular). Además, el miniTn7T contiene dos terminadores de la transcripción para evitar la lectura del promotor *glmS* después de la integración al cromosoma (Choi et al, 2005).

Por medio de una conjugación triparental los plásmidos fueron transferidos a la cepa de *E. coli* HPSI (cepa receptora) ya que la cepa *E. coli* DH5 α (cepa donadora) no contiene el gen λ pir que permite la transposición. Se utilizó el plásmido pRK2013 como plásmido ayudador que confiere las funciones de transferencia (*tra*). La transferencia de plásmidos a la cepa HPSI fue seleccionada en LbRif⁵⁰Sp¹⁰⁰, y comprobada por patrones de restricción y PCR de colonia utilizando oligonucleótidos específicos de cada gen.

La transposición y transferencia de genes al cromosoma de *Rhizobium* se realizó por medio de una conjugación tetraparental utilizando a *R. etli* CE3 como cepa receptora, el plásmido pRK600 que proporciona la función de transposición del miniTn7T, el plásmido pUX que contiene y aporta la función de transferencia, y cada una de las cepas de *E. coli* HPSI con cada uno de los plásmidos pUC18TminiTn7T::*vhb*- Ω Sp y pUC18TminiTn7T::*uvrA*- Ω Sp. Las cepas que llevan insertados los genes en el cromosoma se seleccionaron en medio selectivo PYFm¹⁰⁰Sp¹⁰⁰. La ausencia de rearrreglos en el patrón silvestre de plásmidos de *R. etli* CE3 fue verificada por geles tipo Eckhardt (Figura 5.2) y la inserción sitio específica por PCR de colonia. El PCR se llevó a cabo utilizando la enzima de alta fidelidad Accuprime Taq DNA Polymerase utilizando oligonucleótidos específicos de cada gen y con los oligonucleótidos Tn7-Glms y Tn7-RR109. Estos dos últimos oligonucleótidos se utilizaron para comprobar que el transposón mini-Tn7 se insertó en el sitio específico *attTn7* localizado río abajo del gen *glmS*. El primer oligo se une al extremo 3' del gen *glmS* y el segundo primer se une al DNA insertado. El producto final de PCR es de aproximadamente 150 pb.

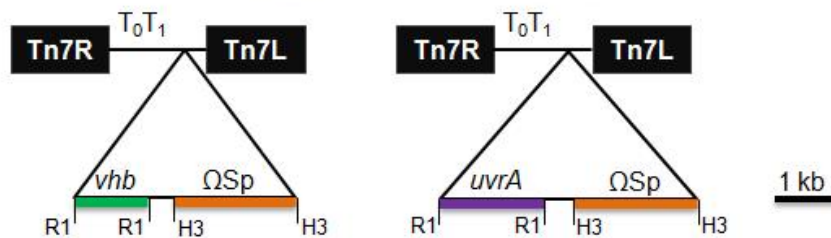
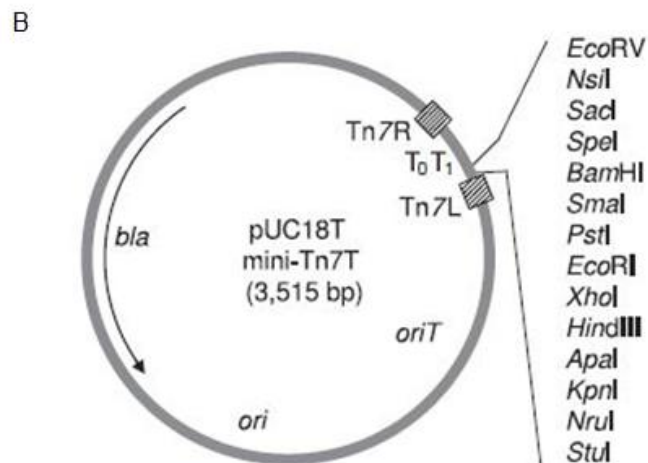
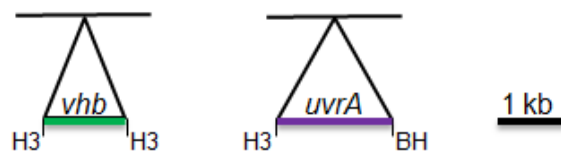
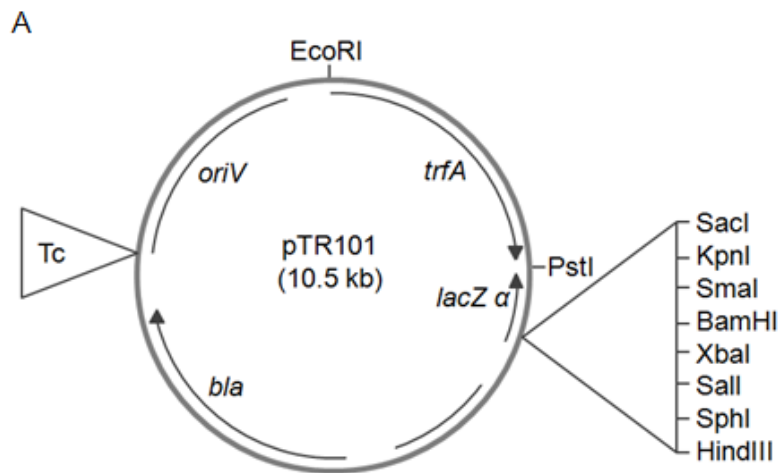


Figura 5.1. Construcción de los plásmidos: A) pTR101::*vhb*-H3 y pTR101::*uvrA*. B) pUC18TminiTn7T::*vhb*- Ω Sp y pUC18TminiTn7T::*uvrA*- Ω Sp. Símbolos: BH, *Bam*HI; H3, *Hind*III; kb, kilobases; R1, *Eco*RI; Sp, espectinomicina; Tc, tetraciclina.



Figura 5.2. Perfil de plásmidos en geles tipo Eckhardt de las derivadas de *R. etli*. CE3 (1), CE3/pTR101::*vhb* (2), CE3/pTR101::*uvrA* (3), CE3::*vhb*ΩSp (4), CE3::*uvrA*ΩSp (5).

6.2 Análisis de expresión de los genes de *Vitreoscilla vhb* y *uvrA* en *R. etli*.

En la figura 5.3 se muestra la región reguladora de *vhb* incluida en nuestras construcciones comparada con la región silvestre, en las que se indican los posibles sitios de unión de sus posibles reguladores.

Una vez obtenidas las cepas de *R. etli* CE3 que expresan los genes de *vhb* y de *uvrA* de *Vitreoscilla*, comprobamos que estos genes se expresan en este fondo genético heterólogo. Para ello diseñamos oligonucleótidos específicos para los genes, los cuales fueron utilizados en experimentos de expresión por RT-PCR. Como se reporta en la figura 5.4, ambos genes son expresados en *R. etli*.

A CGCTGGGGTTAAAAGTATTTGAGTTTTGATGTGGATTAAGTTTTAAGAGGCAATAAAGATTATAATAAGTGCTGCTACACCATACTGATGTATGGCAAACCATAAT
 B TGTGGATTAAGTTTTAAGAGGCAATAAAGATTATAATAAGTGCTGCTACACCATACTGATGTATGGCAAACCATAAT

 Fnr / CRP / ArcA Fnr Pribnow +1

Figura 5.3 Región promotora silvestre del gen *vhb* de *Vitreoscilla* (A) y la región promotora del gen incluida en las construcciones de este trabajo (B) (Anand et al, 2010). Se muestra la posición de una región putativa de unión de OxyR (*), esta región sobrelapa con los sitios de unión de Fnr-, Crp- (proteína represora catabólica] y ArcA (proteína control de la respiración aeróbica A) (subrayado).

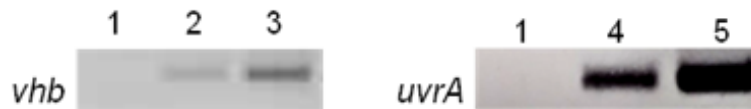


Figura 5.4. Análisis de expresión de los genes *vhb* y *uvrA* en *R. etli* CE3 (1), CE3::*vhb*-ΩSp (2), CE3/pTR101::*vhb* (3) CE3::*uvrA*-ΩSp (4) y CE3/pTR101::*uvrA* (5).

6.3 Efecto de la presencia de la globina VHb en *R. etli* en la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés

Ha sido reportado que en *E. coli* la presencia del gen *vhb* induce la expresión de genes relacionados con la respuesta a estrés como *sodA* y *katG* (Anand et al, 2010). Con el objetivo de conocer si en *R. etli* la globina de *Vitreoscilla* (VHb) modifica la expresión de genes que participan en la respuesta a estrés, seleccionamos los genes *btuE* (peroxidasa glutatión), *sodB* (superóxido dismutasa), *prxS* (peroxirredoxina), *katG* (catalasa-peroxidasa A) y *oxyR*. OxyR es un regulador transcripcional que activa genes antioxidantes en respuesta a ROS como *katG*. Además, *btuE*, *sodB* y *prxS* sintetizan enzimas antioxidantes que se expresan en condiciones de estrés oxidativo. El nivel de transcripción de estos genes en condiciones control en cepas de *R. etli* que expresan el gen *vhb* fue analizado por RT-PCR y comparado con los niveles de expresión en la cepa silvestre CE3.

Nuestros resultados (Figura 5.5) indican que la presencia de esta globina modifica el nivel de expresión de la mayoría de los genes analizados. Interesantemente, el número de copias del gen *vhb* también tiene un efecto en estos niveles de expresión. Mientras una copia de *vhb* induce la expresión de *btuE* y *prxS*; la expresión de *sodB* se observa

solo cuando *vhb* se encuentra en multicopia. *katG* se expresa en bajos niveles y *oxyR* no se expresa en ninguna de las cepas en las condiciones probadas.

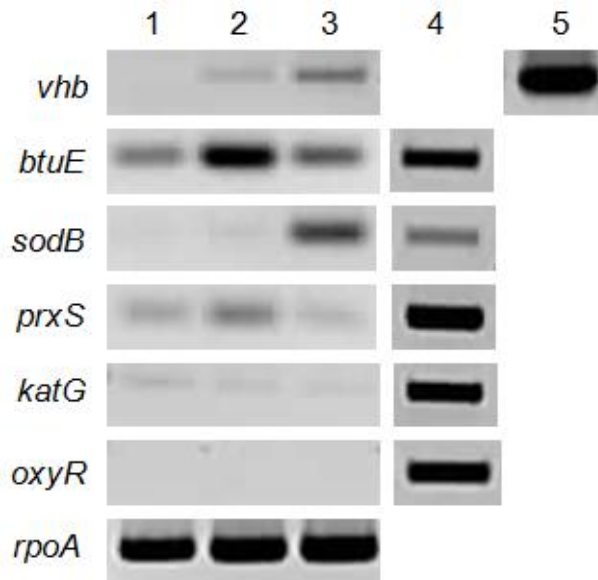


Figura 5.5. Análisis transcripcional de genes de *R. etli* en presencia de la globina *vhb*. CE3 WT (1), CE3::*vhb*- Ω Sp (2), CE3/pTR101::*vhb* (3), DNA CE3 (4) y DNA TOPO::*vhb* (5). El gen *rpoA* es usado como control.

6.4 Efecto de Vhb en la sobrevivencia de *R. etli* en presencia de un generador de óxido nítrico

Para evaluar si la presencia de Vhb protege a *R. etli* del estrés nitrosativo, las cepas de que expresan *vhb* se cultivaron en 1% de oxígeno (Materiales y métodos, 4.5) en presencia de 300 μ M de nitroprusiato de sodio (SNP, Sigma-Aldrich). El SNP es un agente donador de óxido nítrico que reacciona en la membrana celular de las bacterias afectando su integridad y provocando lisis celular. En *R. etli*, la reductasa de óxido nítrico NorC ha sido reportada como la enzima encargada de destoxificar a la bacteria de NO. La expresión de esta reductasa, es regulada por el regulador NnrR en respuesta a bajas concentraciones de oxígeno y a la presencia de un óxido de nitrógeno (Gómez-Hernández et al., 2011)

El crecimiento microaeróbico de las cepas de *R. etli* que expresan el gen *vhb* y la silvestre es similar tanto en condiciones control como en presencia de SNP (Figura 5.6).

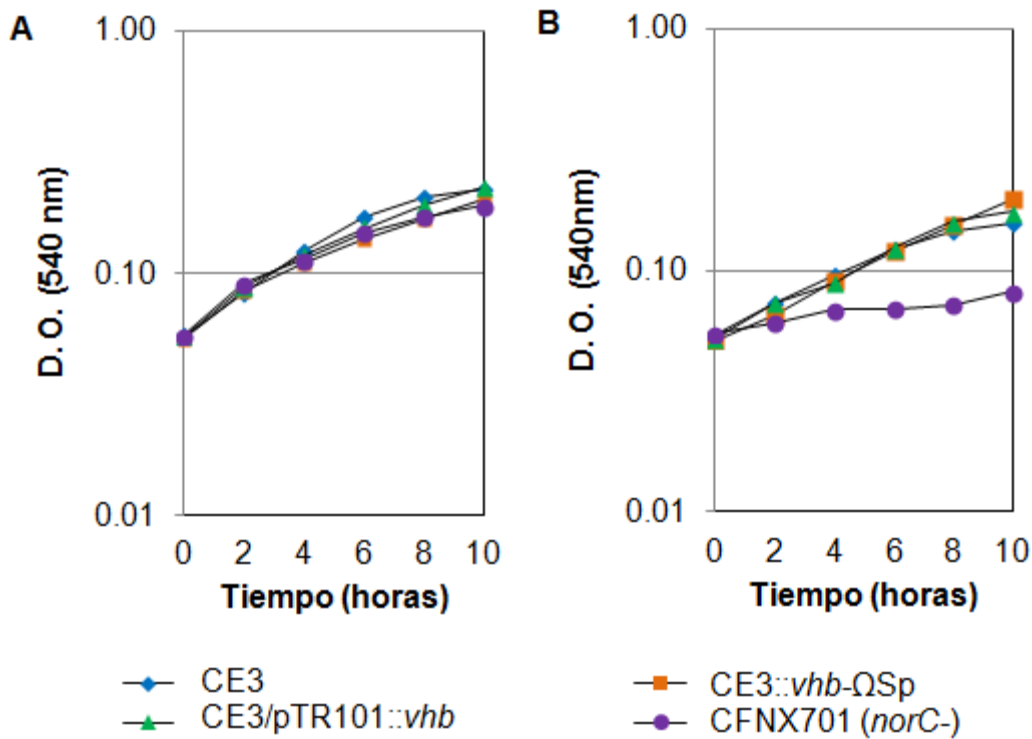


Figura 5.6. Efecto del nitroprusiato de sodio (SNP) en el crecimiento microaeróbico de las cepas de *Rhizobium etli*. Las células fueron cultivadas en medio mínimo a 30°C por 10 h (A), y fue modificado con 300 μ M de SNP (B). Los resultados son el promedio de tres experimentos independientes.

6.5 Análisis fenotípico de plantas de frijol inoculadas con cepas de *R. etli* que expresan el gen de *vhb* en condiciones de estrés nitrosativo

Previamente, Gómez-Hernández y col. (2011) reportaron que en *R. etli* CE3, la producción de NO a partir de NO₃ y NO₂ afecta la simbiosis de esta bacteria con plantas de frijol. Observaron que plantas de frijol inoculadas con una cepa que acumula nitrito y no produce óxido nítrico (mutante en el gen *nirK*, que codifica para la nitrito reductasa) son más resistentes al estrés nitrosativo cuando estas son regadas con nitrato. En este trabajo analizamos si la presencia de Vhb en *R. etli* modifica la respuesta simbiótica de la bacteria. Para esto, plantas de frijol fueron inoculadas con las cepas *R. etli* CE3 silvestre, *R. etli*::*vhb*-ΩSp, *R. etli*/pTR101::*vhb* y CFNX702 (*nirK*). A los 14 días de post-inoculación, se les aplicó el estrés nitrosativo con 4 mM de KNO₃. Después de 12 días, se analizó la expresión del gen *vhb* en los nódulos formados por las cepas *R. etli*::*vhb*-ΩSp y *R. etli*/pTR101::*vhb* (Figura 5.7). La ausencia del transcrito del gen *vhb* en los

nódulos indica que el plásmido pTR101::*vhb* se perdió durante el experimento de simbiosis. Por lo que, esta cepa quedó excluida de los análisis de fenotipo simbiótico y expresión de genes en el nódulo. En las plantas cultivadas en presencia y ausencia de KNO₃ e inoculadas con las cepas *R. etli* CE3 silvestre, *R. etli*::*vhb*-ΩSp, y CFNX702 (*nirK*), se determinó el número (NN) y peso seco de nódulo (PSN), peso seco de planta (PSP) y el contenido de Lb.

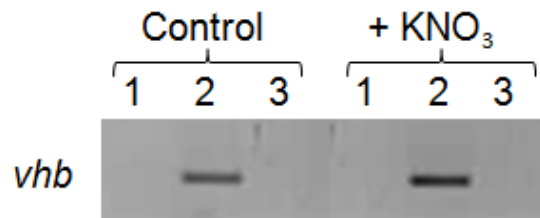


Figura 5.7. Análisis de expresión del gen *vhb* en *R. etli* CE3 (1), CE3::*vhb*-ΩSp (2), CE3/pTR101::*vhb* (3).

Nuestros resultados indican que no existen diferencias significativas en el NN formados por las diferentes cepas y que este parámetro tampoco se ve afectado por la presencia de NO₃ (Figura 5.8A). La presencia de NO₃ afecta negativamente el PSN en las plantas inoculadas con la cepa silvestre y *R. etli*::*vhb*; mientras que las plantas inoculadas con la mutante *nirK* este efecto negativo no se observa. Este resultado indica que, como se había reportado anteriormente, la acumulación de nitrito es menos dañina que la producción de NO por la nitrito reductasa. Interesantemente, la presencia de *vhb* en la bacteria no solamente no alivia de este daño a la simbiosis frijol – *Rhizobium* sino que parece tener un efecto negativo aún en condiciones control (Figura 5.7B). La ausencia del gen *nirK* resulta en un incremento en el peso seco de la planta (Figura 5.7C) y en el mejor funcionamiento del nódulo, evaluado este por el contenido en leghemoglobina (Figura 5.7D). El contenido de Lb de las tres cepas disminuye significativamente en presencia de KNO₃, siendo la cepa con *vhb* la más afectada en condiciones de estrés (Figura 5.7D).

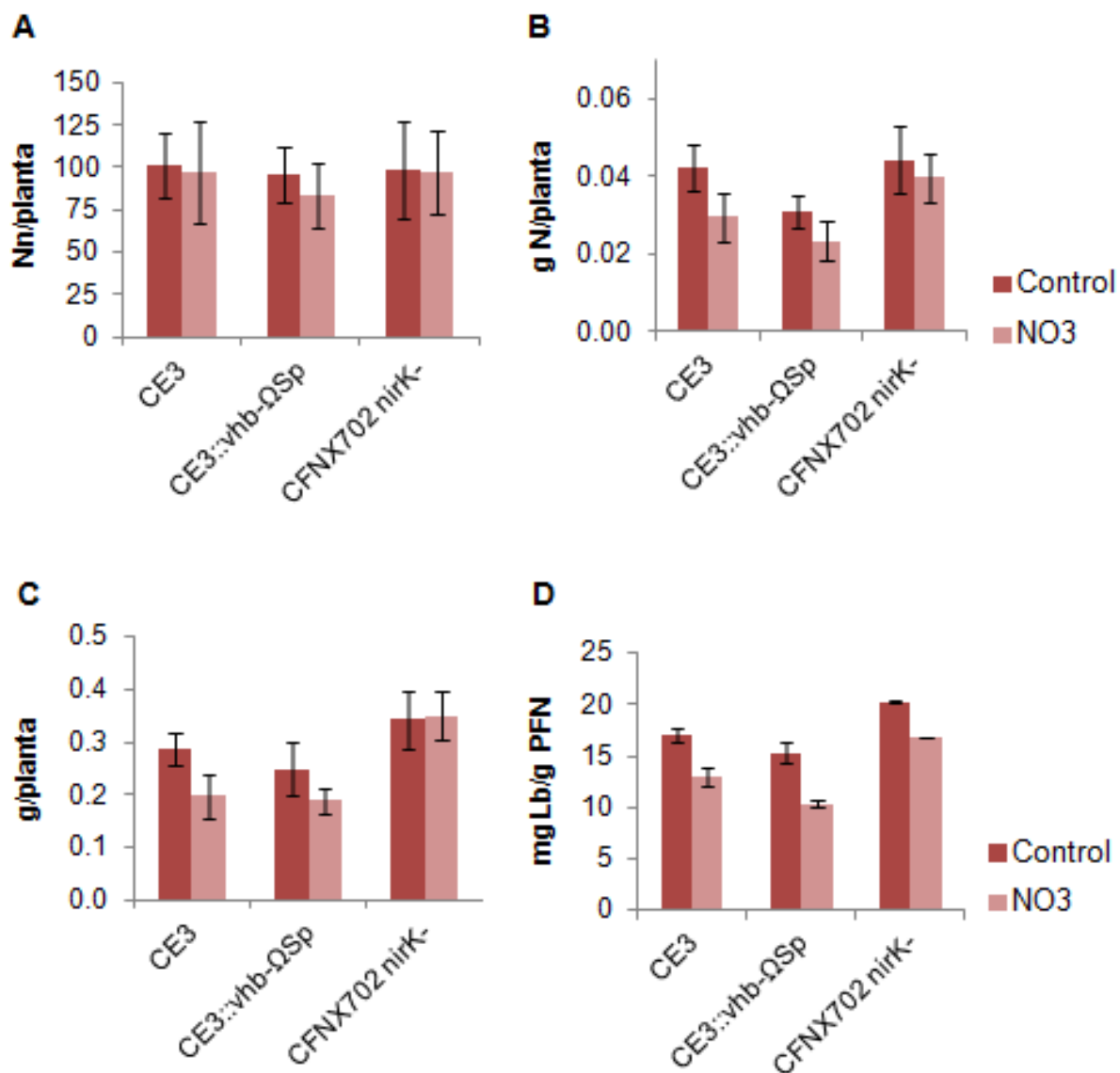


Figura 5.8. Análisis de la eficiencia simbiótica de cepas de *R. etli* silvestre, Vhb y NirK⁻. (A) Número de nódulos (NN), (B) peso seco de nódulo (PSN), (C) peso seco de planta (PSP) y (D) contenido de leghemoglobina (Lb) en nódulos de frijol formados por las cepas de *Rhizobium etli* CE3, CE3::vhb-ΩSp y CFN702 (*nirK*⁻). Se grafican los valores promedio \pm DS de 8 número de plantas de 1 experimentos independientes.

6.6 Efecto de la presencia de la globina Vhb en *R. etli* en la expresión de genes implicados en la respuesta al estrés en condiciones simbióticas.

La expresión de genes bacterianos relacionados con la respuesta a estrés fue analizada en nódulos de frijol por RT-PCR. Después de 12 días de estrés nitrosativo

con NO_3 , se purificó RNA de nódulos formados por las cepas de *R. etli::vhb-ΩSp* y CE3 silvestre (Materiales y métodos 4.7.12) y se compararon los niveles de expresión entre ellas. La expresión de *prxS* fue inducido en presencia de estrés nitrosativo tanto en la silvestre como en *R. etli::vhb*. Mientras que, la expresión de *btuE* y *katG* disminuye en condiciones de estrés. En la cepa silvestre, *oxyR* se expresa en condiciones control pero su expresión disminuye en condiciones de estrés, y en *R. etli::vhb* no se expresa. Bajo las condiciones estudiadas, *sodB* no se expresa en ambas cepas (Figura 5.9).

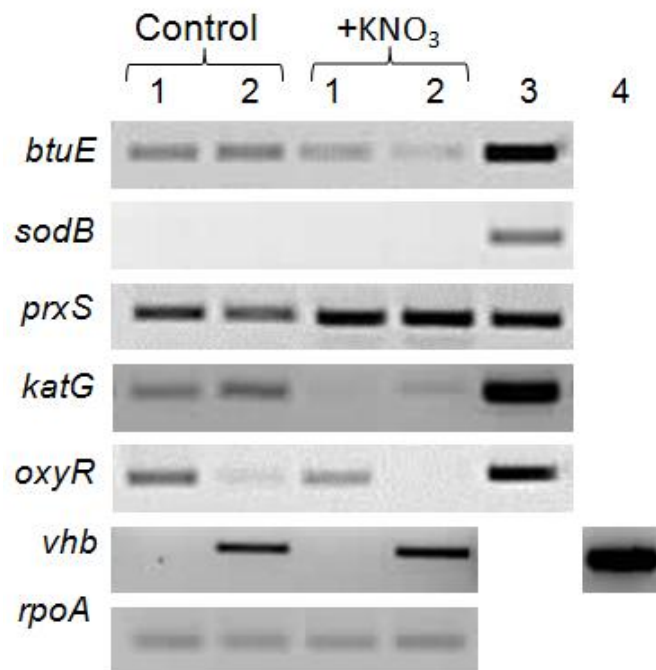


Figura 5.9. Análisis de expresión en nódulo de genes de *R. etli* en presencia de la globina *vhb* en condiciones control y de estrés nitrosativo (+KNO₃). CE3 WT (1), CE3::*vhb-ΩSp* (2), DNA CE3 (3) y DNA TOPO::*vhb* (4). El gen *rpoA* es usado como control.

6.7 Sensibilidad a rayos UV de las cepas de *R. etli* que expresan el gen *uvrA*

Como se mencionó en la introducción, UvrA está involucrada en la reparación del DNA por daños causados por rayos UV. Por lo tanto, como una parte adicional de los objetivos de este trabajo, y dado que el plásmido utilizado en el estudio realizado por Ramírez y col. contiene también el gen *uvrA*, evaluamos el efecto de los rayos UV sobre la viabilidad de las cepas *R. etli* que expresan este gen.

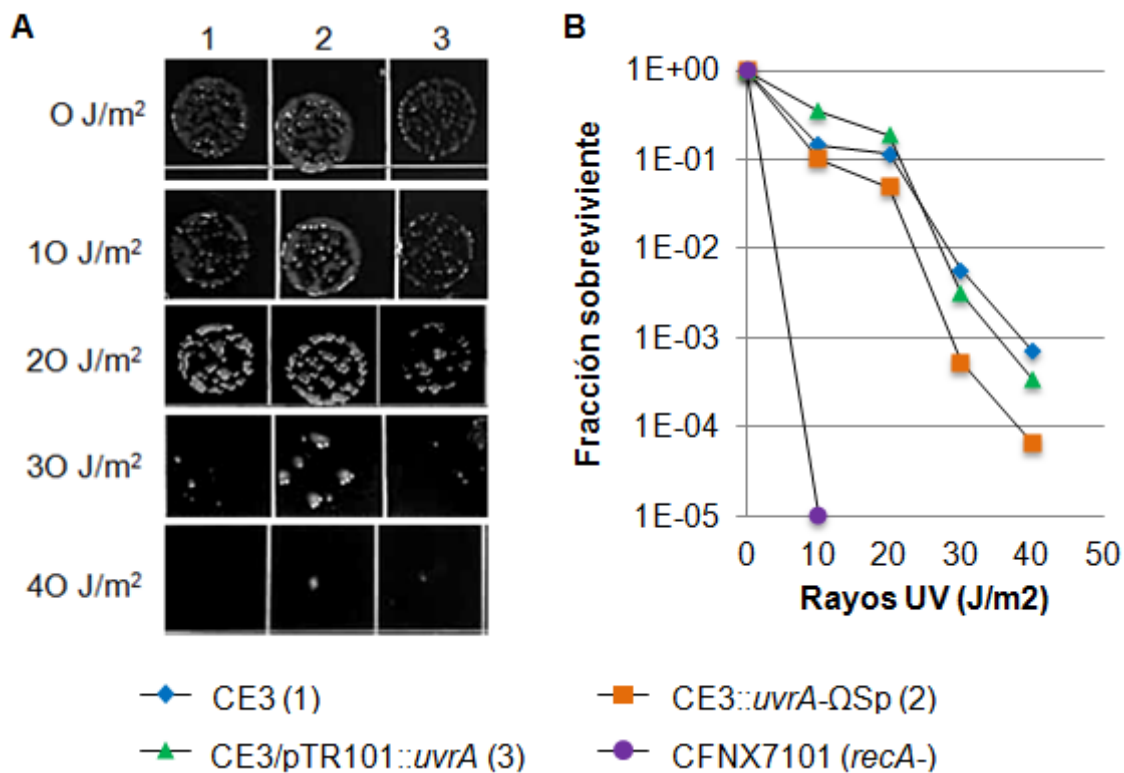


Figura 5.10. Sensibilidad de las cepas de *Rhizobium etli* a rayos UV. A) Representación de las placas después del tratamiento. Las células fueron diluidas 1×10^5 veces. B) La fracción sobreviviente es el número de células viables después del tratamiento con rayos UV dividido por el número de células viables sin tratamiento. Los datos son el promedio de tres experimentos independientes con tres repeticiones cada una. La cepa CFNX101 fue usado como control negativo del experimento.

A partir de cultivos crecidos en condiciones aeróbicas en medio PY hasta una DO_{540} de 0.8, se prepararon diluciones seriadas en $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 10mM Tween 0.01%. Se tomaron alícuotas de 25 μ l de las diluciones seriadas y se sembraron en placas de Petri con medio PY sólido. Las bacterias fueron expuestas a diferente intensidad de radiación UV en el aparato cross-linker UVC500 (Hoefer Scientific Instruments) y fueron incubadas a 30°C en oscuridad.

Después de dos días de incubación, observamos que las bacterias que fueron expuestas a intensidades de 0, 10 y 20 J/m^2 no se vieron afectadas en su crecimiento. Sin embargo, a 30 J/m^2 las colonias formadas por las cepas silvestre y *R.*

etli/pTR101::*uvrA* son más pequeñas que las formadas por *R. etli*::*uvrA*-ΩSp. A 40 J/m², resultó letal para las tres cepas estudiadas (Figura 5.10A).

Posteriormente, se contaron las colonias y se calculó la fracción sobreviviente (Figura 5.10B). Nuestros resultados muestran que la presencia del gen *uvrA* de *Vitreoscilla* no modifica la resistencia a rayos UV de *R. etli*. Sorpresivamente, la cepa *R. etli*::*uvrA*-ΩSp presentó una mayor sensibilidad a los rayos UV en comparación con la cepa que lleva el plásmido pTR101::*uvrA* y la cepa silvestre.

7. Discusión

La fijación simbiótica de nitrógeno se ve afectada por la presencia de RNS que causa estrés nitrosativo afectando procesos metabólicos como la actividad de la nitrogenasa. Recientemente, se ha encontrado que la presencia de la hemoglobina de *Vitreoscilla*, VHb, confiere protección ante la presencia de RNS cuando se expresa heterológicamente como *E. coli* (Frey et al, 2002; Kaur et al, 2002). En *R. etli* CE3 se encontró que las cepas que llevan un plásmido con VHb tienen una mayor tasa de respiración y un aumento en la actividad de la nitrogenasa en condiciones control (Ramírez et al, 1999). Datos no publicados por el Dr. Ramírez indican que la presencia de VHb promueve la tolerancia a estrés oxidativo de la simbiosis frijol-*Rhizobium* (comunicación personal). Con estos antecedentes, este trabajo tuvo como objetivo principal el definir si la globina VHb de *Vitreoscilla* tiene un papel protector en *R. etli* CE3 ante la presencia de óxidos de nitrógeno.

En *E. coli*, el crecimiento de una cepa que expresa la hemoglobina VHb promueve la tolerancia a RNS. No obstante, al evaluar la actividad de reducción de NO en un ensayo *in vitro* no se observó una diferencia significativa entre la cepa silvestre y la que expresa *vhb* en *E. coli* (Frey et al, 2002). Esto puede deberse a que la proteína VHb no contiene el dominio reductasa que contienen las flavohemoglobinas. Kaur y cols. (2002) analizaron la resistencia a SNP en células de *E. coli* que expresan *vhb* y *vhb-r*, que tiene asociado un dominio reductasa de la flavohemoglobina de *Ralstonia eutropha* (VHb-R). Demostraron que ambas proteínas reducen la inhibición de la respiración causada por la presencia de NO y alivian el estrés nitrosativo en *E. coli*. Sin embargo, la asociación con el dominio reductasa en VHb-R confiere una mayor protección ante RNS (Kaur et al, 2002).

Nuestros resultados muestran que el crecimiento microaeróbico de *R. etli* tanto en condiciones control como en presencia de SNP es similar en las cepas que expresan *vhb* y en la silvestre. Por lo tanto, en estas condiciones la *vhb* de *Vitreoscilla* no le confiere una ventaja en la tolerancia a RNS. Considerando que en *R. etli* CE3: (a) las reductasas de nitrito (NirK) y de óxido nítrico (NorCB) son fundamentales en la destoxificación de óxidos de nitrógeno, tanto en vida libre como en simbiosis con plantas de frijol; y (b) que esta bacteria no codifica para una flavohemoglobina (Hmp), la

protección ante RNS en esta bacteria está cubierta en su totalidad por las enzimas Nir y Nor. O bien, que se requiere de un dominio reductasa adicional fusionado a VHb (como en el caso del estudio de VHb-R) para proteger del estrés nitrosativo a *R. etli*. Se ha encontrado que las flavohemoglobinas participan en la detoxificación por RNS en varias bacterias. Las flavohemoglobinas de *Bacillus subtilis*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella entérica* serovar Typhi y *Pseudomonas aeruginosa* tienen una alta actividad de degradación de NO *in vitro* y al igual que VHb promueve la tolerancia a RNS *in vivo* (Frey et al, 2002).

Por otra parte, y dado que se ha reportado que el promotor de *vhb* no responde ni a ROS ni a RNS (Frey et al, 2003b), este resultado podría indicar que en la expresión de este gen participa un regulador transcripcional que responda a este tipo de señales del medio ambiente y a través de él activar la expresión de *vhb*. En *R. etli*, la respuesta a la presencia de RNS está regulada por NnrR, cuya expresión depende del regulador maestro FixKf (Gómez-Hernández et al, 2011). Ambos reguladores pertenecen a la familia CRP/Fnr, los cuáles se unen a secuencia conocidas como cajas de anaerobiosis (TTGAT-N4-ATCAA) en las regiones reguladoras de sus genes blanco (Bobik et al 2006; Mesa et al, 2008). Nuestros resultados muestran que la expresión de *vhb* en nódulos no se induce en presencia de RNS, lo que podría indicar que la cantidad de VHb es limitada y no es suficiente para ayudar a la bacteria a responder mejor contra los óxidos de nitrógeno producidos en el nódulo por la presencia de KNO₃, ya que no puede ser activada por NnrR.

En *E. Coli*, Anand y colaboradores (2010) demostraron que los reguladores Fnr y OxyR interactúan con la región reguladora de *vhb*. Los sitios de unión de cada regulador están sobrelapados y se propone que OxyR interactúa con el promotor de *vhb* en ausencia de Fnr. También se ha observado que la presencia de VHb induce la expresión de genes regulados por OxyR, como *katG* y *sodA*. Estos genes participan en la respuesta bacteriana al estrés oxidativo, indicando que en estas condiciones, OxyR participa en la mediación del efecto protector de VHb (Anand et al, 2010). Estos autores sugieren que VHb podría estar regulando otros genes encargados en la respuesta a estrés. En nuestras construcciones, el posible sitio de pegado de OxyR en la región reguladora de *vhb* no está presente. Por lo tanto, VHb podría estar activando a OxyR

con la subsecuente inducción de genes antioxidantes. Aquí observamos que en *R. etli*, la expresión de *vhb* en vida libre induce la expresión de los genes *btuE*, *sodB* y *prxS*, mientras que la expresión de *katG* y *oxyR* no se observa. En simbiosis, el patrón de expresión de los genes *btuE*, *sodB*, y *prxS* se mantiene igual independientemente de la presencia de *vhb*. No obstante en presencia del gen *vhb* en *R. etli*, *oxyR* no se expresa en nódulos y *katG* es reprimida por el estrés nitrosativo, mientras que *prxS* es inducida en condiciones de estrés nitrosativo. Resultados similares fueron reportados en condiciones de estrés oxidativo. En bacteroides de *R. etli* CE3 bajo condiciones de estrés oxidativo la expresión de *katG* es nula y se demostró por análisis proteómicos la expresión de peroxirredoxinas (Vargas et al, 2003). *katG* es una catalasa-peroxidasa que participa en la desintoxicación de ROS en vida libre y *prxS* se expresa en condiciones de estrés oxidativo (Vargas et al, 2003) y nitrosativo (este trabajo) en bacteroides de *R. etli* CE3. Por lo tanto, el papel protector de la proteína VHb al estrés en distintos huéspedes heterólogos es diferente. En *R. etli* no participa en la regulación de la expresión de genes implicados en la respuesta a estrés como en *E. coli*.

Como se mencionó anteriormente, en un trabajo previo se reportó que en *R. etli* la presencia de un plásmido que lleva los genes *vhb-uvrA* provoca un aumento en la eficiencia respiratoria y el contenido energético de la bacteria en condiciones de vida libre. Y en simbiosis se observa un incremento en la actividad de la nitrogenasa, en el contenido de nitrógeno y en el peso seco de planta (Ramírez et al, 1999). Sin embargo, en este trabajo observamos, que la presencia de *vhb* en la cepa no le confiere ninguna ventaja en vida libre, y que en simbiosis su presencia afecta negativamente este proceso. Esta diferencia en resultados podría ser explicada por la ausencia del gen *uvrA* en nuestras cepas, y que en conjunto ambas proteínas, UvrA y VHb, pudieran estar interactuando y dar como resultado el efecto positivo reportado.

8. Conclusión general

El análisis de los resultados de este trabajo nos permiten sugerir que *R. etli* CE3 cuenta con la maquinaria suficiente y bajo un estricto control transcripcional para contender con el estrés nitrosativo y la exposición a rayos UV tanto en vida libre como en simbiosis.

9. Perspectivas

Experimentos adicionales deben ser realizados con el propósito de entender los mecanismos de regulación que participan en *R. etli* en presencia de las proteínas heterólogas Vhb y UvrA.

- 1) Nuevas construcciones que contengan la región reguladora de *vhb* completa, con los posibles sitios de unión de los reguladores OxyR y Fnr.
- 2) Analizar la expresión de *vhb* en mutantes de *R. etli* en los reguladores tipo Fnr presentes en la bacteria.
- 3) Determinar por medio de ensayos de movilidad electroforética si alguno(s) de los reguladores tipo Fnr presentes en *R. etli* se une(n) a la región reguladora de *vhb*.
- 4) Realizar experimentos en cepas *R. etli::vhb-uvrA*.
- 5) Construir plásmidos de complementación que expresen reguladamente o constitutivamente *vhb* de *Vitreoscilla* para evaluar si esta proteína es capaz de sustituir a las reductasas responsables de detoxificar de RNS en *R. etli*.

10. Bibliografía

Anand, A., Duk, B. T., Singh, S., Akbas, M. Y., Webster, D. A., Stark, B. C., y Dickshit, K. L. (2010). Redox-mediated interactions of VHb (*Vitreoscilla* haemoglobin) with OxyR: novel regulation of Vhb biosynthesis under oxidative stress. *Biochemical Journal*. Vol. 426, no. 3, pp. 271-280.

Bao Y., Lies, D.P., Fu, H., Roberts, G.P. (1991). An improved Tn7-based system for the single-copy insertion of cloned genes into chromosomes of gram-negative bacteria. *Gene*. Vol. 1, pp. 167-168.

Baudouin, E., Pieuchot, L., Engler, G., Pauly, N., Puppo, A. (2006). Nitric Oxide Is Formed in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium meliloti* Functional Nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 19, no. 9, pp.970-975.

Baudouin, E., Pauly, N., Puppo, A. (2007). Nitric Oxide in Nitrogen-Fixing Symbiosis. *Plant Cell Monographs*. Vol. 5, pp. 173-186.

Becana, M., Dalton, D. A., Moran, J. F., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M. A., Rubio, M. C. (2000). Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. *Physiologia Plantarum*. Vol. 109, pp. 372-381.

Becana, M., Moran, J.F., Iturbe-Ormaetxe, I. (1994). Structure and function of leghemoglobins. *Anales de la Estación Experimental de Aula Dei*. Vol. 21, pp. 203-208.

Becana, M., y Klucas, R. (1992). Oxidation and Reduction of Leghemoglobin in Root Nodules of Leguminous Plants. *Plant Physiology*. Vol. 98, pp. 1217-1221.

Bedmar, E. J., Robles, E. F., Delgado, M. J. (2005). The complete denitrification pathway of the symbiotic, nitrogen-fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemical Society Transactions*. Vol. 33, parte 1, pp. 141-144.

Bobik, C., Meilhoc, E., BAut, J. (2006). FixJ: a major regulator of the oxygen limitation response and late symbiotic functions of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 188, pp. 4890-4902.

Cam, Y., Pierre, O., Boncompagni, E., Hérouart, D., Meilhoc, E., y Bruand, C. (2012). Nitric Oxide (NO): a key player in the senescence of *Medicago truncatula* roots nodules. *New Phytologist*. Vol. 196. Pp. 548-560.

Cappa, F., Cattivelli, D., Cocconcelli, P. S. (2005). The *uvrA* gene is involved in oxidative and acid stress responses in *Lactobacillus helveticus* CNBL1156. *Research in Microbiology*. Vol. 156, pp. 1039-1047.

Choi, K.H., Gaynor, J.B., White, K.G., Lopez, C., Bosio, C.M., Karkhoff-Schweizer, R.A.R., Schweizer, H.P. (2005). A Tn7-based broad-range bacterial cloning and expression system. *Nature Methods*. Vol. 2, no. 6, pp. 443-448.

de Lorenzo, C., Iannetta, P. P. M., Fernández-Pascual, M., James, E. K., Lucas, M. M., Sprent, J. I., Witty, J. F., Minchin, F. R., de Felipe, M. R. (1993). Oxygen Diffusion in Lupin Nodules. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 44, no. 266, pp. 1469-1474.

Delgado, M. J., Bedmar, E. J., y Downie, J. A. (1998). Genes Involved in the Formation and Assembly of Rhizobial Cytochromes and their Role in Symbiotic Nitrogen Fixation. *Advances in Microbial Physiology*. Vol. 40. Pp. 191-231.

Dixon, R., y Kahn, D. (2004). Genetic Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *Nature Reviews: Microbiology*. Vol. 2, pp. 621-631.

Fahreus, G. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple gas slide technique. *Journal of General Microbiology*. Vol. 16., pp. 374-391.

Fellay, R., Frey, J., Krisch, H. (1987). Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of gram-negative bacteria. *Gene*. Vol. 52, pp. 147-154.

Ferrarini, A., De Stefano, M., Baudouin, E., Pucciariello, C., Polverani, A., Puppo, A., Delledonne, M. (2008). Expression of *Medicago truncatula* Genes Responsive to Nitric Oxide in Pathogenic and Symbiotic Conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. Vol. 21, No. 6, pp. 781-790.

Figurski, D. H., y Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in *trans*. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. Vol. 76, pp. 1648-1652.

Frey, A.D., Kallio, P.T. (2003a). Bacterial hemoglobins and flavohemoglobins: versatile proteins and their impact on microbiology and biotechnology. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Reviews*. Vol. 27, pp. 525-545.

Frey, A.D., Koskenkorva, T., Kallio, P.T. (2003b). *Vitreoscilla* hemoglobin promoter is not responsive to nitrosative and oxidative stress in *Escherichia coli*. *Federation of European Microbiological Societies, Microbiology Letters*. Vol. 224, pp. 127-132.

Frey, A. D., Farrés, J., Bollinger, C. J. T., y Kallio, P. T. (2002). Bacterial Hemoglobins and Flavohemoglobins for Alleviation of Nitrosative Stress in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, no. 10, pp. 4835-4840.

Gage, D. J. (2004) Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Bacteria during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 68, No. 2, pp. 280-300.

Geckil, H., Gencer, S., Kahraman, H., Erenler, S.O. (2003). Genetic engineering of *Enterobacter aerogenes* with the *Vitreoscilla* hemoglobin gene: cell growth, survival, and antioxidant enzyme status under oxidative stress. *Research in Microbiology*. Vol. 154, pp. 425-431.

Girard, L., Brom, S., Dávalos, A., López, O., Soberón, M., y Romero, D. (2000). Differential regulation of *fixN*-reiterated genes in *Rhizobium etli* by a novel *fixL*-*fixK* cascade. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 13, pp. 1283:1292.

Gómez-Hernández, N., Reyes-González, A., Sánchez, C., Mora, Y., Delgado, M. J., Girard, L. (2011). Regulation and Symbiotic Role of *nirK* and *norC* Expression in *Rhizobium etli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 24, no. 2, pp. 233-245.

González, V., Santamaría, R. I., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Chandra Janga, S., Ramírez, M. A., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J., y Dávila, G. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interacting replicons. *PNAS*. Vol. 2003. No. 10, pp. 3834-3839.

Granados-Baeza, M.J., Gómez-Hernández, N., Mora, Y., Delgado, M.J., Romero, D., Girard, L. (2007). Novel Reiterated Fnr-Type Proteins Control the Production of the Symbiotic Terminal Oxidase *cbb₃*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. Vol. 20, no. 10, pp. 1241-1249.

Halbleib, C. M., y Ludden, P. W. (2000). Regulation of Biological Nitrogen Fixation. *The journal of Nutrition*. Pp. 1081-1084

Hardy, P., y Chaconas, G. (2013). The Nucleotide Excision Repair System of *Borrelia burgdorferi* Is the Sole Pathway Involved in Repair of DNA Damage by UV light. *Journal of Bacteriology*. Vol. 195, no. 10, pp. 2220-2231.

Hernández-Urzúa, E. y Membrillo-Hernández, J. (2004). Genética molecular de las hemoglobinas bacterianas: estructura, regulación y función. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. Vol. 7, no. 2, pp. 67-75.

Holloway, P., McCormick, W., Watson, R.J., Chan, Y. (1996). Identification and Analysis of the Dissimilatory Nitrous Oxide Reduction Genes, *nosRZDFY*, of *Rhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*. Vol. 178, no. 6, pp. 1505-1514.

Horchani, F., Prévot, M., Boscari, A., Evangelisti, E., Meilhoc, E., Bruand, C., Raymond, P., Conbompagni, E., Aschi-Smith, S., Puppo, A., y Brouquisse, R. (2011). Both Plant and Bacterial Nitrate Reductases Contribute to Nitric Oxide Production in *Medicago truncatula* Nitrogen-Fixing Nodules. *Plant Physiology*. Vol. 155, pp. 1023-1036.

Humann, J. L., Ziemkiewicz, H. T., Yurgel, S. N., Kahn, M. L. (2009). Regulatory and DNA Repair Genes Contribute to the Desiccation Resistance of *Sinorhizobium meliloti* Rm1021. *Applied and environmental microbiology*. Vol. 75, no.2, pp. 446-453.

Hynes, M.F. & McGregor, N.F. (1990). Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary for formation of nitrogen-fixing nodules by *Rhizobium leguminosarum*. *Mol Microbiol*. Vol. 4, pp. 567-574.

Ianetta, P. P. M., James, E. K., Sprent, J. I., y Minchin, F. R. (1995). Time-course of changes involved in the operation of the oxygen diffusion barrier in white lupin nodules. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 46, no. 286. Pp. 565-575.

Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E., Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol*. Vol. 5, no. 8, pp. 619-633.

Kanayama, Y., Watanabe, I., Yamamoto, Y. (1990). Inhibition of Nitrogen Fixation in Soybean Supplied with Nitrate I. Nitrite Accumulation and Formation of Nitrosylhemoglobin in Nodules. *Plant Cell Physiology*. Vol. 31, no. 3, pp. 341-346.

Kassaw, T., y Frugoli, J. (2013). Journey of Nodule Formation: From Molecular Dialogue to Nitrogen Fixation. En: R. Aroca, *Symbiotic Endophytes* (pp. 3-25). Springer

Kato, K., Kanahama, K., Kanamaya, Y. (2010). Involvement of nitric oxide in the inhibition of nitrogenase activity by nitrate in *Lotus* root nodules. *Journal of Plant Physiology*. Vol. 167, pp. 238-241.

Kaur, R., Pathania, R., Sharma, V., Mande, S. C., y Drkshit, K. (2002). Chimeric *Vitreoscilla* Hemoglobin (VHb) Carrying a Flavoreductase Domain Relieves Nitrosative Stress in *Escherichia coli*: New Insight into the Functional Role of VHb. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 68, no. 1, pp. 152-160.

Kessler, B., de Lorenzo, V., Timmis, K. N. (1992). A general system to integrative *lacZ* fusions into the chromosomes of gram negative eubacteria: regulation of *Pm* promoter in the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Molecular Genetics and Genomics*. Vol. 233, pp. 293-301.

Kirchman, D. L. (2012). The Nitrogen Cycle. En D. L. Kirchman, *Processes in Microbial Ecology* (pp. 217-220). New York: Oxford University Press.

LaRue, T. A. y Child, J. J. (1979). Sensitive fluorometric assay for leghaemoglobin. *Analytical Biochemistry*. Vol. 92, pp. 11-15.

Layzell, D. B., y Hunt, S. (1990). Oxygen and the regulation of nitrogen fixation in legume nodules. *Physiologia Plantarum*. Vol. 80, pp. 322-327.

Maiti, D., Sarkar, T. S., Ghosh, S. (2012). Detection of S-Nitrosothiol and Nitrosylated Proteins in *Arachis hypogaea* Functional nodule: Response of the Nitrogen Fixing Symbiont. PLOS ONE. Vol. 7, no. 9.

Marino, D., González, E. M., Arrese-Igor, C. (2006). Drought effects on carbon and nitrogen metabolism of pea nodules can be mimicked by paraquat: evidence for the occurrence of two regulatory pathways under oxidative stresses. Journal of Experimental Botany. Vol. 57, no. 3, pp. 665-673.

Martinez-Salazar, J.M., Romero, D., Girard, L., Dávila, G. (1991). Molecular cloning and characterization of the *recA* gene of *Rhizobium phaseoli* and construction of *recA* mutants. Journal of Bacteriology. Vol. 173, pp. 3035-3040.

Meakin, G.E., Bueno, E., Jepson, B., Bedmar, E.J., Richardson, D.J., Delgado, M.J. (2007). The contribution of bacteroidal nitrate and nitrite reduction to the formation of nitrosylhaemoglobin complexes in soybean root nodules. Microbiology. Vol. 153, pp. 411-419.

Meilhoc, E., Cam, Y., Skapski, A., y Bruand, C. (2010). The Response of Nitric Oxide of the Nitrogen-Fixing Symbiont *Sinorhizobium meliloti*. Molecular Plant-Microbe Interactions. Vol. 23, no. 6, pp. 748-759.

Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H.M., Hennecke, H. (2008). Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK2-FixK1 cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Bacteriology. Vol. 190, pp. 6568-6579.

Mesa, S., Ucurum, Z., Hennecke, H., y Fischer, H-M. (2005). Transcription Activation In Vitro by the *Bradyrhizobium japonicum* Regulatory Protein FixK₂. Journal of Bacteriology. Vol. 187, no. 10. Pp. 3329-3338.

Minchin, F. R., James, E. K., Becana, M. (2008). Oxygen Diffusion, Production of Reactive Oxygen and Nitrogen Species and Antioxidants in Legume Nodules. En M. J. Dilworth, E. K. James, J. I. Sprent y W. E. Newton, *Nitrogen-fixing Leguminous Symbiosis* (pp. 321-362). Dordrecht, Países Bajos: Springer.

Noel, K.D., Sánchez, A., Fernández, L., Leemans, J., Cevallos, M.A. (1984). *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. Journal of Bacteriology. Vol. 158, pp. 148-155.

Oldroyd, G. E. D., Murray, J. D., Poole, P. S., Downie, J. A. (2011). The Rules of Engagement in the Legume-Rhizobial Symbiosis. Annual Review of Genetics. Vol. 45, pp. 119-144.

Ott, T., van Dongen, J. T., Gunther, C., Krusell, L., Desbrosses, G., Vigeolas, H., Bock, V., Czechowski, T., Geigenberger, P., Udvardi, M. (2005) Symbiotic

Leghemoglobins are crucial for Nitrogen Fixation in Legume Root Nodules but Not for General Plant Growth and Development. *Current Biology*. Vol. 15, pp. 531-535.

Park, S., Lee, H., Cao, W. (2010). Screening of nitrosative stress resistance genes in *Coxiella burnetii*: Involvement of nucleotide excision repair. *Microbial Pathogenesis*. Vol. 49, pp. 323-329.

Peralta, H., Mora, Y., Salazar, E., Encarnación, S., Palacios, R., Mora, J. (2004). Engineering the *nifH* promoter region and abolishing poly- β -hydroxybutyrate accumulation in *Rhizobium etli* enhance nitrogen fixation in symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 70, pp. 3272-3281.

Preisig, O., Anthamatten, D., Hennecke, H. (1993). Genes for a microaerobically induced oxidase complex in *Bradyrhizobium japonicum* are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. Vol. 90, pp. 3309-3313

Puppo, A., Groten, K., Bastian, F., Carzaniga, R., Soussi, M., Lucas, M.M., de Felipe, M.R., Harrison, J., Vanacker, H., Foyer, C.H. (2005). Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signaling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist*. Vol. 165, pp. 683-701

Quinto, C., de la Vega, H., Flore, M., Fernández, L., Ballado, T., Soberón, G., Palacios, R. (1982). Reiteration of nitrogen fixation gene sequences in *Rhizobium phaseoli*. *Nature*. Vol. 299, pp. 724-726.

Ramírez, M., Guillén, G., Fuente, S. I., Iñiguez, L. P., Aparicio-Fabre, R., Zamorano-Sánchez, D., Encarnación-Guevara, S., Panzeri, D., Castiglioni, B., Cremonesi, P., Strozzi, F., Stella, A., Girard, L., Sparvoli, F., Hernández, G. (2013). Transcript profiling of common bean nodules subjected to oxidative stress. *Physiologia Plantarum*. Vol. 149, pp. 389-407.

Ramírez, M., Valderrama, B., Arredondo-Peter, R., Soberón, M., Mora, J., Hernández, G. (1999). *Rhizobium etli* Genetically Engineered for the Heterologous Expression of *Vitreoscilla* sp. Hemoglobin: Effects on Free-Living and Symbiosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. Vol. 12, No. 11, pp. 1008-1015.

Rees, D. C., y Howard, J. B. (2000). Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology*. Vol. 4, pp. 559-566.

Rhizobial taxonomy up-to-date (20 de enero del 2013). Recuperado el 23 de febrero del 2016, de <http://edzna.ccg.unam.mx/rhizobial-taxonomy/node/4>

Rossi, F., Khanduja, J. S., Bortoluzzi, A., Houghton, J., Sander, P., Guthlein, C., Davis, E.O., Springer, B., Bottger, E.C., Relini, A., Penco, A., Muniyappa, K., Rizzi, M. (2011). The biological and structural characterization of *Mycobacterium tuberculosis*

UvrA provides novel insights into its mechanism of action. *Nucleic Acids Research*. Vol. 39:16, pp. 7316-7328.

Sambir, M., Ivanova, L. B., Bryksin, A. V., Godfrey, H. P., Cabello, F. C. (2011). Functional analysis of *Borrelia burgdorferi uvrA* in DNA damage protection. *FEMS Microbiology Letters*. Vol. 317, no. 2, pp. 172-180.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA.

Sánchez, C., Gates, A. J., Meakin, G. E., Uchiumi, T., Girard, L., Richardson, D. J., Bedmar, E. J., Delgado, M. J. (2010). Production of Nitric Oxide and Nitrosylhemoglobin Complexes in Soybean Nodules in Response to Flooding. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. Vol. 23, no. 5, pp. 702-711.

Schweizer, H.P. (1994). A method for construction of bacterial hosts for lac-based cloning and expression vectors: alpha-complementation and regulation expression. *BioTechniques*. Vol. 17, no.3, pp. 452-456.

Stark, B., Dikshit, K.L., Pagilla, K.R. (2012). The biochemistry of *Vitreoscilla* hemoglobin. *Computational And Structural Biotechnology Journal*. Vol. 3, issue:4.

Stark, B. C., Dikshit, K L., Pagilla, K. R. (2011). Recent advances in understanding the structure, function, and biotechnological usefulness of the hemoglobin from the bacterium *Vitreoscilla*. *Biotechnology Letters*. Vol. 33, pp. 1705-1714.

Taiz, L. y Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal*. Castelló de la Plana: Publicacions de la Universitat Jaume I.

Talbi, C. (2011). *Nuevas estrategias para mejorar la fijación simbiótica de nitrógeno en Phaseolus vulgaris cultivada en suelos afectados por estreses abióticos*. (Tesis doctoral inédita). Facultad de Ciencias, Universidad de Granada.

Tjepkema, J. D., y Yocum, C. S. (1974). Measurement of Oxygen Partial Pressure within Soybean Nodules by Oxygen Microelectrodes. *Planta (Berl.)*. Vol. 119, pp. 351-360.

Toffanin, A., Wu, Q., Maskus, M., Casella, S., Abruña, H.D., Shapleigh, J.P. (1996). Characterization of the Gene Encoding Nitrite Reductase and the Physiological Consequences of Its Expression in the Nondenitrifying *Rhizobium "hedysari"* Strain HCNT1. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 62, no. 11, pp. 4019-4025.

Truglio, J.J., Croteau, D.L., Van Houten, B., Kisker, C. (2006). Prokaryotic Nucleotide Excision Repair: The UvrABC System. *Chemical Reviews*. Vol. 106:2, pp. 233-252.

VandenBosch, K. A., Bradley, D. J., Knox, J. P., Perotto, S., Butcher, G. W., Brewin, N. J. (1989). Common components of the infection thread matrix and the intercellular space identified by immunocytochemical analysis of pea nodules and uninfected roots. *The EMBO Journal*. Vol. 8, no. 2, pp. 335-342-

Vargas, M.C., Encarnación, S., Dávalos, A., Reyes-Pérez, A., Mora, Y., García-de los Santos, A., Brom, S., Mora, J. (2003). Only one catalase, *katG*, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology*. Vol. 149, pp. 1165-1176.

Wakabayashi, S., Matsubara, H., Webster, D. A. (1986). Primary sequence of a dimeric bacterial haemoglobin from *Vitreoscilla*. *Nature*. Vol 322, pp. 481-483

Wang, D., Yang, S., Tang, F., Zhu, H. (2012). *Cellular Microbiology*. Vol. 13, no. 3, pp. 334-342.

Wang, Z., Xiao, Y., Chen, W., Tang, K., Zhang, L. (2009). Functional expression of *Vitreoscilla* hemoglobin (VHb) in *Arabidopsis* relieves submergence, nitrosative, photo-oxidative stress and enhances antioxidants metabolism. *Plant Science*. Vol. 176, pp. 66-77.

Wei, X., y Chen, G. (2008). Applications of the VHb gene *vgb* for improved microbial fermentation processes. *Methods in Enzymology* Vol. 436, pp. 273-287.

Weinstein, M., Roberts, R.C., Helinski, D.R. (1992). A region of the broad-host-range plasmid RK2 causes stable in plant inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. *Journal of Bacteriology*. Vol. 174, pp. 7486-7489.

Yu, H., Sato, E. F., Nagata, K., Nishikawa, M., Kashiba, M., Arakawa, T., Kobayashi, K., Tamura, T., Inoue, M. (1997). Oxygen-dependent regulation of the respiration and growth of *Escherichia coli* by nitric oxide. *Federation of European Biochemical Societies. Letter* 409, pp. 161-165.

Zamorano-Sánchez, D., Reyes-González, A., Gómez-Hernández, N., Rivera, P., Georgellis, D., Girard, L. (2012). FxkR Provides the Missing Link in the *fixL-fixK* Signal Transduction Cascade in *Rhizobium etli* CFN42. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal*. Vol. 25, no. 11, pp. 1506-1517.

Zumft, W.G. (2002), Nitric Oxide Signaling and NO Dependent Transcriptional Control in Bacterial Denitrification by Members of the FNR-CRP Regulator Family. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Vol. 4, no. 3, pp. 277-286.

Zumft, W.G. (1997). *Cell Biology and Molecular Basis of Denitrification*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. Vol. 61, no. 4, pp. 533-616.

10. Resultados adicionales

Participó como coautora del artículo: Alma Reyes-González, Chouhra Talbi, **Susana Rodríguez**, Patricia Rivera, David Zamorano-Sánchez, Lourdes Girard. Expanding the regulatory network that controls nitrogen fixation in *Sinorhizobium meliloti*: elucidating the role of the two-component system hFixL-FxkR. March, 2016. Microbiology doi: 10.1099/mic.0.000284. (En prensa). Las actividades realizadas en este trabajo fueron la inoculación, cultivo y recolecta de material de experimento de simbiosis *S. meliloti*-*Medicago sativa* (alfalfa).

Abstract:

In *Sinorhizobium meliloti*, nitrogen fixation is regulated in response to oxygen concentration through the FixL-FixJ two-component system (TCS). Besides this conserved TCS, the field isolate SM11 also encodes the hFixL-FxkR TCS, which is responsible for the microoxic response in *Rhizobium etli*. Through genetic and physiological assays, we evaluated the role of the hFixL-FxkR TCS in *S. meliloti* SM11. Our results revealed that this regulatory system activates the expression of a fixKf orthologue (*fixKa*), in response to low oxygen concentration. Null mutations in either hFixL or FxkR promote upregulation of *fixK1*, a direct target of FixJ. Furthermore, the absence of this TCS translates into higher nitrogen fixation values as well as higher expression of *fixN1* in nodules. Individual mutations in each of the fixK-like regulators encoded in the *S. meliloti* SM11 genome do not completely abolish *fixN1* or *fixN2* expression, pointing towards redundancy among these regulators. Both copies of *fixN* are necessary to achieve optimal levels of nitrogen fixation. This work provides evidence that the hFixL-FxkR TCS is activated in response to low oxygen concentration in *S. meliloti* SM11 and that it negatively regulates the expression of *fixK1*, *fixN1* and nitrogen fixation.

11. Anexos

11.1 Abreviaturas

4-NQO	4-nitroquinolina 1-óxido	L	Litro
ADP	Adenosín difosfato	Lb	Leghemoglobina
ATP	Adenosín trifosfato	LB	Luria-bertani
BDO	Barrera de difusión del oxígeno	M	Mol
Cb	Carbemicina	mg	Miligramos
cDNA	DNA complementario	min	Minutos
CRP	Receptor de AMPc	MMY	Medio mínimo Y
CTE	Cadena de transporte de electrones	N	Normalidad
DEA/NO	Dietilamino/óxido nítrico	NAD(P)H	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato	Nal	Nalidíxico
dest	Destilada	nm	Nanometros
DNA	Ácido desoxirribonucleico	Nap	Reductasa de nitrato
DO	Densidad óptica	Nir	Reductasa de nitrito
EDTA	Acido etilendinitrilo tetra acético	Nor	Reductasa de oxido nítrico
FBN	Fijación biológica de nitrógeno	Nos	Reductasa de oxido nitroso
Fm	Fosfomicina	ox	Oxidado
FN	Factores de nodulación	pb	Pares de bases
FNR	Regulador de nitrato y fumarato	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
FSN	Fijación simbiótica de nitrógeno	pmol	Picomol
g	Gramos	PQ	Paraquat
J	Joules	PVPP	Polivinilpirrolidona
kb	Kilobase	red	Reducido
Km	Kanamicina	Rif	Rifampicina

RN	Reductasa de nitrato	SPER/NO	Espermina/oxido nitrico
RNA	Ácido ribonucleico	St	Estreptomicina
RNS	Especies reactivas de nitrógeno	Tc	Tetraciclina
ROS	Especies reactivas de oxigeno	TB	Tris-Boratos
rpm	Revoluciones por minuto	UFC	Unidad formadora de colonia
RT-PCR	Reversa transcriptasa-PCR	UV	Ultravioleta
SDS	Dodecil sulfato de sodio	V	Volts
seg	Segundos	VHb	Hemoglobina de <i>Vitreoscilla</i>
SNP	Nitroprusiato de sodio	vol	Volumen
SNAP	S-nitroso-N-acetilpenicilamina	μ	Microgramo
Sp	Espectinomicina	°C	Grados centigrad

11.2 Fórmulas químicas

Ca ⁺	Calcio	NaCl	Cloruro de sodio
CaCl ₂	Cloruro de calcio	NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
Ca ₂ Cl ₂	Dicloruro de calcio	NaH ₂ PO ₄	Bifosfato de sodio
CoCl ₂	Sulfato de cobalto	Na ₂ HPO ₄	Fosfato de disódico
CuSO ₄	Sulfato de cobre	Na ₂ MoO ₄	Molibdato sódico
Fe	Fierro	NaNO ₂	Nitrito de sodio
FeCl ₃	Cloruro de fierro	NaOH	Hidróxido de sodio
H ₂	Hidrogeno	NH ₄	Amonio
H ₃ BO ₃	Ácido bórico	NH ₄ Cl	Cloruro de amonio
H ₂ O	Agua	NO	Oxido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno	NO ₃ ⁻	Nitrato
K ₃ Fe(CN) ₆	Ferricianuro de potasio	NO ₂ ⁻	Nitrito
K ₂ HPO ₄	Fosfato dipotásico	N ₂ O	Oxido nitroso
KH ₂ PO ₄	Fosfato monopotásico	O ₂	Oxígeno
KNO ₃	Nitrato de potasio	O ₂ ⁻	Radical superóxido
MgSO ₄	Sulfato de magnesio	OH	Radical hidroxilo
MnSO ₄	Sulfato de manganeso	V	Vanadio
Mo	Molibdeno	ZnSO ₄	Sulfato de zinc
N ₂	Nitrógeno atmosférico		

11.3 Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepa o plásmido	Características	Referencia
Cepas		
<i>Rhizobium etli</i>		
CE3	Derivado de la cepa silvestre tipo CFN42 con resistencia a estreptomycin, Nal^{20}	Noel et al, 1984
CE3:: <i>vhb</i> - Ω Sp	Derivada de la CE3, con gen <i>vhb</i> (fragmento de 1.2 kb) y con resistencia a espectinomycin integrado en el cromosoma, $\text{Nal}^{20}\text{Sp}^{100}$	Este trabajo
CE3:: <i>uvrA</i> - Ω Sp	Derivada de la CE3, con gen <i>uvrA</i> (fragmento de 1.7 kb) y con resistencia a espectinomycin integrado en el cromosoma, $\text{Nal}^{20}\text{Sp}^{100}$	Este trabajo
CFNX101	Derivada de la CE3, <i>recA</i> ::Sp, Nal^{20}	Martínez-Salazar et al, 1991
CFNX701	Derivada de la CE3, <i>norC</i> ::loxPSp, $\text{Nal}^{20}\text{Sp}^{100}$	Gómez-Hernández et al, 2011
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17recA1endA1gyrA96 thi-1relA1	Sambrook et al, 1989
HPSI		Schweizer, 1994
Plásmidos		
pCR2.1TOPO	Vector de clonación de productos de PCR, Ap Km^{30} .	Invitrogen
TOPO:: <i>vhb</i> -H3	Deriva de pCR2.1TOPO, adicionado con gen <i>vhb</i> (fragmento de 1.2 kb), Km^{30}	Este trabajo
TOPO:: <i>vhb</i>	Deriva de pCR2.1TOPO, adicionado con gen <i>vhb</i> (fragmento de 1.2 kb), Km^{30}	Este trabajo
TOPO:: <i>uvrA</i>	Deriva de pCR2.1TOPO, adicionado con gen <i>uvrA</i> (fragmento de 2.3 kb), Km^{30}	Este trabajo
pHp45 Ω Sp		Fellay et al, 1987
pRK2013	Plásmido ayudador de conjugación, Km^{30}	Figurski y Helinski, 1979

pUX	Plásmido ayudador de transposición, Cb ¹⁰⁰	Bao et al, 1991
pRK600	Plásmido ayudador de transferencia, Cm ²⁵	Kessler et al, 1992
pTR101	Deriva del vector pTR100 (mini-RK2) con 0.8 kb “stability locus”, Tc ¹⁰	Weinstein et al, 1992
pTR101:: <i>vhb</i> -H3	Deriva de pTR101, adicionado con gen <i>vhb</i> (fragmento de 1.2 kb HindIII), Tc ¹⁰	Este trabajo
pTR101:: <i>uvrA</i>	Deriva de pTR101, adicionado con gen <i>uvrA</i> (fragmento de 1.7 kb HindIII-BamHI), Tc ¹⁰	Este trabajo
pUC18TminiTn7T	Deriva de pUC18-mini-Tn7. Contiene dos terminadores transcripcionales. Cb ¹⁰⁰	Choi et al, 2005
pUC18TminiTn7T:: <i>vhb</i> -ΩSp	Deriva de pUC18miniTn7 con gen <i>vhb</i> (fragmento de 1.2 kb EcoR1) y cassette de resistencia omega espectinomicina (HindIII), Sp ¹⁰⁰	Este trabajo
pUC18TminiTn7T:: <i>uvrA</i> -ΩSp	Deriva de pUC18miniTn7 con gen <i>uvrA</i> (fragmento de 2.3 kb EcoR1) y cassette de resistencia omega espectinomicina (HindIII), Sp ¹⁰⁰	Este trabajo

11.4 Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Nombre	Secuencia (5' → 3')
Up_VHb_Sph	AAATGCATGCTGTGGATTAAGTTTTAAG
Lw_VHb	GCAAACGCTACAACCGTGA
Up-VHbH3	GGCA <u>AAGCTT</u> CTGTGGATTAAGTT
Lw-VHb-H3	GCCA <u>AAGCTT</u> CTACAACCGTGAAA
Up-Uvra-R1	CCG <u>GAATTC</u> TTACACAGCAGCAGTTTTGGCT
LwVHbUvr-R1	GCT <u>GAATTC</u> GTGTACATGGCAAGC
Tn7-Glms	AATCTGGCCAAGTCGGTGAC
Tn7-RR109	CAGCATAACTGGACTGATTCAG
Up-RTVHb	ATCATCAAAGCCACTGTTCCCT
Lw-RTVHb	TCTGCAATCACGCCATAAGCC
Up-RTUvr	AGCGATTTACATTCCGGCACA
Lw-RTUvr	ACGCCTGCAAACAATTCACGA
UprpoA2RT	CCGATCGGCCTTATCCC
LqrpoA2RT	GTTTGCCGAACGGACCGACAG

Los sitios de restricción introducidos están subrayados. HindIII, AAGCTT; EcoRI, GAATTC.

11.5 Soluciones y medios de cultivo

11.5.1 Medios de cultivo

-Medio rico LB:

Peptona de caseína	10 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
NaCl	10 g/L.

Esterilizar en autoclave.

-Medio rico PY:

Peptona de caseína	5 g/L
Extracto de levadura	3 g/L.

Esterilizar en autoclave.

Al momento de utilizar el medio PY, suplementar con $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.007 M).

- CaCl_2 (0.7 M)

$\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	102.92/L
---	----------

Esterilizar en autoclave.

-MMY.

Acido succínico	1.18 g/L.
NH_4Cl	0.534 g/L.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1 g/L
K_2HPO_4	0.22 g/L.

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 5N y esterilizar en autoclave.

Al momento de utilizar el MMY, suplementar con $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.22%) y $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.0005%).

- CaCl_2 (100X)

$\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	2.2 g/0.1 L.
--	--------------

Esterilizar en autoclave.

- FeCl_3 (1000X)

$\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	5 g/L.
--	--------

Esterilizar por filtración.

11.5.2 Soluciones para purificación de plásmidos por lisis alcalina

-Solución I:

Dextrosa o glucosa	50 mM
Tris (pH 8)	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM

Esterilizar en autoclave.

-Solución II:

Se prepara en el momento a partir de los stocks:

SDS (10%)	10 g/0.1 L
-----------	------------

NaOH (2 N) 8 g/0.1 L

Para 1 ml de Sol II, se adiciona 800 µl de H₂O dest, y 100 µl de cada stock.

-Solución III:

Acetato de potasio (3 M) 147.219 g/0.5 L

Acido acético (11.5%) 57.5 ml/0.5 L

Primero, disolver el acetato de potasio en agua y después agregar el acido acético. Ajustar pH a 5.5, esterilizar en autoclave y guardar en frio.

-Fenol-Cloroformo-Alcohol Isoamílico (24:24:1):

Fenol saturado 24 ml

Cloroformo 24 ml

Alcohol isoamílico 1 ml

Para el fenol saturado:

Se deja toda la noche con un volumen igual de 500 ml de fenol x 500 ml de Tris (1 M pH 8). Al siguiente día, desechar el Tris y agregar otro volumen igual. Se deja toda la noche, checar que el pH sea 8, adicionar 0.01% de Hidroxiquinoleina y 500 ml de TE 10/1 (pH 8), guardar en frio.

-Stock RNasa:

En 1 ml agregar:

Acetato de sodio (0.4 M pH 4) 10 mg

Se hierve 10 min a 95°C. De este stock se toma 0.4 ml, más 19.6 ml de TE 10/1 (pH 8, filtrado y esterilizado), se hacen alícuotas de 1 ml y se guardan a -20°C.

La concentración final es de 200 µg/ml.

11.5.3 Buffer de corrida para electroforesis de DNA

-Buffer TA 10X:

Tris Base 48.4 g/L

Acido acético glacial 11.42 g/L

EDTA (5 M pH 8) 20 ml/L.

11.5.4 Soluciones para preparar células competentes de *E. coli* DH5α

-CaCl₂ 0.1M

CaCl₂•H₂O 14.7 g/L.

Esterilizar en autoclave.

CaCl₂ 60 mM 8.82 g/L

Glicerol 15% 150 ml/L

Hepes 10 mM 2.38 g/L

Ajustar el pH a 7.6 y esterilizar en autoclave.

11.5.5 Soluciones utilizadas en conjugación bacteriana

-MgSO₄ – Tween:

MgSO ₄	2.464 g/L
Tween (100%)	100 µl/L

Esterilizar en autoclave.

11.5.6 Soluciones para geles tipo Eckhardt

-Buffer TB 5X:

Tris base	54 g/L
Acido bórico	27.5 g/L
EDTA (0.5 M pH 8)	20 ml/L

-Solución lisis:

Lisosyma	0.01 g/ml
RNAse	0.4 mg
Azul de bromofenol	1 mg
TE (10/1)	1 ml

Incubar 10 min a 95°C.

11.5.7 Solución para purificación de RNA de nódulos

-Buffer 1 (10 ml):

TRIS (1 M pH 8)	1 ml
LiCl (10 M)	150 µl
EDTA (0.5 M)	1 ml
SDS (10%)	1.5 ml
β-mercapto-etanol	150 µl
Agua DEPC	6.5 ml.

11.5.8 Solución para determinación del contenido de Lb

-Buffer de extracción de Lb:

Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O (pH 7.4)	40 mM
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (pH 7.4)	10 mM
K ₃ Fe(CN) ₆	0.02%
NaHCO ₃	0.1%

11.5.9 Solución nutritiva para el cultivo de plantas

-Solución nutritiva Fahraeus (1957):

Macronutrientes (x10):

Ca ₂ Cl ₂ ·2H ₂ O	14.703 g/L
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	22.58 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	24.65 g/L
KH ₂ PO ₄	10.0 g/L
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.551 g/L.

Micronutrientes (x100):

$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.17 g/L
H_3BO_3	0.123 g/L
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.143 g/L
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.449 g/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0237 g/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.0240 g/L.

La solución nutritiva se calibró a un pH de 6.8 y se esterilizó en autoclave a 120°C por 30 minutos. El $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se esterilizó por filtración y se agregó al momento de usar la solución.

