



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

**ROL DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE DE MICROSIMBIONTES DE
LEGUMINOSAS Y SU RELACIÓN CON LA TOLERANCIA A
ESTRÉS ABIÓTICO DURANTE LA SIMBIOSIS.**

Mic. Pablo Javier Gonzalez.

Directora: Dra. Mariana Noemí Melchiorre

Codirectora: Dra. Adriana Fabra

Río Cuarto, marzo de 2019

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido: Dra. Graciela Esther Racagni

Lugar de trabajo: UNRC

Firma:

Nombre y Apellido: Dr. Hernán Ramiro Lascano

Lugar de trabajo: IFRGV-INTA

Firma:

Nombre y Apellido: Dr. Walter Fabián Giordano

Lugar de trabajo: UNRC

Firma:

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha: _____

Calificación: _____

Agradecimientos

A los docentes de la Universidad Nacional de Río Cuarto, que me formaron como profesional y supieron transmitirme el interés por la investigación. A la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la UNRC, por haberme brindado un lugar donde crecer académica e intelectualmente. Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, por brindarme la oportunidad de seguir desarrollándome profesional y científicamente, y por su apoyo en la realización de esta tesis. Al Instituto de Fisiología y Recursos Genéticos Vegetales (Ex IFFIVE), por brindarme los espacios de colaboración y discusión, sobre todo por dejarme ser parte de un grupo comprometido con el trabajo, y con el cual compartí buenos momentos: Roberto Racca, Mariana Melchiorre, Ramiro Lascano y Victorio Trippi, y también a mis compañeros y amigos del mundo de las especies activas del oxígeno: Dolores Bustos, Rodrigo Parola, Germán Robert, Marianela Rodríguez y Nacira Muñoz, y también a los integrantes más recientes: Miguel Fagiani, Tadeo Fernández y Sofía Andreola. A todos ustedes gracias por todo el tiempo compartido, por su apoyo, discusión, por brindarme su amistad, su compañerismo y por ayudarme a madurar tanto personal como profesionalmente. Al director del CIAP y del IFRGV, Ing. Alejandro Rago y Dr. Daniel Collino respectivamente, por su apoyo en las actividades que van más allá de este trabajo de tesis. A las técnicas del laboratorio, Paola Suárez, Daniela Gómez, Yohanna Ruartes y Daniela López Miró, por su predisposición, asistencia y cooperación en los ensayos del día a día en el laboratorio.

También quiero manifestar mi agradecimiento a quienes han sido parte activa en la elaboración de esta tesis:

A la Dra. Mariana Melchiorre, directora de esta tesis, por su dirección, sus consejos, sus aportes y su paciencia. Por transmitirme sus conocimientos en el manejo y cuidado de las plantas, algo muy necesario cuando se viene del mundo microscópico.

A la Dra. Adriana Fabra, co-directora de tesis, por sus valiosos aportes científicos, por su constante apoyo, sus buenos consejos y sugerencias en la realización de este escrito. Por enseñarme a integrar los resultados con críticas siempre constructivas.

Al Dr. Ramiro Lascano, por ser parte del jurado de tesis, y por sus valiosos aportes científicos en la fisiología vegetal, por dar siempre una visión diferente de y por sus planteos.

A la Dra. Graciela Racagni, y al Dr. Walter Giordano por ser Jurado de Tesis e integrantes de la comisión asesora. Por sus consejos y aportes, por su sinceridad al evaluar mi desempeño. Sus palabras me permitieron continuar y superar momentos difíciles de este camino, por sus críticas siempre constructivas.

A la Dra. Edith Taleisnik, por sus correcciones y consejos brindados desinteresadamente para la elaboración de la escritura de esta tesis.

A las personas especiales que siempre estuvieron incondicionalmente cada vez que las necesité. A Marcos, por su constante apoyo y animarme a ir siempre por más, por escucharme y alentarme a tomar nuevos desafíos. A Loli (Boeris), Verónica Meringer, Lucas Gallarato y Marina Forrellad, mi familia de Río Cuarto, por brindarme su amistad, su tiempo y siempre todo su apoyo.

Índice general	I-IV
Índice de figuras	V
Índice de tablas	VI
Abreviaturas	VII-IX
Resumen	X
Resumen en inglés (Summary)	XI
Índice general:Capítulo 1: Introducción	1
1.1 Salinización y anegamiento en Argentina.	1
1.2 Introducción de leguminosas en regiones ganaderas.....	3
1.3 Microorganismos del suelo: La simbiosis rizobios-leguminosas.	3
1.4 Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	4
1.5 Estrés oxidativo.	5
1.6 Sistema antioxidante de rizobios.	6
1.6.1 Catalasa (CAT).	6
1.6.2 Superóxido dismutasa (SOD).	8
1.6.3 Glutación reductasa (GR).....	10
Hipótesis:	12
Objetivo general:.....	12
Objetivos específicos:.....	12
Capítulo 2: Materiales y métodos.....	13
2.1 Bacterias y plantas.	13
2.2 Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este estudio.....	13
2.3 Condiciones de cultivo de bacterias y plantas.	15
2.4 Medición del crecimiento bacteriano.....	15
2.5 Estrés salino y osmótico en <i>M. loti</i> y <i>L. japonicus</i>	15
2.6 Actividades enzimáticas.	16
2.6.1 Actividad Superóxido dismutasa.	16
2.6.2 Actividad Catalasa.	16
2.6.3 Actividad Glutación reductasa.	16
2.7 Zimogramas.	17
2.7.1 Zimogramas de SOD.	17
2.7.2 Zimogramas de CAT.	17

2.7.3 Zimograma de GR.	17
2.8 Ensayo de nodulación y aislamiento de rizobios a partir de nódulos radicales.	17
2.9 Evaluación de la simbiosis en estrés salino.	18
2.10 Transformación de rizobios por conjugación biparental.	18
2.11 Amplificación de ADN.	19
2.12 Diseño de oligonucleótidos.	19
2.13 Construcción de vector pFAJsod para la sobreexpresión constitutiva del gen sod.	20
2.14 Construcción del vector pSODmut para la mutación del gen <i>mlr7636</i>	21
2.15 Restricciones enzimáticas de ADN.	22
2.16 Extracción de proteínas totales.	22
2.17 Extracción de proteínas periplásmicas.	22
2.18 Identificación de SOD por Western blot.	23
2.19 Cuantificación de proteínas.	24
2.20 Electroforesis en geles desnaturalizantes.	24
2.21 Electroforesis en geles nativos ND-PAGE.	24
2.22 Cálculo del peso molecular de proteínas.	25
2.23 Análisis de la estructura primaria de la secuencia <i>mlr7636</i>	25
2.24 Determinación de tolerancia a estrés oxidativo.	25
2.25 Evaluación del crecimiento de plantas.	25
2.26 Análisis filogenético.	26
2.27 Análisis estadístico.	26
Capítulo 3: Efecto del estrés salino y osmótico sobre la inducción de enzimas antioxidantes de <i>M. loti</i> y generación de plásmido para la sobreexpresión de SOD	27
3.1 Efecto del estrés salino y osmótico sobre el crecimiento de <i>M. loti</i>	28
3.2 Efectos del estrés salino y osmótico sobre el sistema antioxidante enzimático de <i>M. loti</i> MAFF303099.	28
3.3 Sobreexpresión de SOD.	29
3.4 Deleción del gen <i>mlr7363</i> por doble recombinación homóloga.	37
3.5 Discusión.	38
Capítulo 4: Sobreexpresión y deleción de SOD en <i>M. loti</i>: actividad, isoformas y localización subcelular.	42

4.1 Transformación de <i>M. loti</i> MAFF303099 con pFAJ1708, pFAJsod y pSODmut...	43
4.2 Crecimiento de <i>M. loti</i> recombinantes en estrés salino y osmótico.....	44
4.3 Caracterización de la actividad SOD en <i>M. loti</i> sod.....	46
4.4 Localización subcelular de SOD en <i>M. loti</i>	50
4.5 Análisis del perfil proteico de SOD.....	51
4.5.1 Acerca de la secuencia <i>mlr7636</i>	51
4.5.2 Análisis filogenético de la SOD codificada por el gen <i>mlr7636</i>	54
4.6 Discusión	56
Capítulo 5: Evaluación del efecto de la sobreexpresión de SOD en la supervivencia de <i>M. loti</i> y <i>S. meliloti</i> frente a condiciones de estrés oxidativo.	60
5.1 Tolerancia de <i>M. loti</i> a H ₂ O ₂	61
5.2 Tolerancia de <i>M. loti</i> al ión superóxido.....	62
5.3 Evaluación de la tolerancia a estrés oxidativo de <i>S. meliloti</i> con sobreexpresión de SOD.....	63
5.3.1 Obtención de la cepa <i>S. meliloti</i> sod.....	63
5.3.2 Tolerancia de <i>S. meliloti</i> a H ₂ O ₂	65
5.3.3 Tolerancia de <i>S. meliloti</i> a ·O ₂ ⁻	66
5.4 Discusión.....	66
Capítulo 6: Caracterización y efectos de la sobreexpresión de SOD en <i>M. loti</i> y <i>S. meliloti</i> en la interacción con <i>L. japonicus</i> y <i>M. sativa</i> en condición control y de estrés salino. 69	69
6.1 Efecto del estrés salino sobre la nodulación de <i>L. japonicus</i> inoculadas con <i>M. loti</i> sobreexpresora de SOD.....	70
6.2 Efecto del estrés salino sobre la nodulación de <i>M. sativa</i> inoculada con <i>S. meliloti</i> sobreexpresora de SOD.....	74
6.3 Discusión	77
Capítulo 7: Conclusiones.....	80
Bibliografía	85
Apéndice	95
A.1 Medios y condiciones de cultivo para bacterias.....	95
A.2 Medios y condiciones de cultivo para plantas.....	96
A.3 Técnicas de manejo de ADN.....	97
A.4 Clonación del ADN amplificado.....	99
A.5 Obtención de células competentes.....	100

A.6 Transformación de <i>E. coli</i>	101
A.7 Estimación relación DO/UFC/mL:	100

Índice de figuras

Capítulo 1

Figura 1.1 Subdivisión de la Región Pampeana	2
Figura 1.2 Esquema del proceso de infección por rizobios	5
Figura 1.3 Reacción catalítica de catalasa	6
Figura 1.4 Reacción catalítica de la peroxidasa	7
Figura 1.5 Reacción catalítica de la superóxido dismutasa	8

Capítulo 2

Figura 2.1 Esquema de clonado del gen <i>mlr7636</i> en el vector pK18sod	21
Figura 2.2 Mapa físico del plásmido pFAJ1708y sitio de múltiple clonado	21

Capítulo 3

Figura 3.1 Crecimiento de <i>M. loti</i> MAFF303099	28
Figura 3.2 Amplificación del gen <i>mlr7636</i> a partir de ADN genómico	30
Figura 3.3 Esquema de clonado del gen <i>mlr7636</i> en el vector pK18mob	31
Figura 3.4 Secuencia nucleotídica del gen <i>mlr7636</i>	32
Figura 3.5 Identificación de insertos <i>sod</i> en pK18 para subclonar en pFAJ1708	33
Figura 3.6 Amplificación de <i>mlr7636</i> a partir del vector pFAJsod	34
Figura 3.7 Resultado de secuenciamiento del plásmido pFAJsod	35
Figura 3.8 Representación y sentido del clonado del gen <i>sodA</i> en el vector pK18sod	36
Figura 3.9 Esquema de interrupción génica de <i>mlr7636</i> por recombinación homóloga	37

Capítulo 4

Figura 4.1 Identificación de clones de <i>M. loti</i> con el gen <i>mlr7636</i> interrumpido	43
Figura 4.2 Plántulas de <i>L. japonicus</i> noduladas en <i>pouch</i>	44
Figura 4.3 Efecto de NaCl (150 mM) y PEG (15 %) sobre el crecimiento de <i>M. loti</i>	45
Figura 4.4 Actividad específica SOD de <i>M. loti</i> WT, <i>M. loti</i> 1708 y <i>M. loti</i> <i>sod</i>	47
Figura 4.5 Zimograma de SOD en células enteras y periplasma de <i>M. loti</i>	48
Figura 4.6 Western blot de SOD de <i>M. loti</i> en ND-PAGE y SDS-PAGE	50
Figura 4.7 Localización subcelular de SOD de <i>M. loti</i>	51
Figura 4.8 Secuencia aminoacídica de <i>mlr7636</i>	52
Figura 4.9 Predicción de péptido señal de SOD	53
Figura 4.10 Predicción de la presencia de péptido señal TAT	53
Figura 4.11 Árbol filogenético de SOD de <i>M. loti</i>	54

Capítulo 5

Figura 5.1 Tolerancia de <i>M. loti</i> a H ₂ O ₂	61
Figura 5.2 Tolerancia de <i>M. loti</i> a ión superóxido	63
Figura 5.3 Zimograma de SOD en <i>S. meliloti</i> WT, <i>S. meliloti</i> 1708 y <i>S. meliloti</i> <i>sod</i>	64
Figura 5.4 Tolerancia de <i>S. meliloti</i> a H ₂ O ₂	65
Figura 5.5 Tolerancia de <i>S. meliloti</i> a ión superóxido	66

Índice de tablas

Capítulo 2

Tabla 2.1 Cepas bacterianas, materiales vegetales y plásmidos utilizados 14

Tabla 2.2 Concentraciones de soluciones de NaCl y PEG 8000 con presiones osmóticas equivalentes 16

Tabla 2.3 Lista de oligonucleótidos 20

Tabla 2.4 Anticuerpos primarios y secundarios usados para Western blot 24

Capítulo 3

Tabla 3.1 Actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GR de *M. loti* 29

Capítulo 4

Tabla 4.1 Recuperación de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod a partir de nódulos 45

Tabla 4.2 Tiempo de generación de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod 46

Tabla 4.3 Movilidad relativa de las izoenzimas de SOD en zimogramas 49

Capítulo 6

Tabla 6.1 Nodulación y parámetros de crecimiento de *L. japonicus* inoculado 71

Tabla 6.2 Nodulación y parámetros de crecimiento de *M. sativa* no inoculadas 75

Apéndice

Tabla A7.1 Correlación de UFC/mL correspondientes a una DO₆₀₀=1 en las cepas de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod. 102

Abreviaturas

ADN: Acido desoxirribonucleico

AP: Fosfatasa alcalina

Ap: Ampicilina

ARN: Ácido ribonucleico

ATP: adenosina trifosfato

BLASTP: Herramienta de búsqueda de alineamiento entre proteínas (Basic Local Alignment Search Tool)

BSA: Albúmina sérica bovina

CAT: Catalasa

C: Carbono

CE: Célula entera

CHA: Contenido hídrico aéreo

CHR: Contenido hídrico radical

Cm: Cloranfenicol

CTAB: Bromuro de cetiltrimetilamonio

dNTPs: Deoxinucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

dpi: Días post inoculación

EAO: Especie activa del oxígeno

EDTA: Acido etilendiaminotetraacético

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FAOSTAT: Base de datos estadísticos de la FAO

FBN: Fijación biológica de nitrógeno

FN: Factor Nod

GTE: Glucosa Tris-HCl EDTA

GR: Glutación reductasa

gr: Gramo

GSSG: Glutación disulfuro

h: horas

IEF: Isoelectroenfoque

IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido

Kb: Kilobase

kDa: kiloDaltons

Km: Kanamicina

kV: Kilo voltios

L: Litro

LB: Luria Bertani

M: Molar

mg: Miligramo

min: Minutos
mL: Mililitro
mm: Milímetro
mM: Milimolar
ms: Milisegundo
N: Nitrógeno
NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido
NAD(P)H: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (reducido)
NBT: Nitroazul de tetrazolio
NCBI: Centro Internacional de Información en Biotecnología.
ng: Nanogramo
nt: Nucleótido
PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida
pb: pares de bases
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (polimerase chain reaction)
PEG8000: Polientilenglicol 8000
PF: Peso fresco
PFA: Peso fresco aéreo
PFR: Peso fresco radical
PGPR: Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
Pi: Pos inoculado
PP: Periplasma
PS: Peso seco
PSA: Peso seco aéreo
PSR: Peso seco radical
PSI-BLAST: Position specific interaction BLAST
P/V: Peso en volumen
RPM: Revoluciones por min
s: Segundos
SDS: Dodecilsulfato de sodio
SOD: Superóxido dismutasa
TAT: Sistema de secreción Tipo II, dependiente de argininas gemelas
TBS: Tris buffer salino
Tc: Tetraciclina
Tm: Temperatura de melting
U: Unidad enzimática
UFC: Unidades formadoras de colonias
μg: Microgramo
μL: Microlitro
μM: Micromolar
Vol: Volumen

V/V: Volumen en volumen

xg: Fuerza centrífuga

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido

WT: wild type, cepa silvestre

Resumen

La sequía y la salinidad son los principales factores que afectan la fijación biológica de nitrógeno mediada por la simbiosis rizobio/leguminosa. Una de las respuestas globales a estas condiciones de estrés es el aumento intracelular de las especies activas del oxígeno (EAOs). En los rizobios, el sistema antioxidante les permite modular los niveles de EAOs producidos ya sea en vida libre o en la interacción simbiótica. Una de las enzimas clave que participa en la modulación redox de estos procesos es la Superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1). En *Mesorhizobium loti* MAFF303099, la SOD está codificada por el gen *mlr7636*.

Este trabajo exploró la hipótesis de que la sobreexpresión de SOD en rizobios contribuye a aumentar la tolerancia a estrés oxidativo en vida libre y durante la nodulación de leguminosas cultivada en estrés salino.

Por ello, fueron estudiados en *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti* los efectos de la sobreexpresión de SOD, analizando su tolerancia a estrés oxidativo en vida libre y en simbiosis con *Lotus japonicus* y *Medicago sativa* cultivadas en condiciones de estrés salino. Los resultados revelaron que, en primer lugar, la sobreexpresión de SOD incrementó la tolerancia de los rizobios a superóxido y peróxido de hidrógeno en vida libre, y en segundo lugar, que la aplicación de *M. loti* con sobreexpresión de SOD revierte los efectos adversos de la salinidad sobre *L. japonicus* aun sin establecerse la simbiosis.

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are unavoidable by-products of aerobic life and their signaling role during plant-microbe interactions has been extensively demonstrated. ROS are constantly produced during normal metabolic processes, but their levels are increased under abiotic stress conditions.

In rhizobia, the antioxidant system allows bacteria to modulate ROS levels produced during both the free-living stage and the symbiotic interaction. One of the key enzymes that participate in the redox modulation of these processes is Superoxide dismutase. In *Mesorhizobium loti* MAFF303099, the SOD is encoded by the *mlr7636* gene. To our knowledge, there are no reports about the effect of bacterial SOD overexpression either on tolerance to oxidative stress or on the symbiotic performance under salt stress conditions.

Thus, the objective of this study was to investigate the effects of SOD overexpression in *Mesorhizobium loti* and *Sinorhizobium meliloti* on their tolerance to oxidative stress in free-living conditions and in symbiosis with *Lotus japonicus* and *Medicago sativa* cultivated in salt stress condition. Our results revealed that SOD overexpression improved the tolerance of both rhizobia to superoxide and hydrogen peroxide. Moreover, the application of *M. loti* with SOD overexpression improve the *L. japonicus* performance in saline stress, despite the establishment of the symbiosis with the legume was inhibited.

Capítulo 1: Introducción

1.1 Salinización y anegamiento en Argentina.

La Argentina ocupa una extensión de 273,7 millones de ha, de las cuales aproximadamente 147,5 millones (53,9 %) son cultivables (FAOSTAT y FAO, 2014). Asimismo, alrededor del 75 % de las tierras cultivables se encuentran afectadas por condiciones de aridez o semiaridez; y al menos 34 millones de ha están sometidas a anegamiento y salinidad.

El avance de las prácticas de cultivos extensivos que ocurrió en la pradera pampeana, alcanzó la Cuenca del Salado donde las explotaciones eran tradicionalmente ganaderas. Como consecuencia de este fenómeno, estas áreas típicamente ganaderas fueron cediendo los mejores suelos a la agricultura, desplazándose la ganadería hacia regiones de producción forrajera disminuida, con mayores restricciones edáficas y serios riesgos hídricos como la Pampa Deprimida del Salado, caracterizada por la presencia de suelos limosos, con alta alcalinidad y salinidad, con ciclos alternados de sequía y anegamiento (Figura 1.1).

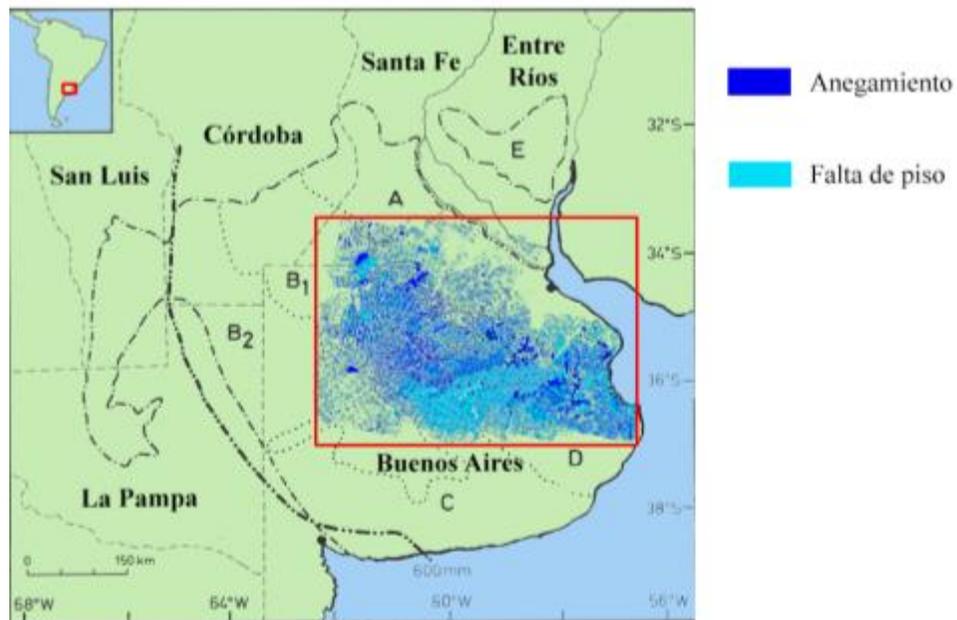


Figura 1.1: Subdivisión de la Región Pampeana. A) Pampa Ondulada; B) Pampa Interior o Arenosa (B1. Plana, B2. Occidental); C) Pampa Austral; D) Pampa Inundable o Deprimida y E) Pampa Mesopotámica. Adaptado de Taboada et al., 2009. En el recuadro se muestran las áreas de anegamiento y falta de piso de la región de la Pampa Deprimida a partir de imágenes satelitales adquiridas por LANDSAT (tomado de Carballo y Hartmann, 2001).

En estos ambientes son muy pocas las especies cultivadas que logran sobrevivir y producir suficiente cantidad de forraje para mantener la producción vacuna, y en muchos casos el único recurso disponible es la utilización de forrajeras halófitas de baja calidad, como *Distichlis spicata*, para la alimentación del ganado vacuno (Criado, 2014).

1.2 Introducción de leguminosas en regiones ganaderas.

El cultivo de las leguminosas del género *Lotus* en estos ambientes restrictivos, permitió incrementar la producción forrajera de la región y sostener la ganadería en la Pampa Deprimida del Salado. Esta leguminosa forrajera se destaca por no producir el empaste o timpanismo del animal (Criado, 2014).

Las plantas de *Lotus* son originarias de Europa y Asia menor. En la Cuenca del Mediterráneo, el género *Lotus* cuenta con alrededor de 200 especies. Se cree que a la Argentina llegó mezclada con otras semillas o en las heces de animales traídos de Europa.

Otra forrajera ampliamente utilizada es *M. sativa* (alfalfa) producida principalmente en las provincias de Córdoba, Santa Fe, Buenos Aires (excepto la Pampa Deprimida del Salado) y La Pampa, representando más del 90 % de la superficie con alfalfa de la Argentina. La alfalfa es la principal especie forrajera del país, la base para la producción de carne y leche en la región Pampeana, y su productividad y persistencia también se ven afectadas por estreses abióticos como salinidad y anegamiento (Basigalup, 2007).

Las especies *L. japonicus* y *M. truncatula*, son plantas modelo ampliamente utilizadas para estudios moleculares en leguminosas. Asimismo, la disponibilidad de la secuencia del genoma de *Medicago sativa* y la enorme cantidad de información disponible, la transformaron también en planta modelo de estudio (Young et al., 2005; Sato et al., 2008; Cannon, 2013). Por otro lado, su capacidad para realizar la fijación biológica del nitrógeno a través de la simbiosis con rizobios cuyos genomas ya han sido secuenciados como *Mesorhizobium loti* MAFF303099 y *Sinorhizobium meliloti* 2011 (Kaneko et al., 2000; Sallet et al., 2013) convierten a las interacciones *L. japonicus*-*M. loti* y *M. sativa*-*S. meliloti* en sistemas modelo para el estudio de este tipo de relaciones.

1.3 Microorganismos del suelo: La simbiosis rizobios-leguminosas.

El principal reservorio de nitrógeno es la atmósfera en donde el N₂ representa un 78 % de los gases que componen el aire. Sin embargo, el nitrógeno atmosférico (N₂) como tal no puede ser utilizado por la mayoría de los seres vivos, por lo que dependen únicamente del nitrógeno presente en la materia orgánica y minerales del suelo, convirtiéndose en uno de los principales

limitantes del crecimiento (Hirsch y Mauchline, 2015). El proceso para romper el triple enlace del nitrógeno molecular ($N\equiv N$) que implica la reducción del N_2 requiere gran cantidad de energía (Jamet et al., 2003), y sólo un número reducido de organismos son capaces de utilizar el N_2 en el proceso conocido como fijación biológica del nitrógeno (FBN).

La FBN puede ocurrir tanto en microorganismos de vida libre como *Azospirillum* y *Azotobacter* (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000), y también en forma simbiótica como las bacterias colectivamente denominadas rizobios que tienen la particularidad de inducir la formación de nódulos en plantas de la familia *Fabaceae* (leguminosas) y en otras plantas no leguminosas como *Parasponia* (Flía. *Cannabaceae*) (Provorov y Vorobyov, 2009). Para ello, las plantas desarrollaron múltiples estrategias para establecer asociaciones con los microorganismos diazotrofos con el fin de poder tomar el nitrógeno atmosférico (Lam et al., 1996).

1.4 Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.

L. japonicus y *M. sativa* son leguminosas a las que el endosimbionte coloniza vía cordón de infección (Gage, 2004). El cordón de infección crece desde el pelo radical permitiendo el ingreso de los rizobios a la corteza radical en donde las células de la corteza comienzan a dividirse para dar origen al meristema nodular (Gage, 2002). Una vez en las células corticales, los rizobios son liberados del hilo de infección rodeados por la membrana peribacteriana de origen vegetal, formando el simbiosoma (Figura 1.2). Este proceso de endocitosis que involucra un importante tráfico vesicular, está regulado por GTPasas y señalización mediada por fosfoinosítidos (Peleg-Grossman et al., 2007).

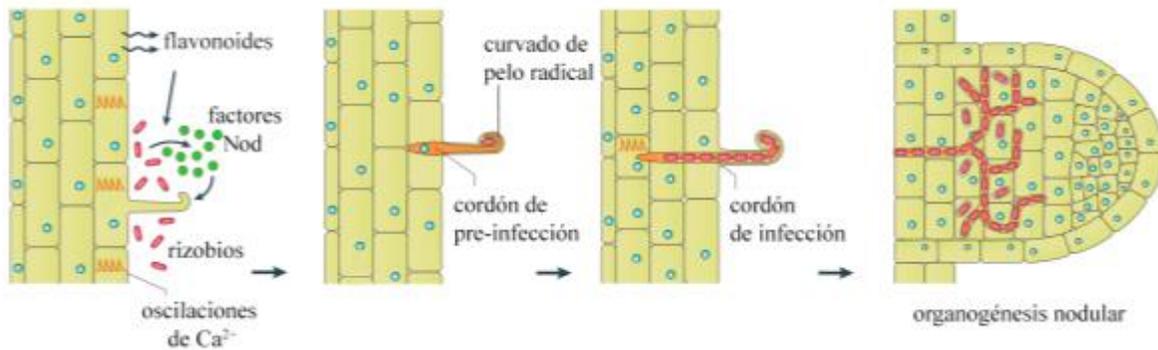


Figura 1.2: Diagrama del proceso de infección por rizobios. Los flavonoides liberados por la planta son percibidos por los rizobios en la rizósfera que en respuesta producen los factores Nod que son reconocidos por la planta. La percepción de los factores Nod induce la cascada de moléculas señales que llevan inicialmente oscilaciones de calcio en las células epidérmicas que luego se expanden hasta las células corticales. Los rizobios logran entrar a la planta por los pelos radicales que crecen en torno a la bacteria adherida en la superficie del pelo quedando atrapada dentro del pelo curvado. El cordón de infección es una invaginación de la membrana plasmática de los pelos radicales que permite la entrada del rizobio hasta las células de la corteza. El nódulo se forma por debajo del sitio de ingreso del rizobio por la división de las células corticales. Posteriormente el cordón de infección crece hacia el nódulo en formación y se ramifica en el tejido nodular. Esquema adaptado de Oldroyd (2013).

En las leguminosas que desarrollan nódulos determinados como *L. japonicus* y *G. max* la actividad del meristema nodular se restringe a las etapas iniciales de su desarrollo y el simbiosoma maduro contiene múltiples bacteroides con alta viabilidad reproductiva (Gresshoff y Rolfe, 1978).

1.5 Estrés oxidativo.

En las plantas crecidas en condiciones óptimas, las EAOs son generadas en bajos niveles en organelas como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas y poseen un rol crucial en la transducción de señales celulares. Sin embargo, las EAOs también tienen el potencial para causar daño oxidativo a las células bajo ciertas condiciones de crecimiento. Situaciones de estrés abiótico como salinidad, sequía, temperaturas extremas y deficiencia de nutrientes generan un aumento de las EAOs (Miller et al., 2010). No obstante, durante condiciones de estrés, la acumulación de EAOs depende principalmente del balance en su producción y eliminación (Mittler et al., 2004).

Por otra parte, el aumento de las EAOs durante las etapas tempranas de la interacción rizobios-leguminosa, como parte de una respuesta general contra patógenos (Santos et al., 2001; Shaw y Long, 2003), debe ser tolerada por los rizobios. Se ha demostrado que H₂O₂, además de su función como molécula señal, también es capaz de inhibir el desarrollo del cordón de infección y del nódulo en la simbiosis *M. sativa-S. meliloti* (Jamet et al., 2003) por lo que los rizobios deben ser capaces de tolerar estas EAOs durante la simbiosis (Zhao et al., 2016). Finalmente en el nódulo, el desbalance entre la producción y degradación de EAOs en su interior promueve senescencia prematura, caracterizada por la pérdida de la capacidad de fijar el N₂ atmosférico, inducción de actividades líticas y la formación de pigmentos verdes como leghemoglobina oxidada (Sarath et al., 1986; Layzell et al., 1990).

En los rizobios las EAOs son producto del metabolismo aeróbico que también se ven incrementadas en condiciones de estrés abiótico y durante las primeras etapas del reconocimiento con la leguminosa para poder sobrevivir a las reacciones de defensa de la planta hospedadora (Matamoros et al., 2003).

1.6 Sistema antioxidante de rizobios.

1.6.1 Catalasa (CAT).

Las enzimas con actividad catalasa forman parte de la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo. Estas enzimas catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, transformándolo en oxígeno y agua según la ecuación de la figura 1.3.



Figura 1.3: Reacción catalítica de la catalasa para la conversión de peróxido a oxígeno y agua.

Algunas catalasas también tienen actividad peroxidasa, utilizando un donador orgánico de electrones para reducir el peróxido de hidrógeno (Figura 1.4).

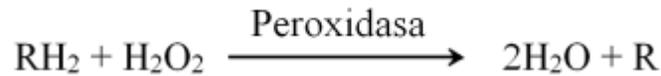


Figura 1.4: Reacción peroxidasa de la catalasa. En esta reacción se utiliza un donador orgánico de electrones como metanol o formaldehído para la reducción de peróxido de hidrógeno a agua.

En el microsimbionte, el sistema de defensa antioxidante le permite modular los niveles de EAOs que se producen durante su forma de vida libre en condiciones de estrés abiótico y también durante todas las etapas que llevan al establecimiento del nódulo. Mutantes con el sistema antioxidante comprometido demuestran una capacidad simbiótica defectiva. *S. meliloti* posee dos catalasas monofuncionales codificadas por los genes *katA* y *katC*, y una catalasa bifuncional con actividad catalasa-peroxidasa codificada por *katB* (Santos et al., 1999; Santos et al., 2000; Davies y Walker, 2007). En vida libre, la expresión de *KatB* ha sido observada durante todas las etapas de crecimiento, mientras *KatA* y *KatC* se expresan sólo en la fase exponencial y estacionaria respectivamente.

Entre las enzimas detoxificantes de EAOs, los genes de catalasa son los que más extensamente fueron caracterizados. La mutación de cualquiera de los tres genes *kat* en *S. meliloti* no modificó su susceptibilidad frente a H_2O_2 , aunque los dobles mutantes *katA-katC* y *katB-katC* se mostraron deficientes en la formación de nódulos y en la fijación de nitrógeno respectivamente (Sigaud et al., 1999; Jamet et al., 2003). El doble mutante *katA-katC* de *S. meliloti* puede fijar nitrógeno, pero posee baja eficiencia de nodulación (Sigaud et al., 1999) y baja densidad de bacteroides, algunos de los cuales presentaron forma irregular (Jamet et al., 2003). El mutante *katB-katC* posee una eficiencia de nodulación aún más baja que los dobles mutantes *katA-katC* y no son capaces de formar bacteroides y fijar nitrógeno (Jamet et al. 2003). Debido a que estos dobles mutantes son capaces de crecer aeróbicamente, *S. meliloti* posiblemente necesita de *katB* y *katC* para modular los niveles de EAOs en la interacción con *Medicago* antes de formar simbiosomas maduros. En contraste, una doble mutante *katE-katG*

de *M. loti* forma un número mayor de nódulos efectivos aunque con menor capacidad fijadora de nitrógeno que las salvajes (Hanyu et al., 2009).

M. loti posee una catalasa monofuncional codificada por *katE* que contribuye a la supervivencia durante la fase estacionaria del crecimiento y una bifuncional catalasa-peroxidasa *katG* (Kaneko et al., 2000). A su vez, la mutante *katE* muestra disminución en la capacidad fijadora de nitrógeno similar a los dobles mutantes *katE-katG*. Sin embargo, la capacidad fijadora de nitrógeno de la simple mutante *katG* es comparable a la de *M. loti* salvaje (Hanyu et al., 2009). Esto sugiere que la catalasa monofuncional *KatE* es necesaria para el mantenimiento de la fijación de nitrógeno o para proteger a los bacteroides de los efectos tóxicos de las EAOs vegetales, particularmente H₂O₂ que puede ser producto de la actividad SOD de la planta (Rubio et al., 2004).

En *Bradyrhizobium japonicum*, ha sido identificada una catalasa-peroxidasa *KatG* cuya actividad es fundamental para la detoxificación del H₂O₂ que se produce durante el crecimiento en vida libre (Panek y O'Brian, 2004).

1.6.2 Superóxido dismutasa (SOD).

La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación del radical superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular según la ecuación de la figura 1.5, protegiendo de esta forma a la célula contra el daño oxidativo. Cuatro tipos de SODs son comúnmente encontradas en procariontas. Todas ellas son metaloenzimas, que difieren en su cofactor metálico.



Figura 1.5: Reacción de la SOD para la dismutación de O₂⁻ en peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.

Las enzimas manganeso SOD (MnSOD, *SodA*) y la hierro SOD (FeSOD, *SodB*), son similares entre ellas en tamaño y secuencia. También existe una SOD del tipo A/B conocida como cambialística como la codificada por el gen *SodA* de *S. meliloti* (Santos et al., 1999), que puede aceptar tanto hierro como manganeso como cofactor (Martin et al., 1986). Una cuarta

isoforma, la cobre/zinc SOD (CuZn-SOD) no presenta relación estructural ni de secuencia aminoacídica con las FeMnSODs descritas anteriormente (Fridovich, 1997).

A pesar de que las SODs son generalmente consideradas enzimas citoplasmáticas (Fridovich, 1997), recientemente se reportó en *Rhizobium leguminosarum* *bv. viciae* 3841 su localización periplásmica (Krehenbrink et al., 2011). La presencia de SOD en el periplasma podría tener un importante papel protector de los lípidos de membrana y proteínas periplásmicas del daño causado por el radical superóxido extracelular. En *E. coli*, *sodC* es inducida durante la fase estacionaria, y esta inducción es regulada de manera dependiente del factor sigma RpoS (Gort et al., 1999). En bacterias Gram negativas, las proteínas periplásmicas o las de membrana externa pueden ser secretadas empleando el sistema Sec que reconoce un péptido señal de naturaleza hidrofóbica en el extremo N-terminal de una proteína no plegada. Este sistema Sec emplea hidrólisis de ATP y gradiente de protones como fuerza motriz que permite la secreción. Otra vía de traslocación descrita en bacterias Gram negativas es el sistema general TAT, por sus siglas en inglés (twin-arginine translocation). Mediante este sistema se translocan algunos componentes del sistema respiratorio. Para su funcionamiento se requiere el reconocimiento de un motivo rico en residuos de aminoácidos básicos en la región N terminal de la proteína plegada a ser secretada y emplea sólo gradiente de protones como fuente de energía para el transporte (Tokuda, 2009). Ambos sistemas Sec y Tat están ampliamente conservados en bacterias Gram negativas e involucrados en funciones fundamentales de la biogénesis y estructura celular.

En *B. japonicum* expuesto a estrés osmótico, se ha descrito la inducción de genes implicados en las respuestas a estrés oxidativo: Fe-Mn SOD, (*ChrC*), SOD (*sodF*) y peroxiredoxinas (*prxS-like*), (Chang et al., 2007; Cytryn et al., 2007).

Se ha postulado que el incremento en la actividad de las enzimas antioxidantes de *B. japonicum* y *S. meliloti* disminuye el nivel de daño a proteínas de membrana y ácidos nucleicos incrementando sustancialmente la sobrevivencia de estos microorganismos frente a condiciones de estrés osmótico (Halverson y Firestone, 2000; Boumahdi et al., 2001).

En nódulos de *M. sativa* han sido caracterizadas la expresión y actividad de isoformas de CuZnSOD y MnSOD. La co-localización de actividad CuZnSOD y sus transcritos en el

meristema nodular evidencia su participación en la zona de invasión y su potencial activación por iones superóxido del hilo de infección. CuZnSOD y H₂O₂ se co-localizaron en el citosol adyacente a las paredes celulares de la zona de infección, en los hilos de infección, y en el apoplasto, lo que han llevado a postular que sólo CuZnSOD está involucrado en la producción de H₂O₂ en nódulos. Estudios realizados con inhibidores como DPI apoyan la idea de que al menos en los hilos de infección, la NADPH oxidasa es la fuente de radical superóxido que luego es dismutado por CuZnSOD a H₂O₂. De esta forma, el H₂O₂ puede ser utilizado para el crecimiento celular y el entrecruzamiento de proteínas (Rubio et al., 2004). A su vez, como fue descrito por Jamet et al. (2007), el H₂O₂ producido por la planta puede actuar como una molécula señal positiva para la infección, debido a que la inoculación de *M. sativa* con *S. meliloti* sobreexpresora de catalasa alteró el desarrollo del hilo de infección y la nodulación.

En rizobios, las técnicas de sobreexpresión y delección génica han permitido el estudio del rol fisiológico que cumplen algunas enzimas que componen el sistema antioxidante de estas bacterias en vida libre y en la interacción con su planta hospedadora.

Hasta el momento, este tipo de abordaje permitió la caracterización de los efectos que tiene la sobreexpresión del gen *katB* que codifica para la enzima con actividad catalasa peroxidasa. La sobreexpresión de esta catalasa peroxidasa deja en evidencia la participación de H₂O₂ como molécula señal durante la interacción simbiótica en el sistema *S. meliloti/M. sativa* (Jamet et al., 2007), y la delección de los genes *katA*, *katB* y *katC* en *S. meliloti* ponen de manifiesto su rol protector contra las EAOs (Santos et al., 2000; Davies y Walker, 2007). Otros estudios que incluyeron la delección de los genes *katE* y *katG* realizados en *M. loti* (Hanyu et al., 2009) y la delección de *katG* en *B. japonicum* (Panek y O'Brian, 2004) mostraron fenotipos similares a los de *S. meliloti* con delección en catalasas.

1.6.3 Glutación reductasa (GR).

La glutatión reductasa cataliza la reducción de glutatión oxidado (GSSG) a GSH el cual es utilizado por la glutatión peroxidasa para la reducción de H₂O₂ a agua.

Recientemente fue descrito por Tang et al. (2018), que la delección del gen GR de *S. meliloti*, disminuyó su tolerancia a H₂O₂ en vida libre, y en simbiosis produjo retraso de la nodulación de *M. sativa* con una reducción de 75 % en su capacidad de fijar nitrógeno.

Respecto de la sobreexpresión de superóxido dismutasa, existe hasta el momento de la escritura de este trabajo de tesis una única publicación sobre la sobreexpresión heteróloga de la *sod* de *S. meliloti* llevada a cabo en una cepa de *E. coli* deficiente en *sodA*, *sodB* y *recA* en la que se logró la complementación génica y se restableció el crecimiento de *E. coli* en aerobiosis (Santos et al., 1999).

De las evidencias anteriores, surge que los rizobios expuestos a estrés abiótico incrementan sus actividades antioxidantes, y que además, las enzimas catalasa y superóxido dismutasa cumplen funciones esenciales en los rizobios durante el establecimiento de la simbiosis.

Hipótesis:

Este trabajo plantea como hipótesis que:

- I) La sobreexpresión de enzimas antioxidantes y el aumento de su actividad contribuyen a incrementar la tolerancia de los rizobios en vida libre a condiciones de estrés salino, osmótico y oxidativo.
- II) La sobreexpresión de SOD en rizobios contribuye a mitigar los efectos del estrés salino sobre el crecimiento de leguminosas forrajeras.

Objetivo general:

Evaluar el efecto del estrés abiótico sobre las enzimas antioxidantes de *M. loti* MAFF303099, y estudiar el efecto de la sobreexpresión de SOD en *M. loti* y *S. meliloti* sobre la tolerancia a estrés oxidativo en vida libre, y en la reducción de los efectos del estrés salino sobre el crecimiento de *L. japonicus* y *M. sativa*.

Objetivos específicos:

- 1) Analizar la inducción de las actividades enzimáticas SOD, CAT y GR en *M. loti* expuesto a estrés salino y osmótico.
- 2) Estudiar el efecto de la sobreexpresión y delección de SOD sobre el crecimiento de *M. loti* en estrés salino y osmótico.
- 3) Evaluar la actividad SOD y su perfil de actividad enzimática en la cepa sobreexpresora *M. loti* sod.
- 4) Investigar el perfil de la proteína sobreexpresada en *M. loti* sod.
- 5) Establecer la correlación entre la sobreexpresión de SOD en *M. loti* y la tolerancia a estrés oxidativo en vida libre.
- 6) Estudiar el efecto de la sobreexpresión heteróloga de SOD de *M. loti* en el rizobio modelo *S. meliloti* 2011.
- 7) Evaluar los efectos de la inoculación de *M. loti* y *S. meliloti* sobreexpresoras de SOD sobre el crecimiento de *L. japonicus* y *M. sativa* en condiciones control y de estrés salino.

Capítulo 2: Materiales y métodos.

2.1 Bacterias y plantas.

En este estudio se utilizaron las cepas *M. loti* MAFF303099 y *S. meliloti* 2011. La cepa *M. loti* fue utilizada para evaluar su crecimiento y las actividades enzimáticas en respuesta a estrés salino y osmótico. Además, también se la utilizó como fuente de ADN cromosómico para amplificar el gen *sod* (*mlr7636*). Tanto *M. loti* como *S. meliloti* fueron utilizadas como receptoras para la sobreexpresión constitutiva del gen *sod*. Por otra parte, las plantas utilizadas en los ensayos de nodulación fueron *L. japonicus* MG20 para *M. loti* y *M. sativa* variedad PROINTA Súper Monarca para *S. meliloti*.

2.2 Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este estudio.

Para llevar a cabo este estudio, también se utilizaron las siguientes cepas: *E. coli* DH5 α para los experimentos de rutina de clonado (Sambrook y Russell, 2001). La cepa *E. coli* S-17 F⁺ utilizada como huésped de los vectores pFAJ1708 y pFAJsod para la transformación por conjugación biparental de *M. loti* MAFF303099 y *S. meliloti* 2011, para obtener las cepas *M. loti* 1708, *M. loti* sod, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod.

La cepa *E. coli* S-17 también fue transformada con el plásmido pK18sodmut para la generación de la mutante *M. loti* sodmut por interrupción del gen *sod* por evento de doble recombinación homóloga.

El vector pGEM-T Easy (Promega) fue usado para clonar el gen *mlr7636*. El vector utilizado para la sobreexpresión de SOD fue el pFAJsod (obtenido en este trabajo). El vector pFAJ1708 (Dombrecht et al., 2001) se utilizó como control y también para la construcción del pFAJsod. Para la obtención de la cepa mutante *M. loti* sodmut se utilizó el vector pK18sodmut (obtenido en este trabajo).

El vector pK18mob fue utilizado como vector intermediario para el clonado del marco de lectura del gen *mlr7636* y también para el clonado de una región interna del gen *sod* para la interrupción génica por integración cromosomal por evento de doble recombinación homóloga. Las principales características de cada de una de las cepas y plásmidos se muestran en la tabla 2.2.

Tabla 2.1: Cepas bacterianas, materiales vegetales y plásmidos utilizados.

Cepas bacterianas	Descripción	Fuente
<i>E. coli</i> DH5a	F ^{recA} , Δ <i>lacU169</i> , F80 <i>dlacZDM15</i>	(Hanahan, 1983)
<i>E. coli</i> S 17-1	F ⁺ , <i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc ^r ::Mu-Km ^r ::Tn7 integrado al cromosoma	(Simon et al., 1983)
<i>E. coli</i> S17 1708	F ⁺ , Tc ^r , pFAJ1708.	Este estudio.
<i>E. coli</i> S17 sod	F ⁺ , Tc ^r , pFAJsod.	Este estudio.
<i>E. coli</i> S17 SODmut	F ⁺ , Tc ^r , pSODmut.	Este estudio.
<i>M. loti</i> MAFF303099	Nod ⁺ , Fix ⁺ microsimbionte de <i>Lotus</i> .	(Kaneko et al., 2000)
<i>M. loti</i> 1708	Tc ^r , pFAJ1708	Este estudio.
<i>M. loti</i> sod	Tc ^r , sod ⁺ , pFAJsod	Este estudio.
<i>M. loti</i> sodmut	Km ^r , Mutante sod ⁻	Este estudio.
<i>S. meliloti</i> 2011	Nod ⁺ , Fix ⁺ microsimbionte de <i>Medicago</i> .	(Truchet et al., 1985)
<i>S. meliloti</i> 1708	Tc ^r , pFAJ1708	Este estudio.
<i>S. meliloti</i> sod	Tc ^r , sod ⁺ , pFAJsod	Este estudio.
Material Vegetal	Descripción	Fuente
<i>Lotus japonicus</i> MG20	Leguminosa nodulada por <i>M. loti</i> .	
<i>Medicago sativa</i> Supermonarca	Leguminosa nodulada por <i>S. meliloti</i> .	
Plásmidos	Descripción	Fuente
pRK2013	Km ^r , plásmido “helper” derivado de RK2	(Ditta et al., 1980)
pK18mob	Km ^r , Ori pUC, <i>lacZ</i> , <i>mobRK2</i> , <i>gusA</i> plásmido mobilizable para clonado y disrupción génica en rizobios.	(Schäfer et al., 1994)
pK18sod		Este estudio.
pFAJ1708	Tc ^r , expresión bajo promotor <i>nptII</i> , derivado RK2, sistema de muerte postsegregacional.	(Dombrecht et al., 2001)
pFAJsod	Tc ^r , expresión gen <i>mlr7636</i> bajo promotor <i>nptII</i> , derivado RK2, sistema de muerte postsegregacional.	Este estudio.
pSODmut	Km ^r , derivado del pK18mob Δ <i>lacZ</i> :: <i>mlr7636</i> (267pb) para interrupción del gen <i>sod</i> por doble recombinación homóloga.	Este estudio.

Km^r: kanamicina resistente, Cm^r: cloranfenicol resistente y Tc^r: tetraciclina resistente.

2.3 Condiciones de cultivo de bacterias y plantas.

Las cepas bacterianas de *M. loti* y *S. meliloti* se cultivaron aeróbicamente en medio nutritivo YEM (apéndice) a 28 °C. Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB a 37 °C. Los medios TY, TY modificado y el Medio mínimo B- (descritos en el apéndice) fueron utilizados para las conjugaciones biparentales y triparentales. Cuando fue necesario se agregaron los antibióticos en la siguiente concentración final: Tetraciclina (Tc) 20 µg/mL y Kanamicina (Km) 25 µg/mL.

Las semillas de *L. japonicus* y *M. sativa* fueron escarificadas con H₂SO₄ 17 M por 5 min, desinfectadas con NaClO comercial, (55 g/L) al 10 % por 10 min y enjuagadas con agua estéril. Se las dejó embebiendo por dos horas y fueron incubadas en cámara húmeda sobre papel embebido con agua estéril a 37 °C. Luego de 48 h las plántulas fueron trasplantadas a pouches y regadas con medio B y D (Broughton y Dilworth, 1971) con bajo contenido de nitrógeno (apéndice).

2.4 Medición del crecimiento bacteriano.

El crecimiento microbiano en cultivo líquido se estimó siguiendo el cambio en la turbidez de la suspensión bacteriana por espectrofotometría en unidades de densidad óptica (DO) en espectrofotómetro (Beckman Coulter DU640B) a una longitud de onda de 600 nm. Las curvas de crecimiento se realizaron por triplicado con agitación orbital constante a 160 rpm a 28 °C. Para obtener la correspondencia entre la DO y el número de células se realizó una curva estándar entre unidades formadoras de colonias (UFC) por mL y DO₆₀₀.

2.5 Estrés salino y osmótico en *M. loti* y *L. japonicus*.

Los ensayos de crecimiento de *M. loti* en estrés salino fueron realizados adicionando 150 mM NaCl al medio de cultivo YEM. Esta concentración fue seleccionada debido a que concentraciones superiores comprometen seriamente el crecimiento de *L. japonicus* (Melchiorre et al., 2009). Por otro lado, polietilenglicol 8000 (PEG), fue utilizado para generar el estrés osmótico equivalente al ejercido por NaCl, sin efecto iónico. La correlación entre los potenciales osmóticos desarrollados por NaCl y PEG se establecieron usando un psicrómetro de termopar (C-52, Wescor, Logan) y un microvoltímetro HR-33T Dew Point Microvoltmeter (Wescor,

Logan). Para ello se midieron las presiones osmóticas de diferentes soluciones de NaCl 25, 50, 100, 150 y 200 mM a 25 °C y se ajustaron las soluciones de PEG8000 hasta lograr las presiones osmóticas equivalentes detalladas en la tabla 2.1 (Parola, 2007).

Tabla 2.2: Concentraciones de soluciones de NaCl y PEG 8000 con presiones osmóticas equivalentes.

NaCl (mM)	(-) Mpa	PEG 8000 (%)	(-) Mpa
25	0,47	5,0	0,44
50	0,55	8,5	0,55
100	0,66	11,3	0,66
150	0,85	15,0	0,84
200	1,06	18,5	1,06

2.6 Actividades enzimáticas.

2.6.1 Actividad Superóxido dismutasa.

Fue determinada según lo descrito por Beauchamp y Fridovich (1971). Una unidad SOD fue definida como la cantidad de enzima capaz de inhibir al 50 % la fotoreducción del nitroblue tetrazolium (NBT), usando riboflavina y luz de 360 nm como fuente de superóxido. La mezcla de reacción estuvo compuesta por buffer K_2HPO_4 50 mM pH 7,8; 777 μ M metionina, 448 μ M NBT; 0,54 μ M EDTA y 3,32 μ M riboflavina. En ausencia de enzima (testigo) la mezcla fue calibrada para alcanzar un valor de $DO_{560} = 0,41$ medida en espectrofotómetro Beckman Coulter DU640B, luego de 11 min de incubación en luz con longitud de onda = 360 nm a 25 °C. Se utilizaron aproximadamente 4 μ g de extracto proteico bacteriano para medir la actividad SOD.

2.6.2 Actividad Catalasa.

Se determinó en espectrofotómetro midiendo la desaparición de H_2O_2 a partir de la disminución de absorbancia a 240 nm por el lapso de 1 min a 37 °C. Se utilizó para un volumen de 1 mL de reacción, buffer K_2HPO_4 pH 7,4 50 mM (CF), H_2O_2 5 mM (CF), 20 μ L de extracto celular y H_2O para llevar a volumen final.

2.6.3 Actividad Glutación reductasa.

Se determinó espectrofotométricamente según lo propuesto por Shaedle y Bassham (1977), siguiendo el decrecimiento en la absorbancia 340 nm, inducido por la oxidación del

NADPH a 37 °C. La mezcla de reacción para 1 mL volumen final estuvo compuesta por: buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.8 NADPH 0.15 mM, GSSG 0.5 mM, MgCl₂ 3 mM, EDTA 1 mM y 20 µL de muestra. Las unidades GR se expresan como µmoles de NADPH oxidado por min.

2.7 Zimogramas.

2.7.1 Zimogramas de SOD.

La actividad SOD se observó en electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes (ND-PAGE). El gel se incubó en una solución de 2,5 mM de NBT en agua durante 25 min. Se enjuagaron los geles con agua destilada y se realizó una segunda incubación en 20 mL de buffer KH₂PO₄ 25mM pH 7,8; TEMED 10 mM y riboflavina 3,32 µM por 20 min. Para el revelado, los geles fueron enjuagados con agua destilada y fueron expuestos a luz blanca hasta la visualización de las bandas por el desarrollo de azul de formazán, excepto en las zonas del gel en donde está presente la enzima. Para el revelado de la actividad MnSOD los geles ND fueron incubados previamente en una solución de H₂O₂ 20 mM durante 30 min. Luego de este tiempo se enjuagaron los geles con agua y se procedió al revelado de SOD.

2.7.2 Zimogramas de CAT.

Para el revelado de la actividad catalasa en ND-PAGE se realizaron tres lavados de 15 min con agua. Luego se realizó una incubación con H₂O₂ 10 mM durante 20 min a temperatura ambiente y se enjuagó con abundante agua. Finalmente se vertieron sobre el gel las soluciones de Fe(III)Cl₃ 1 % y C₆N₆FeK₃ 1 % preparadas separadamente y luego mezcladas en una relación 1:1. Se incubó el gel por 5 min hasta lograr la visualización de las bandas. La reacción se detuvo enjuagando el gel con agua.

2.7.3 Zimograma de GR.

El revelado de GR en ND-PAGE se llevó a cabo con 10 mL de solución de revelado conteniendo concentraciones finales Tris-HCl pH8 250 mM, EDTA 3 mM, MgCl₂ 3 mM, GSSG 4mM, NADPH 0,3 mM, DPIP 1 mg y 1 mg de MTT. La incubación se llevó a cabo hasta evidenciarse la actividad enzimática.

2.8 Ensayo de nodulación y aislamiento de rizobios a partir de nódulos radicales.

Semillas de *L. japonicus* ecotipo MG20 o *M. sativa* variedad PROINTA Súper Monarca fueron desinfectadas y germinadas como se indicó más arriba. Las plántulas de dos días fueron

trasplantadas a sobres para cultivo de plantas (pouches) con medio ByD sin nitrógeno (Broughton y Dilworth, 1971), (10 plántulas por sobre) y crecidas en cámara de cultivo con fotoperíodo de 16 h, intensidad de luz de 150-200 $\mu\text{moles}/\text{m}^2/\text{s}$ mantenidas a una temperatura de 26 ± 2 °C.

Plántulas de 5 días de *L. japonicus* y *M. sativa* fueron inoculadas con 300 μL de un cultivo de *M. loti* y *S. meliloti* crecidas en medio YEM y TY respectivamente, en fase exponencial tardía de crecimiento ($\text{DO}_{600} = 1$).

Las bacterias recolectadas por centrifugación a 3500 xg por 10 min fueron lavadas dos veces con agua destilada estéril, y el pellet bacteriano fue resuspendido en 3 mL de agua. Para cada tratamiento, se inocularon 9 plantas.

Cuando fue necesario recuperar los rizobios a partir de nódulos, éstos fueron cosechados a los 25 días post inoculación (dpi), siendo separados de la raíz (dejando aproximadamente 1 mm de tejido radical próxima al nódulo). Los nódulos fueron desinfectados superficialmente con hipoclorito de sodio al 5 % por 10 min en agitación suave y luego se enjuagaron 10 veces con agua en condiciones estériles.

Los nódulos fueron macerados en placa de Petri con vara de vidrio manteniendo las condiciones de esterilidad. Dicho macerado fue utilizado para sembrar en estrías por agotamiento con ansa en rulo en medio sólido TY modificado suplementado con antibiótico apropiado.

2.9 Evaluación de la simbiosis en estrés salino.

Los ensayos de simbiosis en estrés salino fueron llevados a cabo en pouches embebidos con medio ByD complementados con 150 mM NaCl para *M. loti* y 200 mM NaCl para *M. sativa*. Pasadas las 24 horas, se reemplazó el medio nutritivo ByD por ByD suplementado con NaCl y se inocularon 48 horas más tarde como se describió más arriba con cultivos bacterianos crecidos con el antibiótico apropiado.

2.10 Transformación de rizobios por conjugación biparental.

Se cultivaron las cepas de *E. coli* S17-1 transformadas por electroporación con los plásmidos pFAJ1708 y pFAJsod, en medio LB con Tc 10 µg/mL. Al mismo tiempo, las células receptoras de *S. meliloti* 2011 fueron crecidas en medio mínimo TY. Los distintos cultivos fueron incubados a 37 °C o 28 °C hasta una DO₆₀₀ de 0,8 para *E. coli*, y una DO₆₀₀ de 0,6 para los rizobios. Los cultivos fueron centrifugados a 4.500 xg, lavados tres veces con buffer PBS estéril (apéndice) y resuspendidos en 300 µL de la misma solución.

Para las conjugaciones se depositaron 50 µL de cada una de las cepas (una sobre la otra) en placa de Petri con medio TY sin antibiótico e incubadas a 28 °C durante 48 horas. Los rizobios transconjugantes fueron seleccionados en medio TY suplementado con Tc 20 µg/mL y con rojo Congo para su identificación por la coloración diferencial que no es adquirida por los rizobios.

2.11 Amplificación de ADN

La amplificación de genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo utilizando como molde el ADN cromosómico de la cepa *M. loti* MAFF303099 o ADN plasmídico. Para las mezclas de amplificación se usó una concentración de primers de 0,25 µM de cada uno; MgCl₂ 2 mM; dNTPs 0,2 mM; buffer Taq 10X; Taq polimerasa 0,05 U/µL y agua Mili-Q estéril para completar un volumen final de 20 µL.

2.12 Diseño de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos mostrados en la tabla 2.3 fueron diseñados a partir de la secuencias del gen codificante para SOD, *mlr7636* según el genoma de *M. loti* MAFF303099 publicado en <http://genome.kazusa.or.jp>, con excepción de los oligonucleótidos PFAJ2Fw y PFAJ2Rv que fueron diseñados sobre un fragmento de 477 nucleótidos obtenido en los secuenciamientos del vector pFAJsod, y fueron utilizados para la detección de insertos en el sitio de múltiple clonado del vector pAJ1708.

Tabla 2.3: Secuencias de los oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótidos (5' – 3')	Secuencia	Fuente
SOD- <i>Xba</i> I-Fw	ATATTCTAGACCACGAGGGAGTACTACCCATGG	Este estudio.

SOD- <i>Bam</i> HI-Rv	ATATGGATCCTCACTTTGCCTTTTCGTAGAGC	Este estudio.
SODmtFw	ATATGAATTCTCGACAATGGCAACAAGCTGGC	Este estudio.
SODmtRv	ATATGGATCCAACCGAACTGCGTCGTGC	Este estudio.
PFAJ2Fw	TAAAGGGAAAGCGGAACACGTAG	Este estudio.
PFAJ2Rv	CCCATCGCTTTCCACAACG	Este estudio.
M13 Fw (-20)	GTAAAACGACGGCCAGT	Universal.
M13 Rv (-24)	AACAGCTATGACCATG	Universal.

Los oligonucleótidos fueron diseñados teniendo en cuenta los parámetros descritos por Sambrook y Russell (2001), y analizados con el programa AmplifX 1.1.4 con los parámetros por defecto.

2.13 Construcción de vector pFAJsod para la sobreexpresión constitutiva del gen sod.

El plásmido pFAJsod para la sobreexpresión constitutiva del gen *sod* (*mlr7636*) de *M. loti* se obtuvo mediante la amplificación y clonado de un fragmento de 639 pb a partir de ADN genómico de *M. loti* MAFF303099. Para la amplificación se utilizó la enzima *Pfx* polimerasa (Invitrogen), la cual posee actividad exonucleasa 3'-5' con el juego de primers SOD-*Xba*I-Fw y SOD-*Bam*HI-Rv diseñado a partir de las secuencias corriente arriba y corriente abajo del gen *mlr7636* obtenidas en la base de datos genome.microbedb.jp/rhizobase.

El producto de PCR de 639 pb con extremos romos fue ligado al vector pK18mob previamente digerido con la enzima de restricción *Sma*I. Los extremos romos generados por esta enzima de restricción permitieron la ligación del fragmento recombinante e interrumpió el gen *lacZ*, lo que una vez transformados en células de *E. coli* DH5 α permitió la selección de los clones recombinantes con el plásmido pK18mob::*sod*.

La presencia de la secuencia del gen *mlr7636*, se evaluó inicialmente usando los primers universales M13. El sentido del inserto en los clones recombinantes pK18sod se evaluó utilizando el juego de primers M13 Fw/SOD-*Bam*HI-Rv (Figura 2.1). De los clones seleccionados se procedió a subclonar un fragmento de 631 nucleótidos escindido con las enzimas *Xba*I y *Bam*HI (Figura 2.2 A) y el plásmido pFAJ1708 (Dombrecht et al., 2001) digerido con las mismas enzimas (Figura 2.2 B).

El fragmento escindido y el plásmido linealizado fueron purificados a partir de una corrida electroforética en gel de agarosa y ligados con la enzima T4 ADN ligasa.

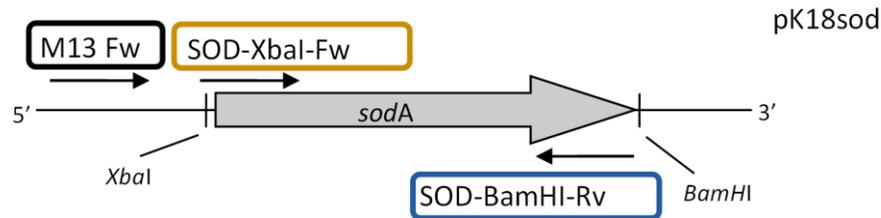


Figura 2.1: Esquema del sentido de clonado del gen *sodA* en el vector pK18sod en donde se muestra la ubicación del primer M13 forward hacia el extremo 5' de *sod*.

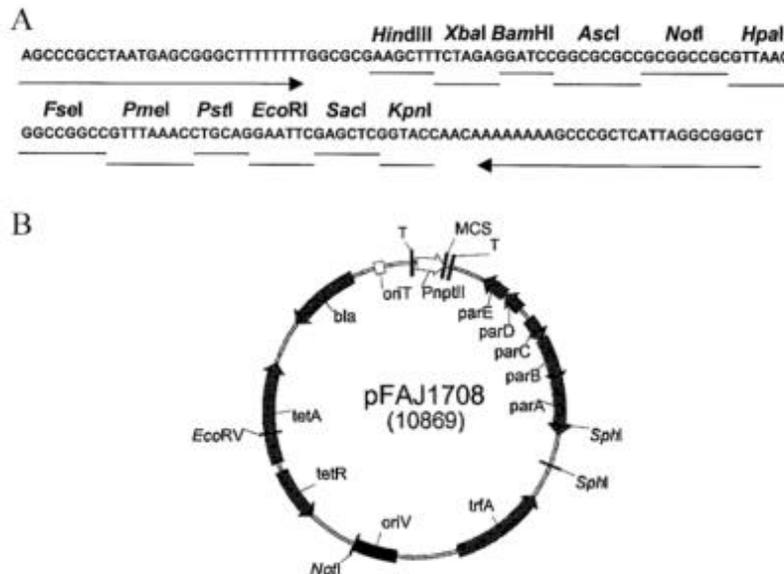


Figura 2.2: A) Secuencias para enzimas de restricción del sitio de múltiple clonado del plásmido pFAJ1708. B) Mapa físico del plásmido pFAJ1708. Esquemas tomados de Dombrecht et al. (2001).

2.14 Construcción del vector pSODmut para la mutación del gen *mlr7636*.

La base del vector pSODmut para la mutación del gen *mlr7636* de es el vector suicida pK18mob. Este plásmido posee un sitio de múltiple clonado en el gen *lacZ* corriente abajo de

una secuencia de unión a ribosoma que se corresponde a genes *fix* y *nif* de *R. leguminosarum*. Corriente abajo del sitio de múltiple clonado contiene codones de parada en todos los marcos de lectura para prevenir posibles fusiones traduccionales.

Un fragmento de 267 nucleótidos fue amplificado por PCR a partir del gen *mlr7636* con los primers SODmtFw y SODmtRv que incorporan los sitios *EcoRI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3' respectivamente. Los fragmentos amplificados y el vector fueron digeridos con *EcoRI/BamHI* para hacer las respectivas ligaciones a fin de obtener los vectores pSODmut.

2.15 Restricciones enzimáticas de ADN.

Las digestiones del ADN plasmídico y genómico con las diferentes endonucleasas de restricción (Fermentas), se realizaron en un volumen final de 20 μ L en las condiciones recomendadas por los fabricantes. La inactivación de las enzimas fue realizada incubando la reacción a 70 °C por 10 min.

2.16 Extracción de proteínas totales.

Las bacterias fueron cultivadas en 3 mL de medio de cultivo hasta alcanzar una DO_{600} aproximada a 1. Los cultivos fueron centrifugados y lavados dos veces con buffer KH_2PO_4 50 mM pH 7,8. Finalmente las bacterias fueron resuspendidas en 300 μ L del mismo buffer. La suspensión bacteriana fue sonicada en baño agua-hielo utilizando la micropunta del equipo Ultrasonic Vibracell VCX600. Las condiciones de sonicado para células de *E. coli* fueron: pulsos de 2 s, con una interrupción de 3s. El tiempo de sonicado total fue de 40s y se utilizó una amplitud de 30 %. Para el sonicado de células de *M. loti* se usó el siguiente programa: pulsos de 3 s con descanso de 3 s por un tiempo de 2 min a una amplitud de 33 %. Los extractos fueron centrifugados a 4 °C por 20 min a 13.000 xg obteniendo en el sobrenadante el extracto proteico soluble.

2.17 Extracción de proteínas periplásmicas.

Las células fueron cultivadas en 100 mL de cultivo líquido hasta una DO_{600} de entre 0,3 y 0,5. Se cosecharon las células por centrifugación a 15.000 xg por 10 min a 4 °C y se resuspendieron en 10 mL de solución fisiológica NaCl 0,9 % (P/V). La preparación de las proteínas periplásmicas por shock hipoosmótico se realizó según el procedimiento de Neu y Heppel (1965) sin el agregado de EDTA. Brevemente, las células fueron resuspendidas en 2 mL de solución hiperosmótica [sacarosa 20 % (P/V) en Tris-HCl 30 mM pH 8.0] con 0,2 U/mL de lisozima. La suspensión bacteriana fue incubada en hielo durante 1 h. Finalmente se agregaron 2 mL de agua destilada a 4 °C y se centrifugaron las muestras a 14.000 xg durante 30 min recuperando el sobrenadante con las proteínas periplásmicas.

2.18 Identificación de SOD por Western blot.

Cultivos bacterianos de 100 mL fueron tratados para la obtención de extracto periplásmico mientras que las proteínas totales fueron obtenidas a partir de 6 mL cultivo mediante lisado por sonicado. Los extractos fueron mezclados con buffer de siembra con 5 % de β -mercaptoetanol y calentados a 100 °C durante 5 min. Las muestras se sembraron en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12 %. Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa a 100 V durante 2 h. Para evitar uniones inespecíficas entre el anticuerpo primario y las proteínas retenidas en la membrana, se realizó un bloqueo de esta última con la solución tris buffer salino (TBS) 1X, conteniendo 0,1% Tween 20 y 5 % albúmina sérica bovina (BSA) durante dos horas con agitación y a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (Tabla 2.4) se agregó en solución de bloqueo TBS 1X, 0,1 % Tween 20, 5 % BSA a 4 °C durante 16 h. Después de cuatro lavados de 10 min a temperatura ambiente con TBS 1X, 0,1 % Tween 20, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con fosfatasa alcalina, disuelto en la solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron cuatro lavados de 10 min con TBS 1X, 0,1 % Tween 20 a temperatura ambiente. Luego de la incubación con el anticuerpo secundario (Tabla 2.5), la membrana se lavó dos veces con TBS 1X, 0,1 % Tween 20 durante 10 min, y se incubó en oscuridad con una mezcla de NBT (5 mg/mL) y BCIP (5 mg/mL) en buffer para fosfatasa alcalina (Tris-Cl 100 mM pH 9,5, $MgCl_2$ 5 mM y NaCl 100 mM). La reacción se desarrolló en oscuridad y a temperatura ambiente hasta la detección de las bandas.

Tabla 2.4: Anticuerpos primarios y secundarios usados para Western blot.

Proteína	Anticuerpo	Especie	Dilución
FeSOD	Anti FeSOD Agrisera (primario)	Conejo	1:1500
	Anti-rabbit AP (secundario)	Cabra	1:5000
MnSOD	Anti MnSOD (SOD2) Santa Cruz (primario)	Cabra	1:1500
	Anti Goat AP (secundario)	Conejo	1:5000
CuZn-SOD	Anti CuZnSOD	Conejo	1:1500
	Anti-rabbit AP (Secundario)	Cabra	1:5000

2.19 Cuantificación de proteínas.

La estimación de proteínas totales se realizó según Lowry et al. (1951), utilizando BSA como estándar de calibración.

2.20 Electroforesis de proteínas en geles desnaturizantes.

La electroforesis de proteínas (PAGE) en condiciones desnaturizantes se realizó en geles de poliacrilamida según el método de Laemli (1970), utilizando geles de acrilamida de 12 % en presencia de SDS. La electroforesis en condiciones no desnaturizantes se realizó de la misma manera pero omitiendo el SDS en todas las soluciones. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250 según el método de (Meyer y Lamberts, 1965).

2.21 Electroforesis en geles nativos ND-PAGE.

La separación de proteínas por electroforesis en condiciones no desnaturizantes (ND-PAGE) se realizó en un sistema de gel discontinuo conformado por un poro grueso compuesto por acrilamida: bisacrilamida 10:0,2 al 4 % P/V, y un poro fino realizado con acrilamida 30:0,8 al 13 % P/V. El buffer de corrida Tris Glicina pH 8,3 10 X fue preparado con 30 g de Tris base y 144 g de glicina en un volumen final de 1000 mL. Se sembraron 15 µg de proteínas totales en buffer muestra 4 X para cada ensayo. Para 8 mL de buffer muestra 4 X se mezclaron 6,2 mL de agua destilada, 1 mL de buffer Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 y 0,8 mL de glicerol. Para los zimogramas, la corrida electroforética se realizó a 4 °C.

2.22 Cálculo del peso molecular de proteínas.

Imágenes fotográficas de los geles fueron captadas con cámara réflex Nikon D3100. Los pesos moleculares de las bandas de interés, en geles SDS-PAGE, fueron calculados con software ImageJ a partir de la calibración con los pesos moleculares del marcador de peso molecular. Este cálculo fue realizado de forma individual para cada gel.

2.23 Análisis de la estructura primaria de la secuencia *mlr7636*.

Para la identificación de péptido señal en la secuencia aminoacídica se utilizaron las herramientas bioinformáticas SignalP 4.1 para bacterias Gram negativas (Petersen et al., 2011), TatP 1.0 (Bendtsen et al., 2005), TATFIND y SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Los análisis de predicción fueron realizados aplicando los modelos networks (NN) y hidden Markov (HMM) para bacterias Gram-negativas. La identificación de las proteínas homólogas a SOD se realizó usando la información disponible en <http://genome.annotation.jp/rhizobase> con el programa BLASTP, utilizando el algoritmo PSI-BLAST (del inglés Position-Specific Iterated BLAST) en el sitio web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLASTp/>).

2.24 Determinación de tolerancia a estrés oxidativo.

La tolerancia a $\cdot\text{O}_2^-$ se evaluó determinando la viabilidad (UFC/mL) de cultivos bacterianos expuestos durante 30, 60 y 120 min a 1 mM de H_2O_2 y a $\cdot\text{O}_2^-$ generado por la oxidación de xantina por la enzima xantina oxidasa (Melillo et al., 2009). Se cultivaron las bacterias hasta una $\text{DO}_{600} = 0,5$ en medio YEM. Las bacterias fueron centrifugadas y resuspendidas en buffer PBS estéril a una concentración de 1×10^9 UFC/mL y tratadas con hipoxantina 250 μM y xantina oxidasa 0,1 U/mL a 28 °C. Para discriminar el efecto de $\cdot\text{O}_2^-$ del H_2O_2 generado por la actividad SOD, se añadió catalasa bovina (1 U/mL) a la reacción de hipoxantina/xantina oxidasa. En todos los tratamientos se realizó el recuento de colonias en medio TY pasadas 48 h de incubación.

2.25 Evaluación del crecimiento de plantas.

El crecimiento de las plantas fue evaluado en condición control en medio ByD y también en presencia de NaCl utilizando 150 mM y 200 mM para *L. japonicus* y *M. sativa*

respectivamente. Transcurridos 25 días de la inoculación con los rizobios, se determinaron las variables altura de la planta, longitud radical, peso fresco y seco de parte aérea (PFA y PSA), peso fresco y seco radical (PFR y PSR).

Al momento de la cosecha, se tomó la altura y longitud radical. Posteriormente se separó la parte aérea de la radical, y una vez pesado el tejido fresco, se colocó individualmente en sobres de papel en estufa a 70 °C durante 72 h para obtener el peso seco.

El estado hídrico de las plantas fue estimado en términos de contenido hídrico (CH), expresado como porcentaje del peso fresco (PF) según la fórmula: $CH (\%) = [(PF-PS) / PF] \times 100$ siendo PF: peso fresco y PS: peso seco (Azcón-Bieto y Talón, 2013).

2.26 Análisis filogenético.

La construcción del árbol filogenético se realizó a partir de las secuencias aminoacídicas que presentaron valores de identidad superiores a 50 % con la secuencia SOD de *M. loti* MAFF303099. Las secuencias fueron alineadas utilizando el programa Lasergene 8.0.2 software package (DNASTAR, Inc., Madison, WI, USA). Un análisis filogenético fue realizado con el software Mega 5.2 (Tamura et al., 2011) por el método de distancia del vecino más cercano Neighbor-Joining producido por máxima probabilidad, modelo GTR (general time reversible) con G+I (invariant sites and distributed range) y 1000 repeticiones.

2.27 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm error estándar de las réplicas independientes. En los análisis de los ensayos de inoculación con las cepas sobreexpresoras en condiciones control y de estrés salino, se consideró el efecto del tratamiento y la interacción cepa por tratamiento. Los test de diferencias de medias (DGC) se realizaron utilizando el programa InfoStat/Profesional ver. 2013p, Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina, (Di Rienzo et al., 2011).

Capítulo 3: Efecto del estrés salino y osmótico sobre la inducción de enzimas antioxidantes de *M. loti* y generación de plásmido para la sobreexpresión de SOD

En este capítulo se muestran en primer lugar los resultados de la influencia de los estreses salino y osmótico sobre el crecimiento y las actividades enzimáticas antioxidantes de *M. loti*, y posteriormente la construcción del vector para la sobreexpresión y mutación del gen *mlr7636*.

3.1 Efecto del estrés salino y osmótico sobre el crecimiento de *M. loti*.

Los cultivos de *M. loti* MAFF303099 crecidos en medio YEM en condiciones de estrés salino (150 mM NaCl) y de estrés osmótico (15 % PEG) presentaron curvas de crecimiento diáuxico con la ocurrencia de una segunda fase lag entre las 40 y 48 h de incubación tanto en la condición control, como en ambos estreses (Figura 3.1). Sin embargo, a pesar de que en los tres tratamientos se encontró el mismo comportamiento diáuxico, se pudo observar que el crecimiento de *M. loti* se vio fuertemente afectado por el estrés osmótico.

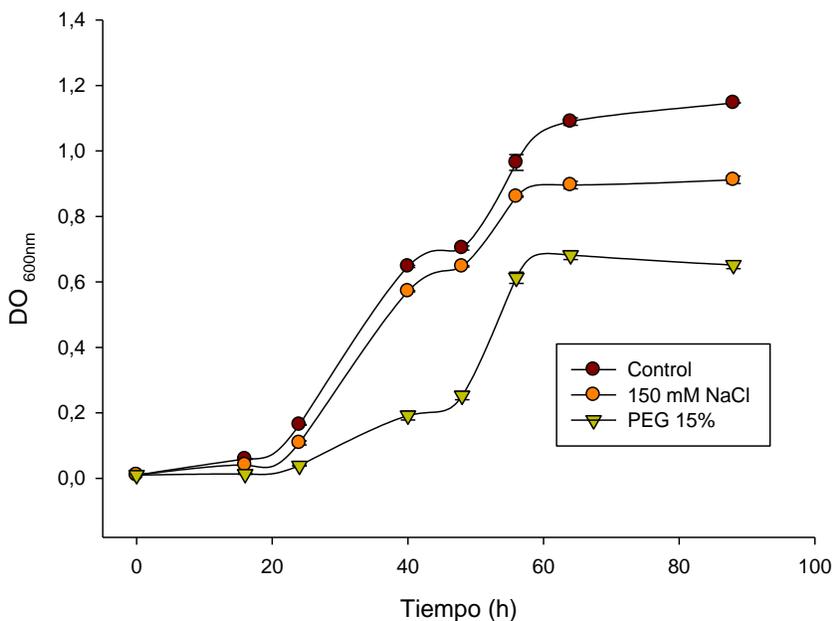


Figura 3.1: Crecimiento de *M. loti* en medio YEM en condiciones de estrés salino causado por 150 mM NaCl y de estrés osmótico generada por PEG 15 %. Los datos representan la media \pm E.E. de tres repeticiones. n=3:

3.2 Efectos del estrés salino y osmótico sobre el sistema antioxidante enzimático de *M. loti* MAFF303099.

La evaluación de la actividad del sistema antioxidante enzimático de *M. loti* se realizó a las 72 h de crecimiento. Se determinaron las actividades SOD, CAT y GR.

La actividad específica SOD (Ae SOD) mostró un incremento significativo de 3,8 veces en presencia de NaCl 150 mM. Por el contrario, los valores de Ae SOD se redujeron 0,4 veces en estrés osmótico respecto al control sin estresar (Tabla 3.1). La actividad Ae CAT mostró un incremento significativo de 2,5 y 3,5 veces, en presencia de NaCl 150 mM y PEG respectivamente. Por último, la Ae GR no mostró diferencias significativas respecto al control en los tratamientos aplicados (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Actividad de las enzimas antioxidantes CAT, SOD y GR de *M. loti*.

Condición	Ae CAT	Veces	Ae SOD	Veces	Ae GR	Veces
Control	0.02±0.00 a	1,0	0.32±0.02 a	1,0	0.03±0.00 a	1,0
NaCl 150 mM	0.05±0.01 b	2,5	1.23±0.05 b	3,8	0.04±0.00 a	1,3
PEG 15 %	0.07±0.01 b	3,5	0.13±0.02 c	0,4	0.04±0.00 a	1,3

Los valores representan la media ± E.E. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$ DGC test). n=3.

3.3 Sobreexpresión de SOD.

Para sobreexpresar la SOD en *M. loti*, se clonó el gen *sod* de *M. loti* MAFF303099 (*mlr7636*, único gen encontrado en el genoma secuenciado y publicado de esta cepa que codifica para una proteína con actividad SOD) en el vector de expresión pFAJ1708 (Dombrecht et al., 2001). Este plásmido porta el promotor constitutivo del gen de resistencia a neomicina denominado *ntpII* seguido por un sitio de múltiple clonado. Por PCR de ADN genómico se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 639 pb que contiene el gen *mlr7636* (Figura 3.2).

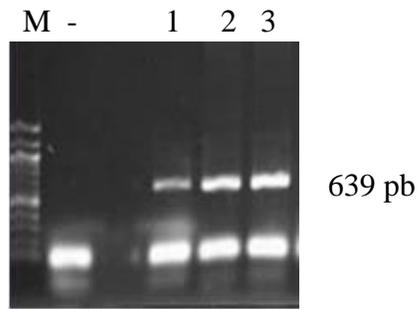


Figura 3.2: Amplificación de *sod* por PCR a partir de ADN genómico de *M. loti* MAFF303099. 1) Marcador de peso molecular. 1-3) producto de amplificación de aproximadamente 639 pb.

El fragmento de 639 pb pudo ser ligado al vector pK18mob previamente digerido con la enzima de restricción *SmaI* interrumpiendo el gen *lacZ*, obteniendo el plásmido pK18mob:*sod* (Figura 3.3). La interrupción del gen *lacZ* permitió la selección de clones recombinantes a partir de colonias blancas de *E. coli* DH5 α transformadas y crecidas en medio con X-Gal e IPTG. Por otro lado, la presencia de secuencias de reconocimiento para los primers universales M13 que flanquean al sitio de múltiple clonado (SMC) permitieron el análisis por secuenciamiento del fragmento recombinante.

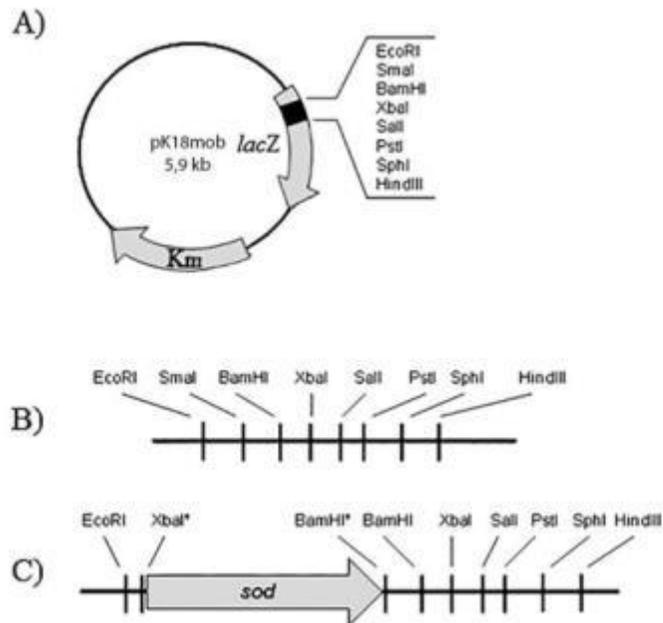


Figura 3.3: Esquema de clonado del gen *mlr7636* de *M. loti* MAFF303099 en el vector pK18mob en el sitio *SmaI*. A) Mapa físico del vector pK18mob con el SMC ubicado en el gen *lacZ*. B) Detalle del SMC del vector pK18mob antes de la digestión con *SmaI* y clonado del inserto. C) Esquema de la integración del inserto en el sitio *SmaI* del SMC. Con * se muestran los sitios de corte introducidos con los primers.

El análisis *in silico* por medio de BLASTN aplicado a la secuencia del inserto clonado en el vector pK18::*sod* secuenciado con los primers universales M13 permitió confirmar que el fragmento clonado de 639 pb en el vector pK18*sod* se corresponde con la secuencia del gen *mlr7636* de *M. loti* MAFF303099 publicada en el banco de datos de Rhizobase (Fujisawa et al., 2014). La comparación de la secuencia obtenida con la publicada arrojó un 100 % de concordancia (Figura 3.4).

```

ATGGCTTTTGAATTGCCGCTCTGCCCTACGACTATGAGGCCTTGCAGCCTTACATGTCG
AAAGAGACGCTGGAATATCACCACGACAAGCATCACAAGGCCTATGTGCGACAATGGCAAC
AAGCTGGCTGCCGAGGCCGGAATGGGTGATCTGTCTGGTTCGAAGAGGTGGTCAAGCAGTCG
TTCGGCAAGAATGCCGGTCTCTTCAACAATGCCGCGCAGCACTACAATCACATCCATTTT
TGGAAGTGGATGAAGAAGGGCGGCGGCGCAACAAGCTGCCGGCCGCGCTGCAGAAGGCT
TTCGACAGCGATCTGGGCGGCTACGACAAGTTCAAGGCTGATTTTGTGCGCCGCCGGCACG
ACGCAGTTCGGTTCGGGCTGGGCCTGGGTGTCCGTCAAGGACGGCAAGCTGGCGATCTCG
AAGACCCCGAACGGCGAAAATCCGCTCGTTCATGGCGCCTCACCGATCCTCGGCGTCGAC
GTCTGGGAACACTCCTATTACATCGACTACCGCAACGCCCGCCCGAAATATCTCGAGGCC
TTCGTCGACAGCCTGATCAACTGGGATCATGTGCTGGAGCTCTACGAAAAGGCAAAGTGA

```

Figura 3.4: Secuencia del gen *mlr7636*. Se muestran los 600 pb del gen. En negrita el codón de inicio y el de parada.

Con el primer par de primers se pudieron identificar los clones recombinantes pK18sod 1 y 6 que contenían el inserto de interés en el sentido correcto (Figura 3.5 A). Paralelamente, este resultado fue corroborado, con la combinación de primers M13 Fw y SOD-XbaI-Fw que amplifican una secuencia de aproximadamente 600 pb cuando el inserto tiene la orientación inversa (pK18sod identificados como 2', 3' y 4') (Figura 3.5 B). Por lo tanto los clones 1 y 6 fueron utilizados como molde para la obtención del gen *sod* flanqueado con los sitios *XbaI* y *BamHI*.

El vector pFAJsod, se obtuvo subclonando el fragmento conteniendo SOD a partir del plásmido pK18sod digerido con las enzimas *XbaI/BamHI*, en el vector pFAJ1708 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción.

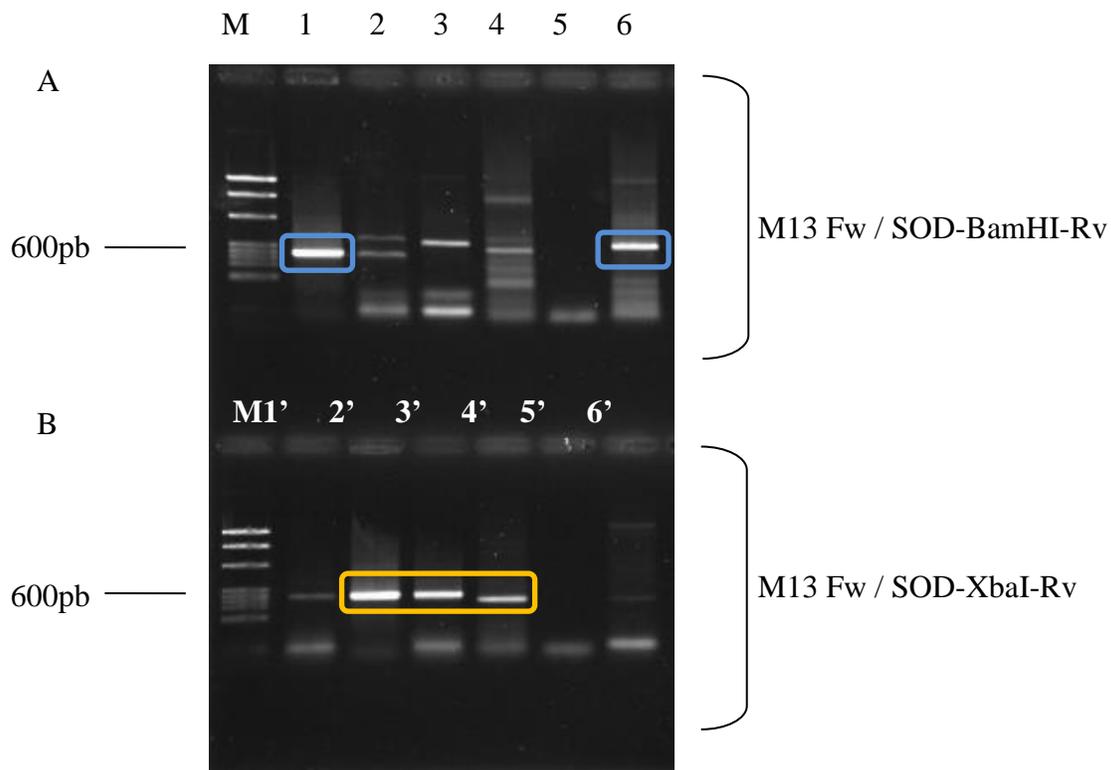


Figura 3.5: Identificación de clones pK18sod con inserto en el sentido correcto. Electroforesis de fragmentos amplificados por PCR a partir del vector pK18sod. En las calles superiores (A) se muestran los productos de amplificación obtenidos con el primer universal M13 Fw y el primer específico SOD-BamHI-Rv: M) Marcador de PM ADN Sc3 digerido con la enzima *HindIII*. 1 y 6 muestran los productos de amplificación en la orientación y tamaño esperado. En las calles inferiores (B) se muestran los productos de amplificación en las calles 2', 3' y 4' con el juego de primers M13Fw y SOD-XbaI-Fw indicando la orientación inversa del inserto.

Finalmente, los plásmidos recombinantes fueron identificados por PCR utilizando los primers específicos para *sodA*. Dos clones recombinantes fueron obtenidos: pFAJsod clon 4 y pFAJsod clon 9, los cuales fueron posteriormente corroborados por secuenciamiento con los primers específicos para *sodA* (Figuras 3.6 y 3.7).

Como resultado de la secuenciación, fue posible conocer los 443 nucleótidos corriente arriba y 59 nucleótidos corriente abajo propias de la secuencia del plásmido pFAJ1708 que se

encuentran flanqueando al marco de lectura del gen *mlr7636*. Esta información es de suma importancia teniendo en cuenta que el plásmido pFAJ1708 no está secuenciado y que sólo se conoce su sitio de múltiple clonado. Conocer la secuencia que flanquea al inserto permitió corroborar que nuestro inserto se encontraba en marco de lectura con el promotor *ntpII* y también permitió el diseño de primers sobre el plásmido para la búsqueda de clones de *M. loti* recombinantes con sobreexpresión homóloga luego de la transformación con pFAJsod.

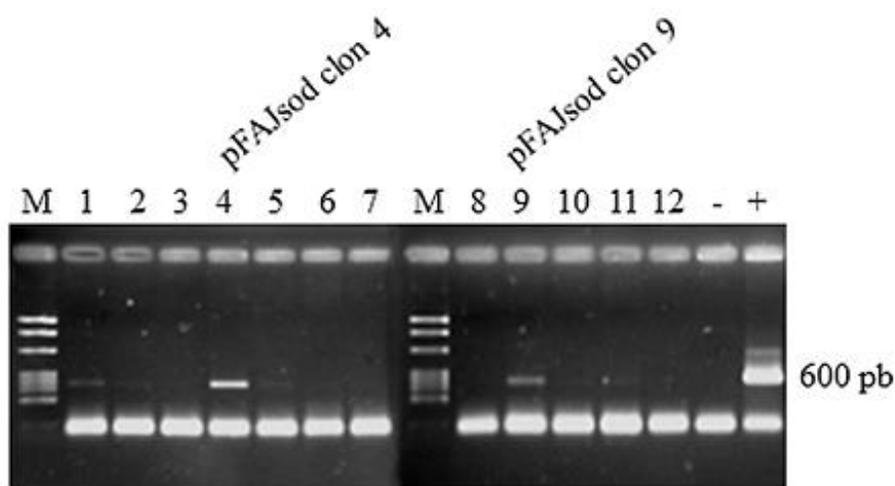


Figura 3.6: Amplificación de *mlr7636* del vector pFAJsod. Electroforesis en gel de agarosa del gen *sod* amplificado por PCR a partir del producto de ligación pFAJ1708 con *sodA*. M) Marcador de PM ADN Sc3 restringido con la enzima *HindIII*. 4 y 9) clones positivos para *sodA* en pFAJsod (clones 4 y 9).

```

GTTATGACCATGATTAACGCCAAAGCTGGGCGCGTTAAGCCCCGGCTAATGAGCGGGCT
      HindIII
TTTTTTTGGCGCGAAGCTTCACGCTGCCGCAAGCACTCAGGGCGCAAGGGCTGCTAAA
GGGAAAGCGGAACACGTAGAAAAGCCAGTCCGCAGAAACCGGTGCTGACCCCCGGATG
AATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGACAAGGGAAAACGCAAGCGCAAAGAGAAAGCAGG
TAGCTTGCAGTGGGCTTACATGGCGATAGCTAGACTGGGCGGTTTTATGGACAGCAAG
CGAACCGGAATTGCCAGCTGGGGCGCCCTCTGGTAAGGTTGGGAAGCCCTGCAAAGTA
AACTGGATGGCTTTCTTGCCGCCAAGGATCTGATGGCGCAGGGGATCAAGATCTGATC
      XbaI      +
AAGAGACAGGATTCTAGACCACGAGGGAGTACTACCCATGGCTTTTGAATTGCCCGCT
CTGCCCTACGACTATGAGGCCTTGCAGCCTTACATGTGCGAAAGAGACGCTGGAATATC
ACCACGACAAGCATCACAAGGCCTATGTGACAATGGCAACAAGCTGGCTGCCGAGGC
CGGAATGGGTGATCTGTCGGTCGAAGAGGTGGTCAAGCAGTCGTTTCGGCAAGAATGCC
GGTCTCTTCAACAATGCCGCGCAGCACTACAATCACATCCATTTCTGGAAGTGGATGA
AGAAGGGCGGCGGGCGGCAACAAGCTGCCGGCCGCGCTGCAGAAGGCTTTTCGACAGCGA
TCTGGGCGGCTACGACAAGTTCAAGGCTGATTTTGTGCGCCGCCGGCACGACGCAGTTC
GGTTCGGGCTGGGCCTGGGTGTCCGTCAAGGACGGCAAGCTGGCGATCTCGAAGACCC
CGAACGGCGAAAATCCGCTCGTTCATGGCGCCTCACCGATCCTCGGCGTCGACGTCTG
GGAACACTCCTATTACATCGACTACCGCAACGCCCGCCCGAAATATCTCGAGGCCTTC
GTCGACAGCCTGATCAACTGGGATCATGTGCTGGAGCTCTACGAAAAGGCAAAGTGAG
      BamHI
GATCCGGCCGTTGTGGAAAGCGATGGGCTTGCCAGCGTCCGCTTGCACGGCGTCGTAA

```

Figura 3.7: Fragmento de secuencia que muestra la ubicación de *sodA* en el vector pFAJsod corriente abajo del promotor *nptII*. El sitio +1 indica el inicio de la transcripción, en negrita se destacan el codón de inicio y de parada respectivamente. Entre los sitios *HindIII* y *XbaI* se encuentra el promotor *nptII*.

La figura 3.8 A muestra el esquema de la estrategia seguida para la obtención del plásmido con sobreexpresión de *sod* pFAJsod. Además se muestran los mapas físicos de los plásmidos utilizados, junto a las enzimas de restricción involucradas y los sitios introducidos en el vector pK18mob por la utilización de los primers SOD-*XbaI*-Fw y SOD-*BamHI*-Rv para la amplificación de *mlr7636*. La figura 3.8 B muestra el mapa de restricción sobre el fragmento de

interés y los marcos de lectura abiertos correspondientes a los genes *mlr7636* y *parE* en un fragmento de 1511 pb del vector pFAJsod.

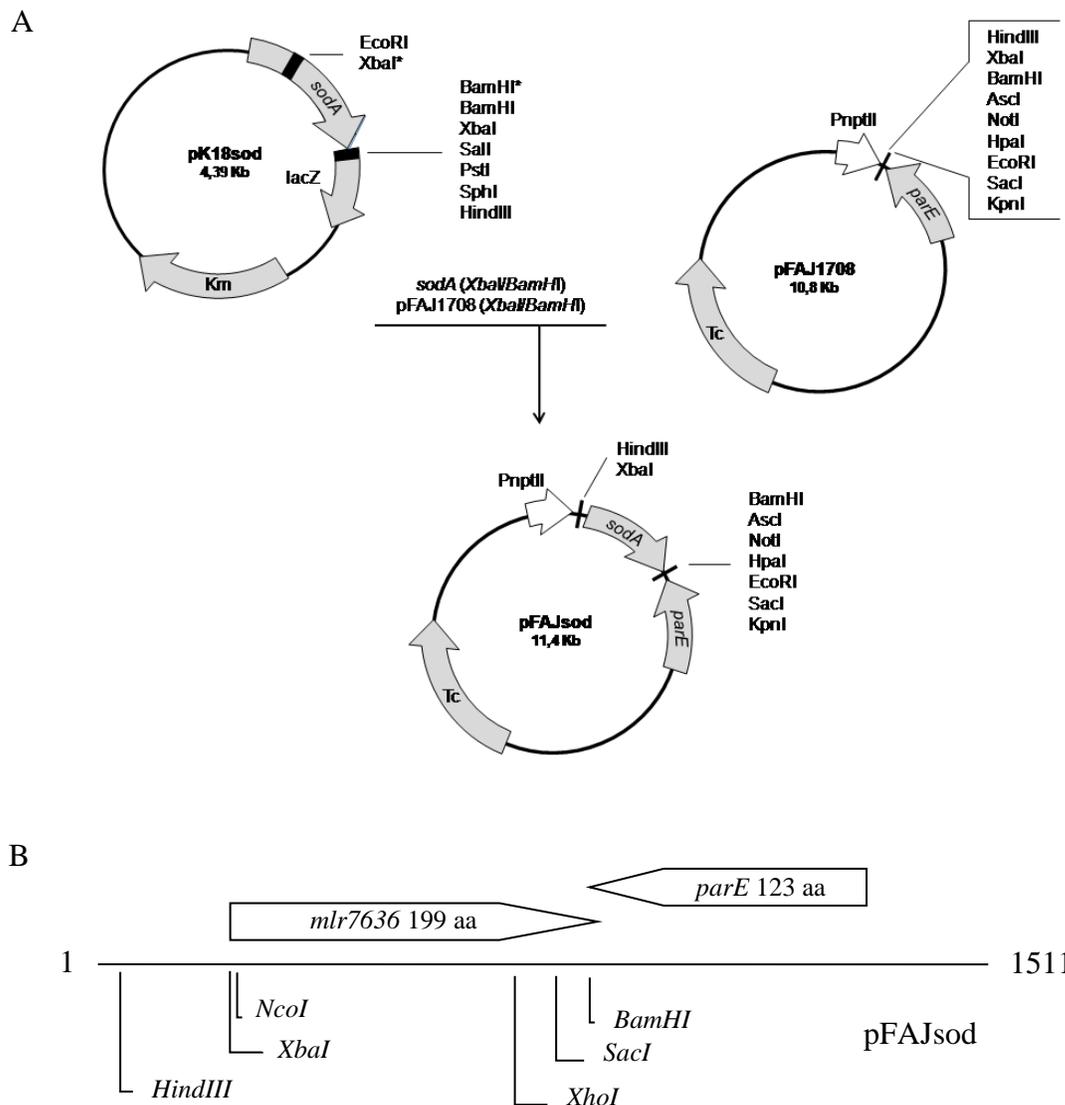


Figura 3.8: (A) Mapa físico de la construcción del vector pFAJsod. Las enzimas marcadas con asterisco en el vector pK18sod indican los sitios que fueron introducidos en el sitio *Sma*I de pK18mob. (B) Esquema deducido a partir del secuenciamiento de fragmento de 1511 pb en el vector pFAJsod que muestra mapa de restricción sobre fragmento de interés y los marcos de lectura abiertos correspondiente a *mlr7636* y *parE*.

3.4 Deleción del gen *mlr7363* por doble recombinación homóloga.

Para obtener una cepa de *M. loti* deficiente en SOD se propuso la interrupción insercional del gen *mlr7363* por doble recombinación homóloga utilizando el vector movilizable pK18mob. Fue posible el clonado de un fragmento de 267 pb correspondientes a una región interna del gen *mlr7363*, amplificado a partir de ADN cromosomal de *M. loti* MAFF303099 empleando los primers SODmtFw y SODmtRv que incorporan los sitios *EcoRI* y *BamHI* en los extremos 5' y 3' respectivamente (Figura 3.9). El fragmento de 267 pb fue clonado en los sitios *EcoRI/BamHI* del pK18mob previamente digerido con tales enzimas ubicados en el gen *lacZ*, obteniendo el plásmido pSODmut.

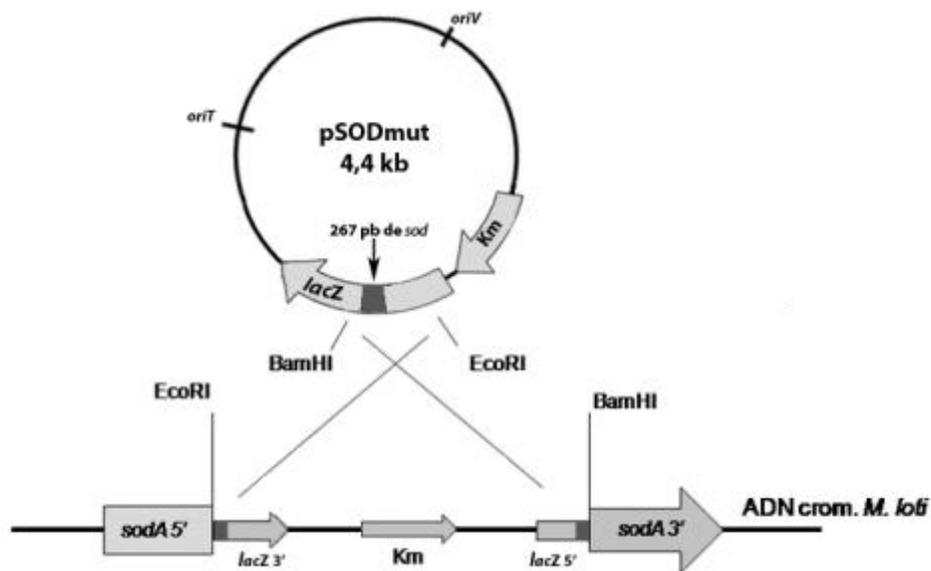


Figura 3.9: Esquema de generación de mutante SOD deficiente por integración del plásmido al cromosoma de *M. loti* por recombinación homóloga.

3.5 Discusión

Sequía y salinidad, son las principales causas de estrés que condicionan la productividad de los cultivos, y en consecuencia induce a las plantas a activar diferentes mecanismos fisiológicos para modular la economía de agua, carbono y nitrógeno. En tal sentido, ha sido descrito por Yang et al. (2009) y Morrissey et al. (2004), que la interacción de las plantas con distintos microorganismos benéficos que se encuentran en el suelo ayuda a mitigar los efectos adversos del estrés abiótico. Por consiguiente, la interacción de las leguminosas con microorganismos fijadores de nitrógeno toma especial interés para el adecuado funcionamiento fisiológico de las plantas hospedadoras (Foyer y Harbison, 1994; Smirnov, 1995).

3.5.1 Influencia del NaCl y PEG sobre el crecimiento de *M. loti*.

La inhibición de la fijación biológica de nitrógeno en plantas que crecen en suelos afectados por altas concentraciones de sales ha sido descrita por Cytryn et al. (2007). La baja actividad agua que caracterizan a estos suelos salinos es una condición de estrés salino y osmótico para los rizobios y las plantas hospedadoras que allí crecen. Los autores Lebrazi y Fikri-Benbrahim (2014), describieron que las sales poseen dos efectos sobre las células: iónico y osmótico, y que la salinidad de los suelos se relaciona principalmente con los niveles de cationes como Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ y aniones como Cl^- , SO_4^{2-} , HCO_3^- y NO_3^- .

Para el estudio de la influencia de condiciones de estrés salino sobre el crecimiento de *M. loti* y en medio de cultivo se utilizó NaCl, ya que es el tipo de sal que prevalece en la región de la Pampa deprimida y afecta también al crecimiento de las forrajeras que sostienen la producción ganadera (Criado, 2014). Para los estudios de las respuestas a cambios en el potencial osmótico del medio de cultivo se utilizó polietilenglicol (PEG). Este polímero no es permeable a la membrana plasmática y se probó que no puede ser catabolizado por rizobios como *S. meliloti*, manteniendo constante la actividad agua del medio de cultivo durante todo el crecimiento bacteriano (Busse y Bottomley, 1989).

Las curvas de crecimiento en presencia de estrés salino (150 mM NaCl) y estrés osmótico (PEG 15%) de *M. loti* MAFF303099 mostraron un comportamiento diáuxico, con una segunda fase lag entre las 40 y 48 horas en las tres condiciones de crecimiento. Los resultados mostraron que el crecimiento de *M. loti* WT en condición control y salinidad presentaron fases

exponenciales de crecimiento similares y con tiempos de generación equivalentes. Ello indica que *M. loti* tolera la concentración de NaCl al que fue expuesto. En cambio, en la condición de estrés osmótico la bacteria alcanzó menor crecimiento que en las condiciones control y de estrés salino.

La evaluación del crecimiento de *M. loti* en estrés salino y osmótico reveló que este último produjo un marcado aumento en el tiempo de generación de la primera fase exponencial del crecimiento diáuxico, mientras que el estrés salino no lo afectó significativamente, probablemente debido a que la bacteria es tolerante o a que podría utilizar el ion Na^+ para compensar el efecto osmótico generado por la sal. Autores como Chen et al. (2005) y Laranjo y Oliveira (2011), describieron que los mesorrizobios, dependiendo de la especie, pueden tolerar concentraciones de sal que van desde 150 hasta 300 mM de NaCl.

El crecimiento en presencia de PEG requiere la adaptación de las bacterias a condiciones de baja actividad agua mediante la síntesis o acumulación de disacáridos como sacarosa y trehalosa, por lo que parte de la fuente carbonada es destinada a la síntesis de estos solutos compatibles (Potts, 1994). Se ha propuesto que estos azúcares, especialmente la trehalosa, estabilizan membranas y proteínas en condiciones de deshidratación (Crowe et al., 1998). Hoelzle y Streeter, (1990) y Gouffi et al. (1999), demostraron que la concentración de trehalosa intracelular se vio incrementada en *R. leguminosarum* y *S. meliloti* luego de ser expuestos a estrés salino.

3.5.2 Actividad antioxidante en *M. loti* en presencia de NaCl y PEG.

En condiciones de estrés, el metabolismo celular se ve alterado y se produce la acumulación de EAOs. Estas moléculas son altamente reactivas y producen daños oxidativos en las macromoléculas. Controlar el nivel de EAOs es primordial para el metabolismo de los rizobios nodulantes, por lo que el complejo sistema enzimático de detoxificación de EAOs involucra principalmente a las enzimas SOD, CAT y GR (Matés, 2000). De forma similar a lo descrito en *S. meliloti* 102F78 por Rubio et al. (2004), en el genoma publicado de *M. loti* MAFF303099 existe un único gen codificante para una proteína con actividad SOD (*mlr7636*) y dos genes que codifican para una catalasa y una catalasa/peroxidasa (*mlr2101* y *mlr6940*). En

cuanto a la GR de *M. loti*, el gen *mll0523* sería el responsable de codificar para esta enzima (genome.microbedb.jp/rhizobase).

De las mediciones de las actividades de estas enzimas en los tratamientos salino y osmótico, se halló que en estrés osmótico hubo incremento de la actividad CAT, mientras que en salinidad, tanto SOD como CAT se vieron fuertemente inducidas (Tabla 3.1). En principio, podría pensarse que el incremento de CAT en salinidad responde a incrementos en las concentraciones de H₂O₂ intracelular como resultado de la actividad SOD, tal como ha sido descrito por Martins y English (2014). En este sentido, Herouart et al. (1996), describieron en *Rhizobium meliloti* una catalasa monofuncional inducible por H₂O₂. Sin embargo, los resultados demuestran que el incremento de CAT pareciera no estar únicamente relacionado con el incremento de H₂O₂, ya que CAT también incrementó en respuesta a estrés osmótico, a pesar de que la actividad SOD disminuyó. Los resultados de las actividades enzimáticas determinadas en *M. loti* en estrés osmótico coinciden en parte con los descritos por Cytryn et al. (2007), quienes reportaron que en *B. Japonicum* expuesto a estrés osmótico se indujeron las actividades SOD y CAT. Posiblemente, las diferencias halladas en la inducción de las enzimas estarían relacionadas con el hecho de que los estreses salino y osmótico activan diferentes mecanismos fisiológicos de adaptación, tal como ha sido informado por Lebrazi y Fikri-Benbrahim (2014). Por lo tanto, las respuestas diferenciales de las enzimas antioxidantes podrían deberse en parte a la naturaleza de los estreses aplicados. Por último, se halló que ninguno de los estreses evaluados afectó la actividad GR de *M. loti*.

La participación de CAT en el balance redox de *S. meliloti* en vida libre y también durante la interacción con *M. sativa* ya fue estudiada por varios autores (Jamet et al., 2003 y Davies y Walker, 2007), mediante técnicas de sobreexpresión y disrupción génica. En cambio, el conocimiento sobre la participación de SOD en la homeostasis redox rizobiana y sobre la interacción con leguminosa se encuentra menos desarrollado. Hasta el momento, en un único trabajo se han realizado estudios con una cepa de *S. meliloti* sobreexpresora de *sodA*, aunque la sobreexpresión fue heteróloga y realizada en una cepa de *E. coli* deficiente en *sodA*, *sodB* y *recA*, lográndose la complementación génica y el restablecimiento del crecimiento de *E. coli* en aerobiosis (Santos et al., 1999). Otros experimentos realizados por Santos et al. (2000), describen el comportamiento de una cepa de *S. meliloti* deficiente en SOD, con un crecimiento

casi normal y con moderada sensibilidad a estrés oxidativo en vida libre, aunque con las propiedades simbióticas afectadas negativamente.

Por consiguiente, uno de los de los objetivos de esta tesis fue estudiar los efectos de la sobreexpresión y delección de SOD en *M. loti* en vida libre, expuesto a estrés oxidativo, y su posible efecto protector en la interacción con *L. japonicus* en condiciones de estrés salino y osmótico. Con tal fin se amplificó el gen *mlr7636*, y se obtuvo el plásmido pFAJsod para la sobreexpresión de SOD. Por otra parte, para lograr la delección génica por doble recombinación homóloga, se obtuvo el plásmido pSODmut que lleva una región interna del gen *mlr7636* de 267 pb.

Capítulo 4: Sobreexpresión y delección de SOD en *M. loti*: actividad, isoformas y localización subcelular

En este capítulo se mostrarán en una primera parte los resultados de los efectos de transformar *M. Loti* con los plásmidos para la sobreexpresión e interrupción del gen *mlr7636* sobre su crecimiento, y se analizará la actividad y la localización subcelular de SOD. En una segunda parte se mostrarán los resultados del análisis del perfil proteico de SOD.

4.1 Transformación de *M. loti* MAFF303099 con pFAJ1708, pFAJsod y pSODmut.

Se confirmó la presencia de los plásmidos pFAJ1708 y su derivado pFAJsod (diseñado para la expresión de SOD) en las 10 colonias de *M. loti* transconjugantes elegidas a partir de cada uno de los ensayos de conjugación biparental con *E. coli* S17 sod y *E. coli* S17 1708.

En las colonias de *M. loti* presumiblemente deficientes en SOD que fueron transformadas con el plásmido pSODmut (para la interrupción insercional del gen *mlr7636*), se evaluó la inserción del vector pSODmut en el gen *sod* mediante amplificación del gen *mlr7636* por PCR a partir del ADN genómico de las colonias transconjugantes. De un total de 8 colonias, 3 fueron negativas para la amplificación del gen *mlr7636* y se asumieron mutantes negativas denominadas *M. loti* sodmut (Figura 4.1).

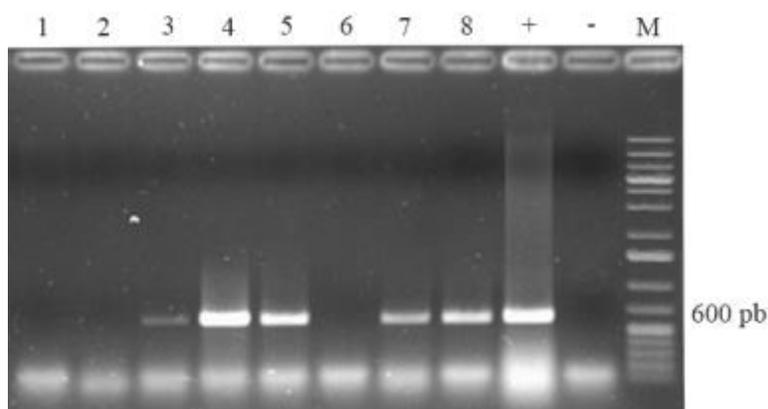


Figura 4.1: Amplificación del gen *mlr7636* de *M. loti* transformadas con el plásmido pSODmut para la interrupción génica por recombinación homóloga. Calles 1, 2 y 6: clones con el gen *sod* interrumpido (*M. loti* sodmut). Calles 3, 4, 5, 7 y 8: clones con el gen *mlr7636* sin interrumpir. Control positivo ADN genómico de *M. loti* MAFF303099 (+). Control negativo (-). Marcador de peso molecular 100 pb ADN Ladder (M).

A pesar de que se obtuvieron tres clones de *M. loti* sodmut, estas colonias fueron incapaces de continuar su crecimiento cuando se repicaron en placas con medio fresco, por lo que no se pudieron realizar ensayos posteriores.

La capacidad infectiva de *M. loti* 1708 y *M. loti* sod pudo ser evaluada en ensayos de nodulación con *L. japonicus* MG20, obteniéndose nódulos con las tres cepas a los 15 dpi como se muestra en la figura 4.2.

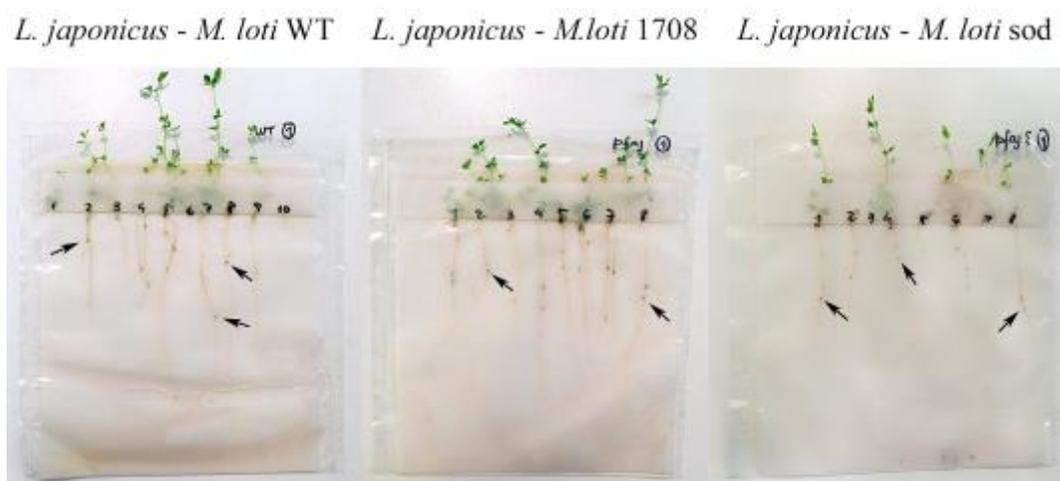


Figura 4.2: Plántulas de *L. japonicus* noduladas por *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod.

A partir de los nódulos obtenidos, se logró la recuperación de las cepas utilizadas para la inoculación de las plántulas. Todos los aislamientos, excepto la cepa *M. loti* WT, crecieron cuando se sembraron en el medio con Tc (Tabla 4.1).

Tabla 4.1: Recuperación de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod a partir de nódulos de *L. japonicus* en medio de cultivo TY.

Leguminosa	Cepa	Crecimiento de aislados de nódulo	
		TY	TY + Tc 20
<i>L. japonicus</i>	<i>M. loti</i> WT	Sí	No
	<i>M. loti</i> 1708	Sí	Sí
	<i>M. loti</i> sod	Sí	Sí

4.2 Crecimiento de *M. loti* recombinantes en estrés salino y osmótico.

La evaluación del crecimiento de las cepas *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod en condiciones control, estrés salino y osmótico mostró que en situación control las tres cepas tuvieron tasas de crecimiento similares.

Cuando se ensayaron en medios con 150 mM NaCl, la tasa de crecimiento de las tres cepas no difirió de la obtenida en la condición control. En presencia de 15 % PEG, que ejerce los -0.85 Mpa de presión equivalentes al ejercido por 150 mM de NaCl, todas las cepas presentaron una disminución de alrededor del 50 % en su tasa de crecimiento, lo que indica que fueron sensibles a estrés osmótico (Figura 4.3).

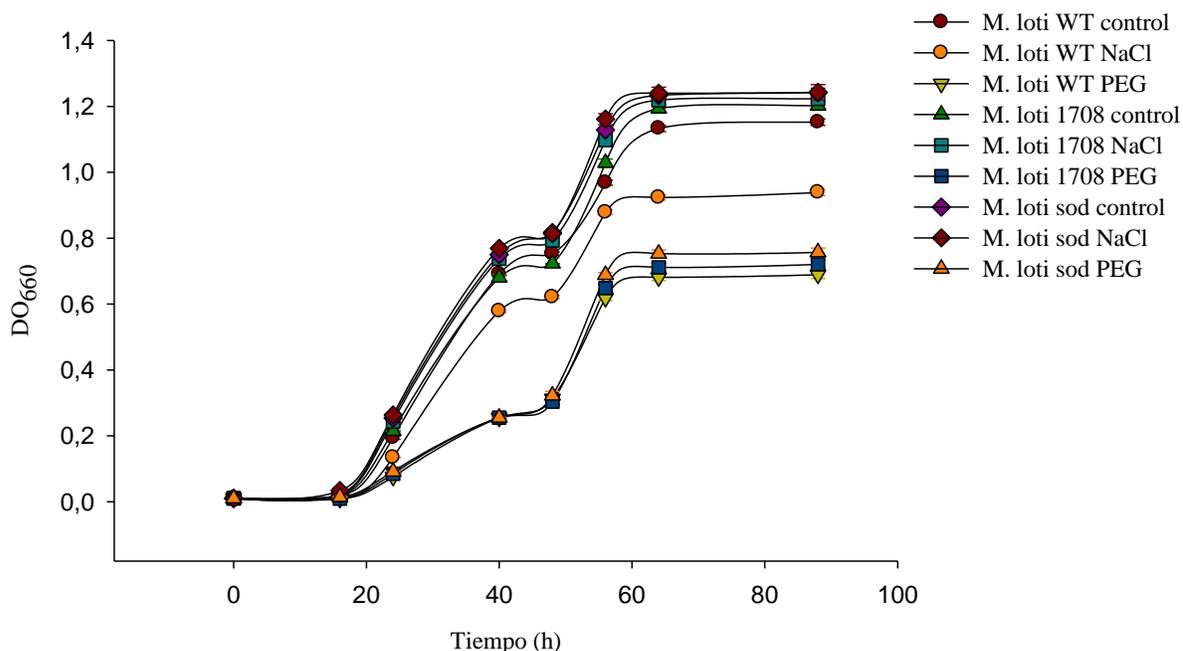


Figura 4.3: Efecto de NaCl (150 mM) y PEG (15%) sobre el crecimiento de *M. loti* WT, y transformadas con el plásmido vacío pFAJ1708 y pFAJsod. Los datos representan las medias \pm E.E. de tres cultivos independientes.

En todos los tratamientos se obtuvieron curvas de crecimiento diáuxica para todas las cepas, con una primera fase exponencial entre las 24 y 40 h y una segunda fase exponencial entre las 48 y 56 h (los tiempos de generación [g] se muestran en la tabla 4.2). Los Δg entre las

cepas transformadas y la cepa WT mostraron que en condiciones control, se redujo un 30 % el tiempo de generación en la segunda fase exponencial de las cepas transformadas (Tabla 4.2). En estrés salino, dicha reducción fue menor (15,80 y 26,15 % para *M. loti* 1708 y *M. loti* sod respectivamente). En estrés osmótico, sólo la cepa sobreexpresora *M. loti* sod mostró una disminución significativa en su tiempo de generación de 15,5 % respecto de la WT durante la segunda fase de crecimiento. El análisis estadístico se realizó en base a las pendientes de las regresiones lineales.

Tabla 4.2: Tiempo de generación (g) en horas (h) de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod en condiciones control, de estrés salino y osmótico: los tiempos de generación están calculados en las dos fases exponenciales (exp. 1 y exp. 2) de la curva de crecimiento.

Tratamiento	cepa	exp. 1 g (h)	exp. 2 g (h)	Δg exp. 1 (%)	Δg exp. 2 (%)
Control	WT	09,69 ^a	11,19 ^a	-	-
	1708	10,34 ^a	07,88 ^b	06,70	-29,58
	sod	09,71 ^a	07,74 ^b	00,21	-30,83
NaCl	WT	10,83 ^a	09,37 ^a	-	-
	1708	09,74 ^a	07,89 ^b	-10,06	-15,80
	sod	09,52 ^a	06,92 ^b	-12,10	-26,15
PEG	WT	26,81 ^a	07,88 ^a	-	-
	1708	28,22 ^a	06,98 ^a	05,26	-11,42
	sod	29,41 ^a	06,58 ^b	09,71	-16,50

Letras distintas indican diferencias significativas con DGC test $p \leq 0,05$. Los Δg son las comparaciones en % entre g de las cepas transformadas referidos a la cepa control sin transformar WT. n=3.

4.3 Caracterización de la actividad SOD en *M. loti* sod.

Se realizaron determinaciones enzimáticas a partir de los fraccionamientos subcelulares con el fin de conocer la localización subcelular de la SOD en las células sobreexpresoras *M. loti* sod.

La cepa *M. loti* sod mostró un aumento de 5 veces en la Ae SOD de la fracción periplásmica respecto de la cepa salvaje (Figura 4.4), mientras que no se hallaron diferencias significativas entre ésta y *M. loti* 1708. Por otro lado, no observaron diferencias significativas entre las actividades determinadas en los extractos totales de las tres bacterias.

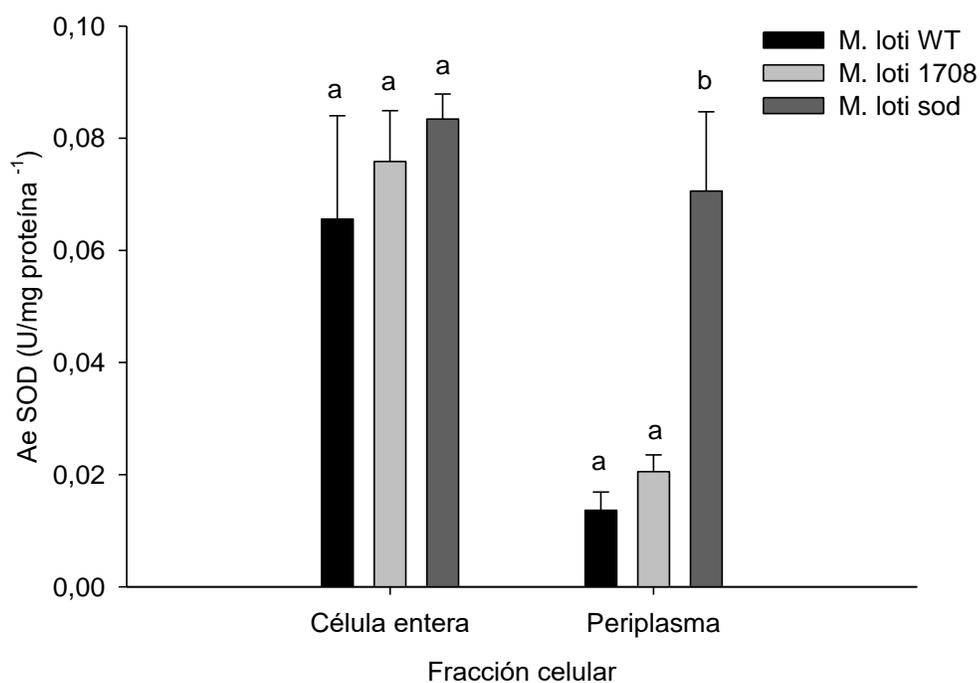


Figura 4.4: Actividad específica (Ae) SOD de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod en extractos proteicos solubles totales y fracciones periplásmicas. Los valores representan la media \pm E.E. Letras distintas indican diferencias significativas con DGC test $p \leq 0,05$. $n=3$

El análisis cualitativo de los zimogramas SOD en las fracciones solubles totales reveló la presencia de la banda endógena (BSOD) de la cepa *M. loti* WT con una movilidad relativa (Rf) de 0,33 (Figura 4.5 A). En la cepa *M. loti* 1708 también se halló la banda endógena BSOD, aunque ésta mostró una menor movilidad de la enzima respecto a la cepa sin transformar (Rf de 0,27). Por otro lado, en la cepa sobreexpresora *M. loti* sod además de la banda BSOD con Rf de 0,27, se visualizó además la aparición de otras tres isoformas denominadas I1, I2 e I3, cuyos Rfs fueron de 0,35; 0,42 y 0,55 respectivamente (Tabla 4.3).

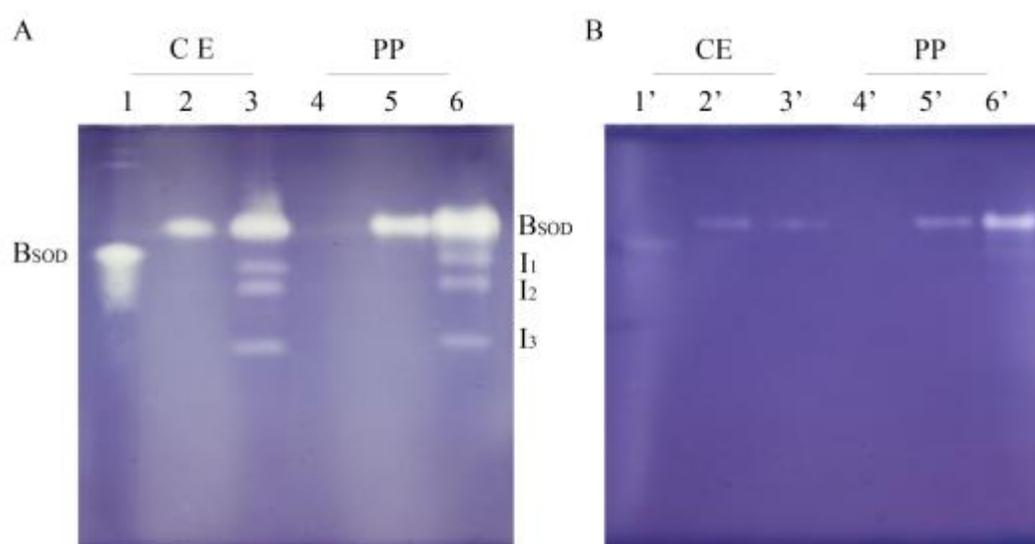


Figura 4.5: A) Zimograma de SOD en célula entera (CE) y espacio periplásmico (PP). 1, 2 y 3) Proteínas totales de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod respectivamente. 4, 5 y 6) Proteínas periplásmicas de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod respectivamente. BSOD: actividad basal, I1: SOD inducida 1, I2: SOD inducida 2, I3: SOD inducida 3, B) Duplicado zimograma SOD inhibido con H₂O₂.

El zimograma de las fracciones periplásmicas de las cepas transformadas reveló el mismo perfil que el hallado en las fracciones totales, aunque con una mayor intensidad en la actividad, lo cual concuerda con la actividad cuantificada por espectrofotometría.

La inhibición *in vitro* de la actividad SOD por H₂O₂ puso en evidencia la resistencia de la banda endógena y de menor Rf tanto en célula entera como en la fracción periplásmica, lo que muestra que esta actividad corresponde a MnSOD (Beyer y Fridovich, 1987). Por otra parte, las bandas adicionales de actividad inducida fueron inhibidas por H₂O₂, indicando que se tratan de FeSODs (Figura 4.5 B).

Tabla 4.3: Movilidad relativa (Rf) de las izoenzimas de SOD en zimogramas de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod.

Fracción celular	Cepa	Basal (Rf)	Inducida 1	Inducida 2	Inducida 3
Célula entera	<i>M. loti</i> WT	0,33	-	-	-
	<i>M. loti</i> 1708	0,27	-	-	-
	<i>M. loti</i> sod	0,27	0,35	0,42	0,55
Espacio periplásmico	<i>M. loti</i> WT	-	-	-	-
	<i>M. loti</i> 1708	0,27	-	-	-
	<i>M. loti</i> sod	0,27	0,35	0,42	0,55

Con el objetivo de identificar SOD por Western blot, se probaron los anticuerpos policlonales anti MnSOD, anti CuZn-SOD y anti FeSOD disponibles en el laboratorio. Es así que se analizaron las proteínas totales de *M. loti* WT y *M. loti* sod en Western blot a partir de ND-PAGE y SDS-PAGE. Fue posible detectar SOD únicamente con el anticuerpo anti FeSOD (Agrisera AS 06 125), y este reconocimiento se dio en las cepas *M. loti* WT y *M. loti* sod, mientras que no hubo reconocimiento cuando se utilizaron los anticuerpos anti MnSOD y anti CuZnSOD (Figuras 4.6 A y B).

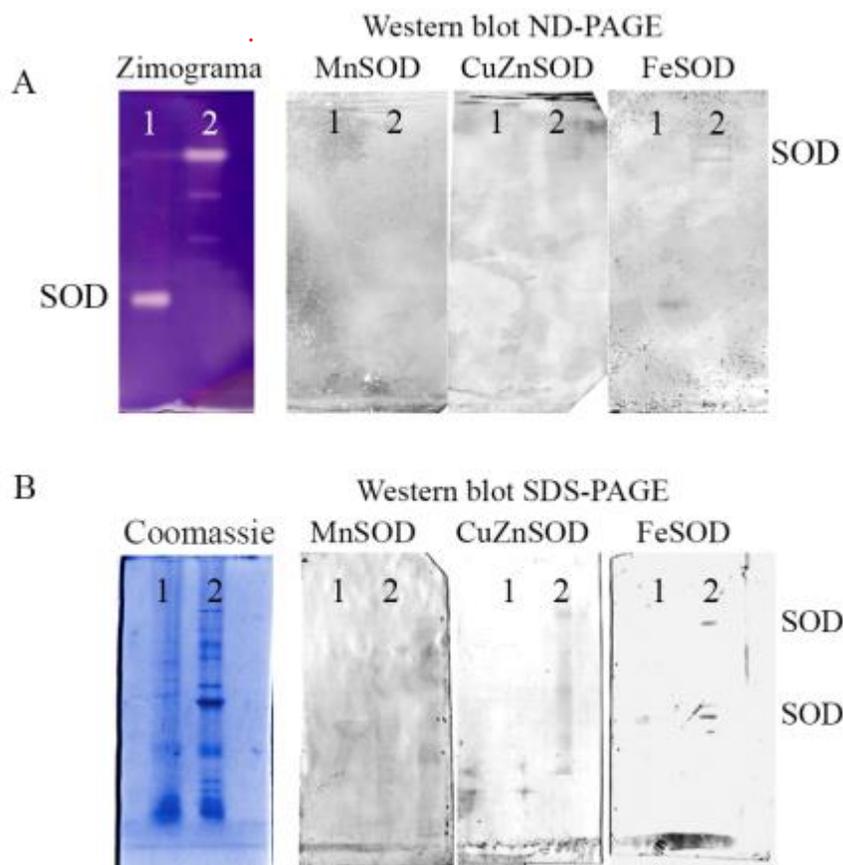


Figura 4.6: A) Identificación de SOD mediante Western blot de geles ND-PAGE en células de *M. loti* WT (1) y *M. loti* sod (2) revelado en zimograma y Western blot con anti-MnSOD, anti-CuZnSOD y anti-FeSOD. B) Tinción con Coomassie de SDS-PAGE de proteínas de células de *M. loti* WT (1) y *M. loti* sod (2), y Western blot con anti-MnSOD, anti-CuZnSOD y anti-FeSOD.

4.4 Localización subcelular de SOD en *M. loti*.

Se realizó un Western blot con el anticuerpo anti-FeSOD a partir de SDS-PAGE de proteínas de células enteras y fracciones periplásmicas de las tres cepas. Se confirmó la presencia de FeSOD en el espacio periplásmico de todas las cepas, con mayor intensidad de banda en *M. loti* sod (Figura 4.7). En los extractos proteicos totales de *M. loti* 1708 y de *M. loti* sod se pudieron observar dos bandas que reaccionaron con anti-FeSOD, mientras que en la cepa

salvaje no se visualizó reacción con el anticuerpo anti-FeSOD a pesar de que en la figura 4.4 se muestra que la actividad SOD fue cuantificada.

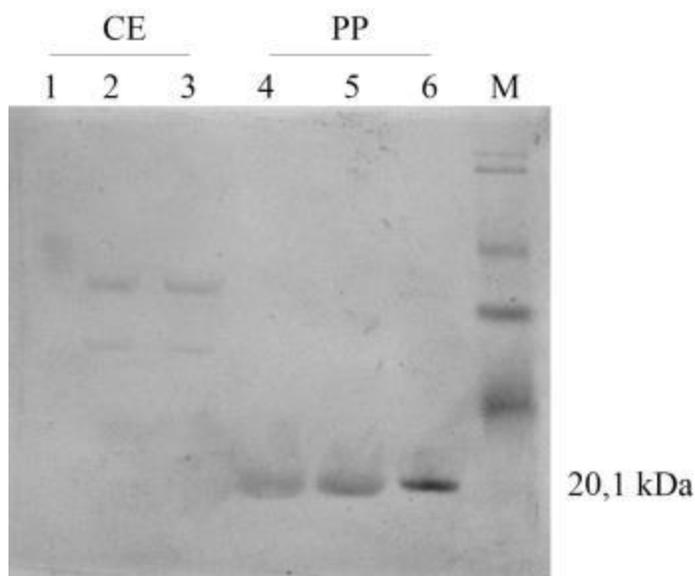


Figura 4.7: Western blot anti FeSOD en célula entera (CE) y espacio periplásmico (PP). 1, 2 y 3) Proteínas totales de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod respectivamente. 4, 5 y 6) Proteínas periplásmicas de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod respectivamente. M: marcador de PM Prestained. En todas las calles se sembraron 10 μ g de proteínas obtenidas de cultivos con $DO_{600} = 0,2$.

4.5 Análisis del perfil proteico de SOD.

4.5.1 Acerca de la secuencia *mlr7636*.

El producto del gen *mlr7636* es una proteína de 199 residuos aminoacídicos detallados en la figura 4.8. Estructuralmente, la conformación cuaternaria de SOD se encuentra constituyendo homodímeros u homotetrámeros (Lancaster et al., 2004). Cada uno de estos monómeros de 199 aminoácidos posee un sitio de unión a su cofactor metálico.

A partir de esta secuencia se determinó que la masa molecular teórica de la proteína es de 22.325,10 Da y su punto isoeléctrico (pi) teórico es 6,19. El análisis de la presencia de péptido

señal en la secuencia aminoacídica del gen *mlr7636* arrojó un resultado negativo en la predicción de un sitio de clivaje en los primeros 70 aminoácidos (Figuras 4.9 y 4.10).

En bacterias Gram negativas se conocen los sistemas de exportación de proteínas Sec y Tat (Tokuda, 2009), los cuales están involucrados en la translocación de proteínas al periplasma.

Las proteínas de exportación se traducen como una preproteína que contiene en su extremo amino terminal una secuencia característica conocida como péptido señal que es requerida para la secreción. Este péptido señal en promedio se compone de 24 aminoácidos y contiene en su extremo carboxi terminal un sitio de clivaje reconocible por una peptidasa señal (Petersen et al., 2011). Una vez ocurrida la exportación al periplasma, el péptido señal es escindido generando la proteína madura.

```
MAFELPALPYDYEALQPYMSKETLEYHHDKHHKAYVDNGNKLAEEAGMGDLSVE
EVVKQSFQKNAGLFNNAAQHYNHIFWKWMKKGKGGGNKLPAAALQKAFDSDLGGY
DKFKADFVAAGTTQFGSGWAWVSVKDGKLAISKTPNGENPLVHGASPI LGVDVW
EHSYYIDYRNARPKYLEAFVDSLINWDHVLELYEKAK
```

Figura 4.8: Secuencia aminoacídica de *sod* de *M. loti* MAFF303099 deducida a partir del marco de lectura abierto del gen *mlr7636* publicado en el sitio web <http://genome.microbedb.jp/rhizobase>.

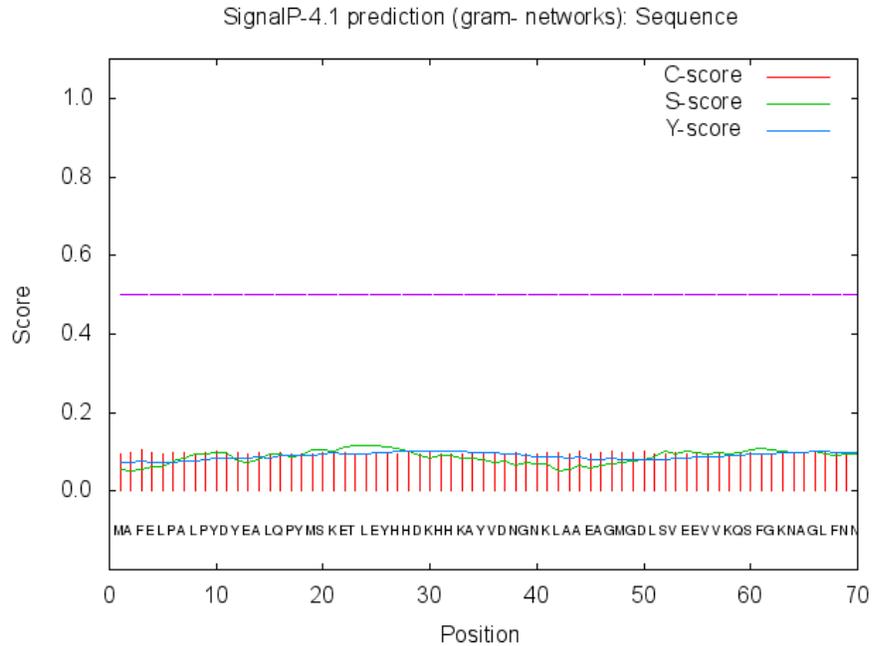


Figura 4.9: Predicción de la presencia de péptido señal en la secuencia proteica del gen *mlr7636*.

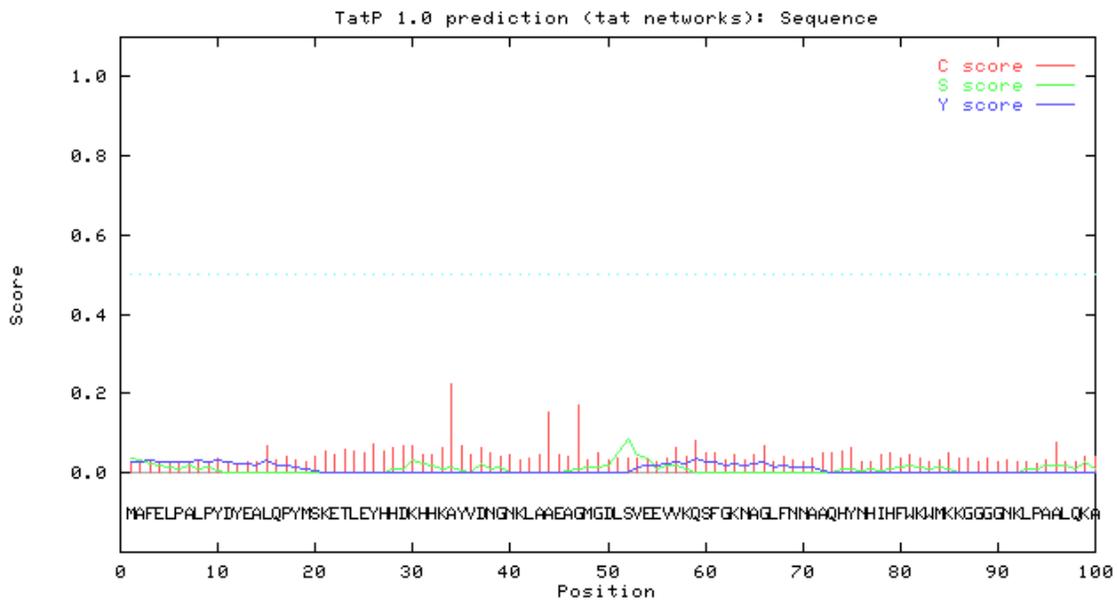


Figura 4.10: Análisis de la presencia de péptido señal Tat en la secuencia proteica del gen *mlr7636*.

4.5.2 Análisis filogenético de la SOD codificada por el gen *mlr7636*.

Se construyó un árbol filogenético a partir del alineamiento de 12 secuencias aminoacídicas, de genes ortólogos al gen *mlr7636* de distintos rizobios que presentaron al menos 50 % de identidad con la SOD de *M. loti* MAFF303099. La figura 4.11 muestra el resultado de este análisis en el que se puede distinguir la formación de dos grupos mayoritarios.

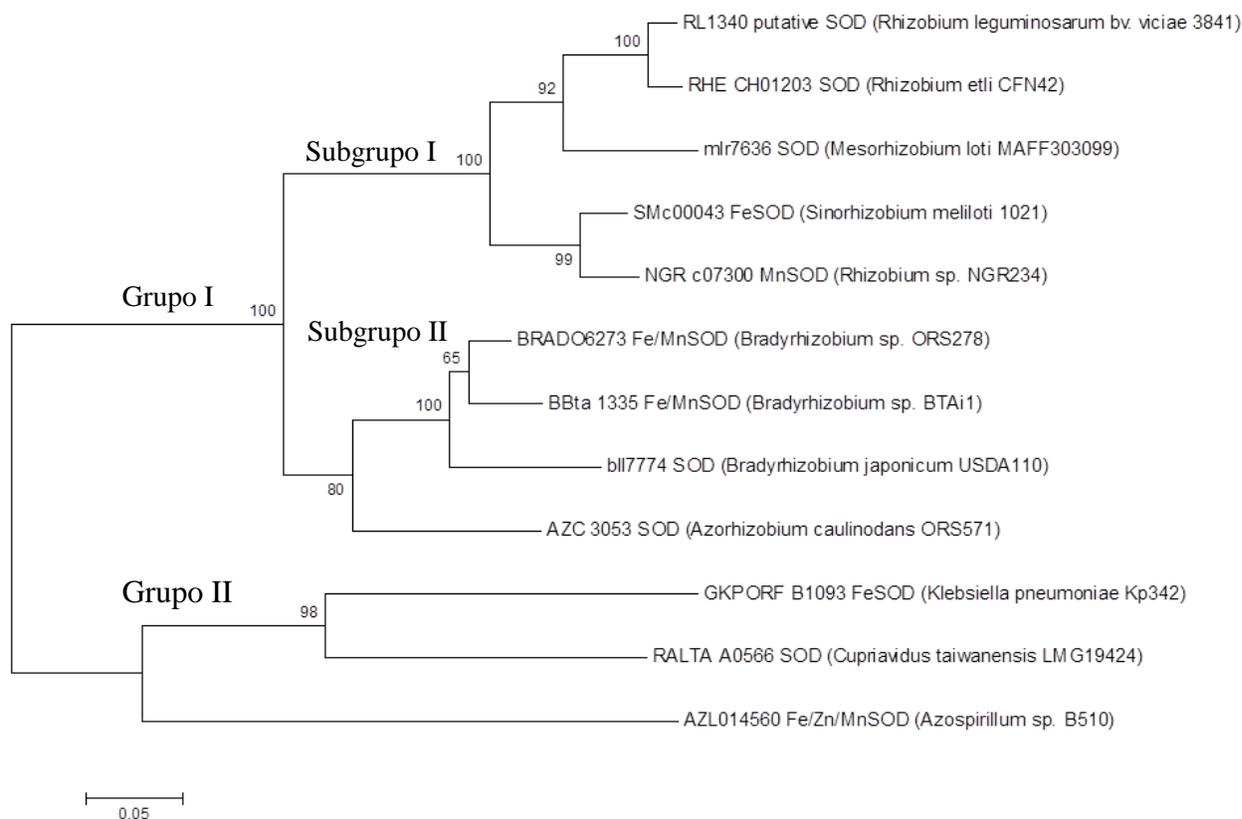


Figura 4.11: Árbol filogenético de consenso construido con el programa Mega 5.10 método Neighbor-Joining por máxima probabilidad a partir del alineamiento de secuencias aminoacídicas que codifican SOD. Los valores en las horquillas indican los porcentajes de 1.000 repeticiones.

La proteína codificada por *mlr7636* se agrupó con la *sodB* putativa de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841 y la *sodB* de *Rhizobium etli*. A su vez, este grupo estuvo relacionado con las FeSOD de *S. meliloti* 1021 y la MnSOD de *Rhizobium* sp. NGR234. En este mismo grupo, pero más distante, se ubicaron cuatro Fe/MnSOD pertenecientes a

Bradyrhizobium sp. BTAi1, *Bradyrhizobium sp.* ORS278, *B. japonicum* USDA110 y *A. caulinodans* ORS571.

El segundo grupo estuvo conformado por las secuencias que presentaron los menores valores de identidad con el resto de las secuencias comparadas. Se agruparon la FeSOD de *K. pneumoniae* Kp342, la SOD de *C. taiwanensis* LMG19424 y una Fe/Zn/MnSOD de *Azospirillum sp.* B510.

4.6 Discusión

El desarrollo de la biología molecular como herramienta para el estudio de la biología celular, tuvo gran impacto en la adquisición del conocimiento que se tiene sobre las interacciones planta-microorganismos. Algunas técnicas como la expresión de proteínas recombinantes y la delección génica permitieron la identificación de genes, y también determinar su función en el metabolismo celular (Stacey et al., 2006).

Uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar el efecto de la sobreexpresión y delección de SOD sobre el crecimiento de *M. loti* en estrés salino y osmótico. Al respecto, se logró la transformación de *M. loti* con el plásmido pFAJsod obtenido en esta tesis, el cual es un derivado del vector RK2 que posee un sistema de muerte postsegregacional codificado por el locus *par* (Weinstein et al., 1992; Taté et al., 1999). Ha sido descrito por Dombrecht et al. (2001), que la serie de vectores pFAJ fueron 100 % estables en *S. meliloti* y *Rhizobium etli* CE3 pasadas 72 generaciones en ausencia de presión de selección por antibiótico. La estabilidad de los plásmidos pudo ser confirmada en el sistema *M. loti*-*L. japonicus* mediante la recuperación de los vectores pFAJ1708 y pFAJsod a partir de los nódulos de plantas inoculadas con los rizobios transformados.

4.6.1 Efecto de transformación de *M. loti* con pFAJ1708, pFAJSOD y pSODmut, sobre el crecimiento en estrés salino y osmótico.

Se observó que las tasas de crecimiento de las cepas recombinantes *M. loti* 1708 y *M. loti* sod en presencia y ausencia de estrés osmótico fueron similares a las de la cepa WT. Sin embargo, estas cepas recombinantes cultivadas en presencia de NaCl mostraron mayor crecimiento que la WT, indicando que la transformación de las bacterias con los vectores pFAJ1708 y pFAJsod redujo los efectos de NaCl sobre el crecimiento. Debido a que tanto la bacteria sobreexpresora, como la cepa transformada con el plásmido control mostraron la misma ventaja en salinidad, es probable que este efecto esté causado por cambios en el metabolismo celular originados por la presencia de los plásmidos transformados como fue descrito por Wang et al. (2006).

Así como la sobreexpresión génica es una herramienta que permite el estudio de un gen en la interacción rizobio-leguminosa, contar con una mutante deficiente en actividad SOD

también arroja información sobre el aporte de esta actividad enzimática al rizobio en vida libre y a su interacción con su leguminosa huésped. Para obtener una cepa de *M. loti* deficiente en SOD, se utilizó el vector pSODmut, realizado a partir del plásmido mobilizable pK18mob. Este plásmido posee el origen de replicación del vector pUC, de manera que su replicación se restringe principalmente a *E. coli* y a algunas otras especies muy relacionadas de la familia *Enterobacteriaceae*. Además, la presencia del origen de transferencia *mobRK2* permite su transferencia por conjugación a un amplio rango de bacterias, entre las que se encuentran los rizobios (Schäfer et al., 1994). Además, fue descrito por Katzen et al. (1999), que este plásmido funciona como plásmido suicida en las rizobacterias, por lo que constituye una herramienta para lograr la disrupción génica mediante inserción por eventos de doble recombinación homóloga. Adicionalmente, el pK18mob porta el gen de resistencia a kanamicina que funciona como marcador para la identificación de clones de *M. loti* en las que el plásmido se integró al cromosoma.

La estrategia de interrupción del gen *mlr7636* en *M. loti* utilizando el plásmido pSODmut implicó la doble recombinación homóloga con un fragmento interno del gen, provocando la inserción cromosomal del plásmido de 4,4 kb. La ausencia de amplificación por PCR del gen *mlr7636* en las extracciones de ADN cromosómico permitió presumir que se logró la interrupción del gen. Si bien las colonias identificadas como *M. loti* sodmut fueron capaces de crecer inmediatamente después de la conjugación, posteriormente presentaron dificultad para crecer en el medio de cultivo en aerobiosis, lo que sugiere que la interrupción del único gen codificante para SOD en *M. Loti* es una mutación letal. Hallazgos similares fueron informados por Hassett et al. (1995), en dobles mutantes defectivas en *sodA* y *sodB* de *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales fueron incapaces de crecer en forma aeróbica. Sin embargo, otros autores reportaron que *S. meliloti* deficiente en *sodA*, mostró crecimiento y sensibilidad moderada a estrés oxidativo en vida libre, con disminución de capacidad de establecer simbiosis con *M. sativa* L (Santos et al., 2000). Este comportamiento podría deberse a que, según genome.annotation.jp/Rhizobase, en *S. meliloti* hay más de un gen que codificaría para SOD que podrían estar supliendo la carencia de *sodA*.

4.6.2 Perfil de SOD en *M. loti* sod: actividad y localización subcelular.

Se comprobó la presencia de SOD en el espacio periplásmico de las tres cepas por espectrofotometría, también fue corroborado en zimogramas ND-PAGE y Western blot. Además, se halló que en la fracción periplásmica, la cepa *M. loti* sod incrementó 5 veces su Ae SOD respecto de las cepas no sobreexpresoras, por lo que la SOD se estaría exportando al espacio periplásmico. Asimismo, los zimogramas revelaron tres bandas adicionales a la banda basal en la cepa *M. loti* sod. En relación a los cambios en el valor Rf de la SOD basal de las cepas transformadas hallados en los zimogramas, éstos podrían originarse por cambios en el metabolismo celular causados por la presencia de los plásmidos transformados (Wang et al., 2006).

De los anticuerpos evaluados, el anti-FeSOD resultó ser el único que reaccionó con la SOD bacteriana en los Western blots realizados tanto en ND-PAGE como SDS-PAGE. El anticuerpo permitió detectar una única banda de 20,1 kDa en el espacio periplásmico de las tres cepas y también fue posible detectar mayor intensidad de señal a la cepa sobreexpresora. Aunque el tamaño calculado experimentalmente no coincidió con la masa molecular de 22,32 kDa predicha *in silico* para el producto codificado por el gen *mlr7636*. Probablemente, la diferencia de 2,6 kDa entre ambas proteínas se deba a la escisión de péptido señal cuya masa equivale a aproximadamente los primeros 22 residuos del extremo amino terminal de la secuencia aminoacídica y que, acorde a los trabajos de von Heijne (1985) y Hegde y Bernstein, (2006), se encuentra dentro de los tamaños esperables para un péptido señal. El péptido señal tiene como función controlar el pasaje de las proteínas a través de membranas celulares tanto eucariotas como procariotas y comprende el extremo N-terminal de la cadena aminoacídica. En el proceso de exportación, esta secuencia es clivada del resto de la proteína durante su translocación a través de la membrana plasmática (Nielsen et al., 1997). Sin embargo, los análisis bioinformáticos de péptido señal fueron negativos para la secuencia de SOD, por lo que su traspaso al espacio periplásmico podría estar ocurriendo por una vía alternativa, tal como ocurre con la SOD de *R. leguminosarum* bv. *viciae*, descrita por Krehenbrick et al. (2011).

4.6.3 Isoformas de SOD en *M. loti* sod.

La incubación de los geles ND-PAGE en H₂O₂, previo al revelado del zimograma, mostró que las tres bandas de SOD adicionales presentes en la cepa *M. loti* sod fueron sensibles a la inhibición por H₂O₂ y de acuerdo a lo descrito por Beyer y Fridovich (1987), esta inhibición indica que se tratan de FeSODs. No obstante, la banda de actividad común a las tres cepas no fue inhibida por H₂O₂, ni CNK, confirmando que se trata de MnSOD. Teniendo en cuenta la existencia de un único gen para SOD, respalda la idea de que la SOD de *M. loti* se comporta como una SOD cambialística capaz de utilizar tanto Mn y Fe como cofactor. Por otro lado, en el análisis filogenético de las SODs se pudo observar su estrecha relación con otras MnSODs y FeSODs, apoyando aún más la idea de que la SOD de *M. loti* podría ser una Fe/MnSOD cambialística como la descrita en *S. meliloti* (Santos et al., 1999).

Además, el análisis filogenético generó una primera división en los grupos I y II. El grupo I estuvo conformado por las secuencias de SOD pertenecientes a α -proteobacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno y formadoras de nódulos, como *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium*. El grupo II se conformó con microorganismos endófitos fijadores de nitrógeno como la γ -proteobacteria *Klebsiella pneumoniae* 342 (Fouts et al., 2008), la β -proteobacteria *Cupriavidus taiwanensis* LMG19424 (De Meyer et al., 2015) y la α -proteobacteria *Azospirillum sp.* B510 (Kaneko et al., 2010).

Llama la atención la estrecha relación filogenética entre la SOD de *M. loti* y la de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841, descrita por Krehenbrink et al. (2011), la cual tampoco presenta un péptido señal predecible bioinformáticamente. Asimismo, se observa estrecha relación con otras FeMnSODs de *Bradyrhizobium*.

Capítulo 5: Evaluación del efecto de la sobreexpresión de SOD en la supervivencia de *M. loti* y *S. meliloti* frente a condiciones de estrés oxidativo.

En la primera parte de este capítulo se abordarán las evaluaciones de la tolerancia a H_2O_2 y $\cdot O_2^-$ que presentaron las cepas de *M. loti*, y en segunda instancia, se mostrarán los resultados comparativos con en el rizobio modelo *S. meliloti* transformado con el plásmido pFAJsod.

5.1 Tolerancia de *M. loti* a H_2O_2 .

Se pudo determinar el efecto de la sobreexpresión de SOD en *M. loti* en presencia de 1 mM de H_2O_2 . Se observó que *M. loti* WT y *M. loti* 1708 presentaron marcada sensibilidad con disminuciones del 25 y 90 % en el número de UFC a los 30 y 60 min del inicio del tratamiento, respectivamente. Esta tendencia continuó hasta la muerte de estas cepas a los 120 min (Figura 5.1).

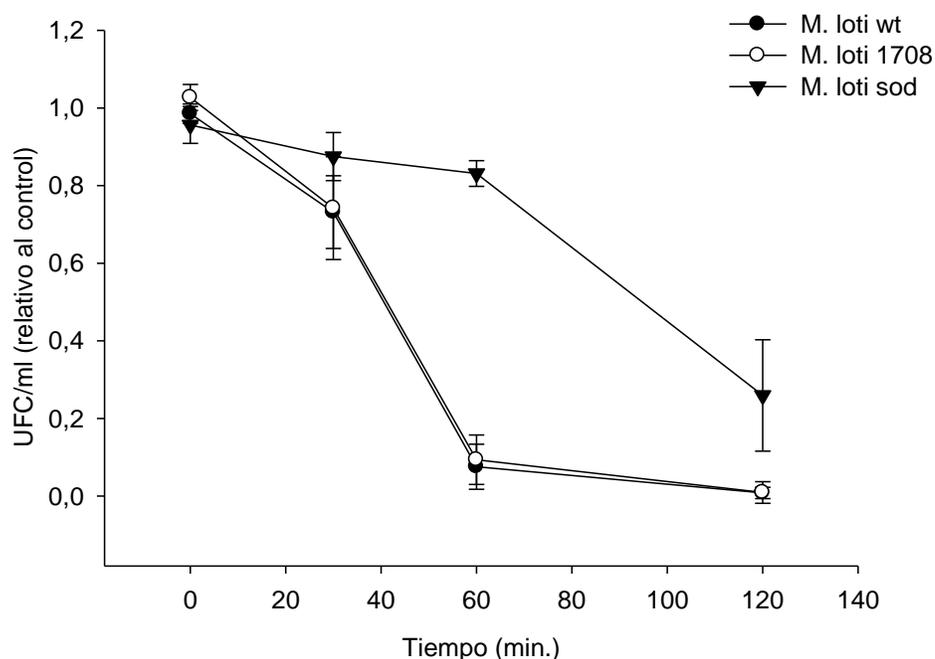


Figura 5.1: Tolerancia de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod a 1 mM de H_2O_2 . Los porcentajes de células viables están expresados en relación al control sin tratar. Los valores representan la media \pm E.E. de cultivos independientes. n=3.

M. loti sod mostró mayor tolerancia que *M. loti* WT y *M. loti* 1708 a 1 mM H₂O₂. Las reducciones en el número de UFC respecto al control (sin tratamiento con H₂O₂) a los 30 y 60 min no fueron significativas. No obstante a los 120 min sólo sobrevivió el 26 % de las bacterias sobreexpresoras.

5.2 Tolerancia de *M. loti* al ión superóxido.

Los ensayos de tolerancia al anión $\cdot\text{O}_2^-$ de las cepas de *M. loti* mostraron que la cepa sobreexpresora no fue afectada por $\cdot\text{O}_2^-$ en los primeros 30 min de incubación. No obstante, se apreció una reducción en las UFC/mL del 26 % y del 34 % a los 60 y 120 min respectivamente, comparados con el control sin tratar (Figura 5.2). Las cepas WT y 1708 se vieron afectadas significativamente a los 30 min de tratamiento, con reducciones en el número de UFC/mL de 96 y 94 % respectivamente (Figura 5.2). La sobreexpresión de SOD en *M. loti* puede haber contribuido a la dismutación del superóxido incrementando la tolerancia al estrés oxidativo promovido por $\cdot\text{O}_2^-$.

El agregado de catalasa (1 U/mL) a la mezcla de reacción provocó que el número de UFC de *M. loti* sobreexpresora de SOD se mantuviese sin cambios a lo largo del tratamiento (Figura 5.2), mientras que el de las cepas *M. loti* WT y *M. loti* 1708 mostraron reducciones del 9 y 6 % respectivamente los 30 min, y de 69 y 82 % respectivamente a los 60 min. Finalmente, a los 120 min de incubación, el número de UFC sólo disminuyó un 10 % en ambas cepas.

La capacidad de *M. loti* sobreexpresora de SOD de dismutar con mayor eficiencia el superóxido generado en la reacción de XOD puede haber contribuido a la mayor tolerancia de esta cepa respecto de su control. Se conoce que la capacidad de dismutación del $\cdot\text{O}_2^-$ por SOD es del orden de $10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y que es una reacción independiente del pH, mientras que la tasa de dismutación del anión de modo espontáneo ocurre, a pH fisiológico, a $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ (Fridovich, 1985).

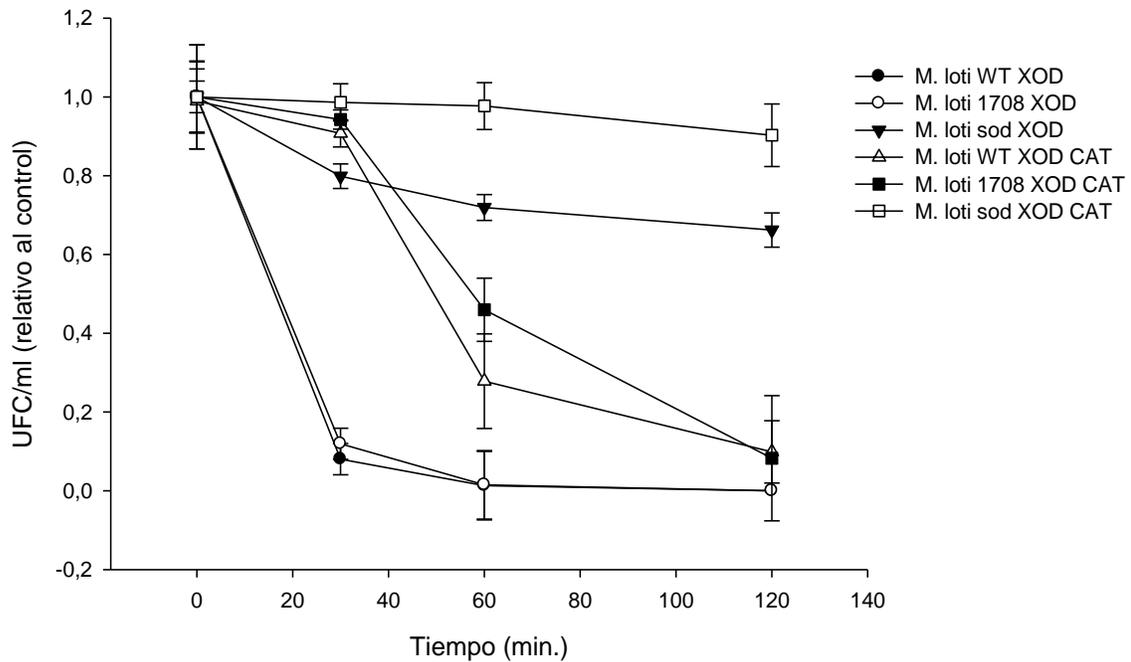


Figura 5.2: Tolerancia de las cepas *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod expuestas a $\cdot\text{O}_2^-$ generado por el agregado de hipoxantina/xantina oxidasa (XOD) y catalasa (1 U/mL). Las UFC/mL están expresadas relativos al inicio del tratamiento. Los datos representan la media \pm E.E. de cultivos independientes. n=3.

5.3 Evaluación de la tolerancia a estrés oxidativo de *S. meliloti* con sobreexpresión de SOD.

5.3.1 Obtención de la cepa *S. meliloti* sod.

En esta tesis, también se evaluó el efecto de la sobreexpresión heteróloga del gen *mlr7636* en *S. meliloti* 1021 en relación a su tolerancia a estrés oxidativo. Los vectores pFAJ1708 y pFAJsod pudieron ser transformados en *S. meliloti* vía conjugación biparental y se obtuvieron las cepas *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod, las cuales fueron capaces de nodular con éxito *M. sativa*.

Se confirmó la expresión heteróloga del gen *mlr7636* en *S. meliloti* sod por la visualización en zimograma ND-PAGE de dos bandas con actividad SOD adicionales a la endógena presente en los extractos de células enteras de las tres cepas (Figura 5.3). Idéntico perfil fue hallado en los extractos periplásmicos de las cepas *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod.

Las bandas adicionales a la SOD endógena, presentaron valores de Rf de 0,35 y 0,42, mientras que la actividad endógena en las tres cepas presentó un Rf de 0,50.

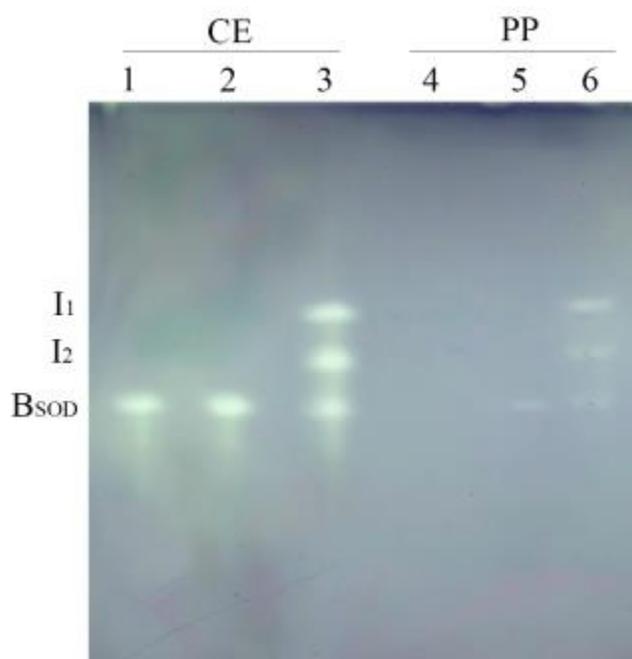


Figura 5.3: Zimograma de SOD de proteínas totales (1, 2 y 3) de *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod respectivamente en célula entera (CE) y proteínas de espacio periplásmico (PP), calles 4, 5 y 6, de *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod. BSOD: actividad basal, I₁: SOD inducida 1, I₂: SOD inducida 2.

5.3.2 Tolerancia de *S. meliloti* a H₂O₂.

Se ensayó la tolerancia a 1 mM de H₂O₂ en *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod. En *S. meliloti* WT la reducción en el número de UFC/mL fue del 80% a los 30 min, mientras que en *S. meliloti* 1708 el efecto del tratamiento se observó a los 60 min, momento en que la proporción de sobrevivencia fue similar a la de la WT, aunque no fueron capaces de sobrevivir hacia los 120 min del tratamiento. Por el contrario, la cepa sobreexpresora *S. meliloti* sod mostró una mayor tolerancia a H₂O₂ aunque a los 60 min el número de UFC/mL disminuyó a la mitad (Figura 5.4) y al 20 % a los 120 min de tratamiento.

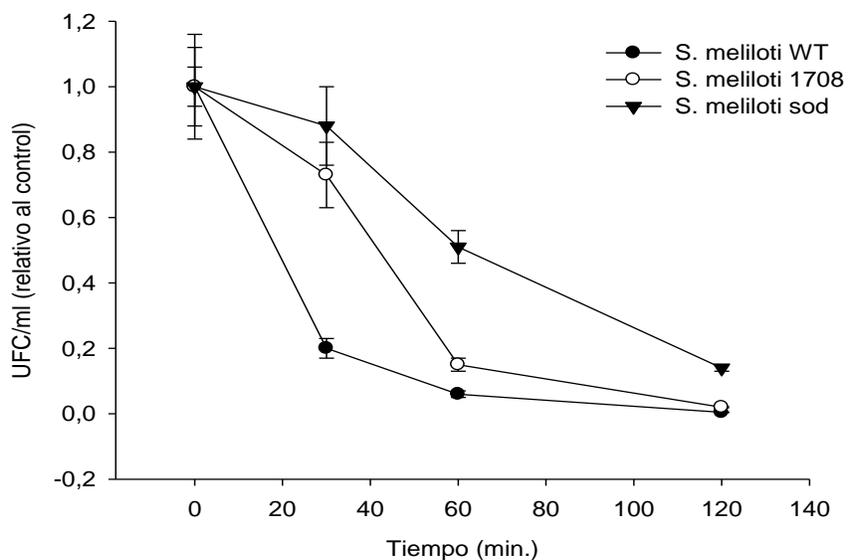


Figura 5.4: Tolerancia de las cepas *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod a 1 mM de H₂O₂. Los resultados de células viables están expresados relativos al control. Los datos representan la media ± E.E. de cultivos independientes. n=3.

5.3.3 Tolerancia de *S. meliloti* a $\cdot\text{O}_2^-$.

La tolerancia a superóxido de *S. meliloti* sod fue significativamente mayor que la de *S. meliloti* WT y *S. meliloti* 1708, ya que su número de UFC se redujo en un 48 % a los 120 min, mientras que las restantes cepas no sobrevivieron a este estrés (Figura 5.5). El agregado de catalasa (1 U/mL) a la mezcla de reacción provocó que la población de *S. meliloti* sod se mantuviese sin cambios significativos a lo largo de todo el tratamiento (Figura 5.5). *S. meliloti* WT y *S. meliloti* 1708 en presencia de CAT mostraron menores reducciones en las UFC/mL hasta los 30 min aunque a los 60 min las reducciones fueron del 69 y 82 % respectivamente.

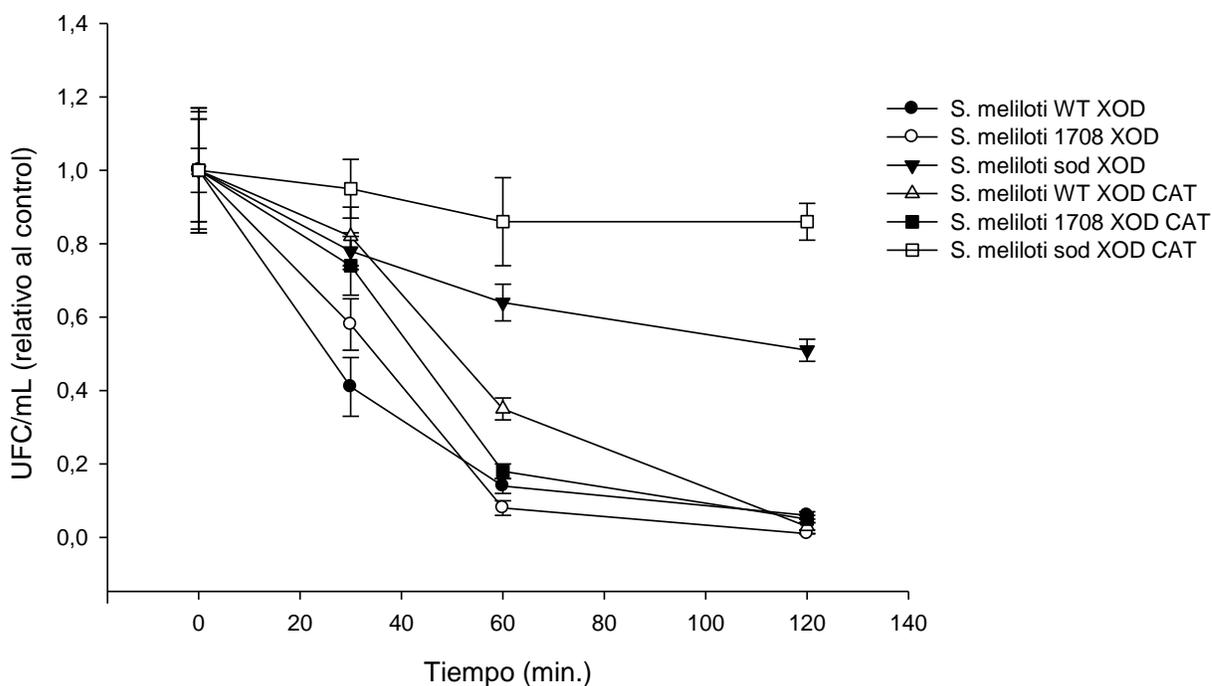


Figura 5.5: Tolerancia de las cepas *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod expuestas a $\cdot\text{O}_2^-$ generado por el agregado de hipoxantina/xantina oxidasa (XOD) y catalasa (1 U/mL). Las UFC/mL están expresadas relativos al inicio del tratamiento. Los datos representan la media \pm E.E. de cultivos independientes. n=3.

5.4 Discusión.

5.4.1 Efecto de H₂O₂ sobre la tolerancia de *M. loti* y *S. meliloti* con sobreexpresión de SOD.

Los experimentos realizados por Santos et al. (1999), expusieron la importancia de la actividad SOD sobre la vida aeróbica de una cepa de *E. coli* deficiente en esta enzima mediante la complementación del gen *sod* de *S. meliloti*. Como resultado de la complementación génica se restableció el crecimiento de esta cepa de *E. coli* en aerobiosis. Según Touati et al. (1995), la baja tolerancia a H₂O₂ que presentan los cultivos de *E. coli* con deficiencia en la expresión de SOD, es la causa de la inhibición del crecimiento en aerobiosis, y la toxicidad por H₂O₂ se debe a su capacidad de penetrar las membranas biológicas y reaccionar con Fe⁺² libre intracelular por la reacción de Fenton produciendo radical hidroxilo, el cual presenta alta reactividad a proteínas, lípidos y ADN.

En este estudio, una de las respuestas de cultivos de *M. loti* expuestos a salinidad fue el incremento de la actividad SOD y CAT (Tabla 3.1). La inducción de SOD ha sido asociada al aumento de tolerancia a las EAOs (Scott et al., 1987 y Fridovich 1997). En ese sentido, los resultados de los ensayos de tolerancia a H₂O₂ y ·O₂⁻ demostraron que la sobreexpresión del gen *mlr7636* en *M. loti* y *S. meliloti* produjo un fuerte aumento en la tolerancia a estas dos EAOs en vida libre, confirmando así que la sobreexpresión de SOD confiere tolerancia frente a estrés oxidativo.

No obstante, la adición de catalasa a la reacción hipoxantina/xantina oxidasa para la generación de ion superóxido, redujo los efectos tóxicos del H₂O₂ formado por dismutación de ·O₂⁻, lo que se tradujo en un incremento significativo de la tolerancia de *M. loti* y *S. meliloti* con sobreexpresión de SOD. Resultados similares fueron reportados en cultivos de bifidobacterias expuestas a estrés oxidativo (Kawasaki, 2006 y Rodríguez, 2015).

A partir de los resultados de la adición de catalasa a *M. loti* y *S. meliloti* expuestos a estrés oxidativo, se deduce que el H₂O₂ sería la principal EAO responsable de la disminución del número de UFC. Estos resultados concuerdan con los presentados por Scott et al. (1987), quienes concluyen que, para cultivos de *E. coli* con sobreexpresión de SOD, la especie más nociva es el H₂O₂, aunque, a diferencia de lo observado en *M. loti* en esta tesis, en *E. coli* no detectaron incrementos en la actividad CAT en condiciones de estrés salino y osmótico.

Cabe señalar que la concentración intracelular de H₂O₂ depende tanto de la velocidad de influjo y generación endógena como de las velocidades de eliminación y eflujo hacia el medio extracelular. Además se cree que la difusión de H₂O₂ a través de la membrana celular ocurre prácticamente con la misma facilidad que con las moléculas de agua (Seaver e Imlay, 2001). Sin embargo, se halló que la difusión del H₂O₂ a través de la membrana celular es limitada en *S. cerevisiae* y *E. coli* (Bienert et al., 2006). Pese a ello, los tratamientos con peróxido de hidrógeno realizados en esta tesis tuvieron un drástico efecto en la supervivencia de los rizobios.

Por otro lado, resulta interesante señalar que la sobreexpresión heteróloga del gen *mlr7636* en *S. meliloti*, indujo la aparición de dos bandas con actividad SOD adicionales a la endógena que fueron evidenciadas en el zimograma de la figura 5.3. De forma similar al resultado obtenido con la sobreexpresión de *sod* en *M. loti*, el gen *SMc00043* aparece como el único responsable de codificar una Fe-SOD en el genoma de *S. meliloti* publicado en la base de datos Rhizobase (Fujisawa et al., 2014). Otra particularidad, de la sobreexpresión heteróloga en *S. meliloti*, es que tanto la banda endógena como las adicionales, fueron detectadas en el espacio periplásmico.

A pesar de que en la caracterización bioquímica de SOD de la cepa *M. loti sod*, se halló que, *in vitro*, las bandas adicionales fueron susceptibles a inhibición por H₂O₂, los ensayos de tolerancia de *M. loti* a H₂O₂ demostraron que la sobreexpresión de SOD protegió a la bacteria del estrés oxidativo. Estos resultados podrían estar relacionados con el aumento de los niveles de catalasa observado en las bacterias expuestas a estrés abiótico mostrados en la tabla 3.1.

Capítulo 6: Caracterización y efectos de la sobreexpresión de SOD en *M. loti* y *S. meliloti* en la interacción con *L. japonicus* y *M. sativa* en condición control y de estrés salino.

En este capítulo se mostrarán los resultados del efecto de la sobreexpresión de SOD en *M. loti* y *S. meliloti* sobre el crecimiento de plantas de *L. japonicus* y *M. sativa* inoculadas con estas bacterias y cultivadas en ausencia o presencia de estrés salino.

6.1 Efecto de la inoculación de *M. loti* sobreexpresora de SOD sobre el crecimiento de *L. japonicus* en estrés salino.

Se evaluó el efecto de la inoculación de las cepas *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod sobre el crecimiento de *L. japonicus* MG20, en condición control y de estrés salino. Se midió en cada planta el número de nódulos, altura y longitud radical, peso fresco aéreo y radical (PFA y PFR), peso seco aéreo y radical (PSA y PSR) y contenido hídrico (CH). En todos los ensayos, se utilizó como control positivo de la nodulación la cepa salvaje *M. loti* WT y como control negativo plantas sin inocular. En todos los parámetros evaluados se consideraron para el análisis estadístico, las cepas, el tratamiento y la interacción entre cepas y tratamientos.

El estrés salino redujo el **número de nódulos** por planta con disminuciones del 63 % para *M. loti*, 70 % para *M. loti* 1708 y 100 % para *M. loti* sod, indicando que, en salinidad, se inhibió la capacidad de inducir a formación de nódulos de la cepa sobreexpresora de SOD (Tabla 6.1).

La **altura** de las plantas de *L. japonicus* presentó diferencias significativas entre las inoculadas con las diferentes cepas, entre tratamientos y se encontró interacción cepa por tratamiento. De forma general, para una misma condición, las plantas inoculadas presentaron mayor altura que las no inoculadas. En ausencia de salinidad, las plantas inoculadas con las cepas *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod presentaron incrementos en la longitud del 42, 49 y 37 % respectivamente, en comparación con plantas sin inocular, aunque sin diferencias significativas entre las distintas cepas (Tabla 6.1). El mismo efecto fue observado en el tratamiento salino, ya que las plantas inoculadas también presentaron mayor altura que las sin inocular, aunque el crecimiento alcanzado fue menor al del tratamiento sin salinizar.

Tabla 6.1: Nodulación y parámetros de crecimiento de *L. japonicus* no inoculadas, e inoculadas con las cepas *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod en condición control y de estrés salino.

Planta	<i>Lotus japonicus</i> MG20							
	Control				150 mM NaCl			
Condición								
Tratamiento	No inoc.	<i>M. loti</i> WT	<i>M. loti</i> 1708	<i>M. loti</i> sod	No inoc.	<i>M. loti</i> WT	<i>M. loti</i> 1708	<i>M. loti</i> sod
N° de nódulos ¹	-	2,25 ± 0,40	2,35 ± 0,36	2,31 ± 0,45	-	0,86 ± 0,37*	0,83 ± 0,39*	0,00 ± 0,00
Altura (cm)	3,10 ± 0,70	4,40 ± 0,39*	4,61 ± 0,35*	4,26 ± 0,43*	1,80 ± 0,25**	3,63 ± 0,21	3,32 ± 0,23	3,23 ± 0,16
Long. radical (cm)	5,84 ± 1,30*	9,05 ± 0,73	10,07 ± 0,65	11,22 ± 0,81	5,34 ± 1,30*	9,79 ± 1,10	11,20 ± 1,19	9,93 ± 0,81
PFA (mg)	10,33 ± 1,01*	23,12 ± 1,11	23,60 ± 1,26	18,18 ± 0,83**	6,24 ± 1,01***	24,68 ± 1,68	25,83 ± 2,31	10,00 ± 0,83*
PSA (mg)	1,10 ± 0,13*	2,19 ± 0,11	2,13 ± 0,15	1,68 ± 0,09 **	0,62 ± 0,12***	2,33 ± 0,18	2,27 ± 0,17	1,36 ± 0,05*
PFR (mg)	24,23 ± 2,13*	38,46 ± 3,98	39,24 ± 3,19	38,10 ± 2,90	22,95 ± 1,42*	44,21 ± 6,22	50,97 ± 5,51	18,73 ± 1,68*
PSR (mg)	2,50 ± 0,57*	3,64 ± 0,32	3,31 ± 0,28	3,47 ± 0,35	2,10 ± 0,43*	4,14 ± 0,37	4,59 ± 0,39	2,52 ± 0,27*
CHA (%)	88,83 ± 0,79*	90,50 ± 0,23	91,05 ± 0,17	90,72 ± 0,27	90,19 ± 0,85	90,58 ± 0,21	91,24 ± 0,39	86,18 ± 0,55**
CHR (%)	89,63 ± 0,53	90,52 ± 0,30	91,57 ± 0,27	90,89 ± 0,49	90,76 ± 0,53	90,58 ± 0,45	90,89 ± 0,49	86,17 ± 0,33*

PFA = peso fresco aéreo (mg); PSA = peso seco aéreo (mg); PFR = peso fresco radical (mg); PSR = peso seco radical (mg); CHA = contenido hídrico aéreo (%); CHR = contenido hídrico radical (%). Los valores representan la media ± E. E. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas en la interacción cepa por tratamiento con DGC test $p \leq 0,05$. ¹Se aplicó análisis para variables discretas. n=20.

La **longitud radical** de *L. Japonicus* se vio afectada por la inoculación de *M. loti*. En los tratamientos control y salino se observaron incrementos en plantas inoculadas con las cepas *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod, que fueron del 55, 73 y 92 % respecto al testigo sin inocular en condición control, y del 83, 100 y 86 % en la condición salina, comparados al testigo sin inocular (Tabla 6.1).

El tratamiento salino disminuyó el **PFA** de las plantas no inoculadas. Sin embargo, en ausencia de salinidad se hallaron incrementos significativos en respuesta a la inoculación con *M. loti* WT y *M. loti* 1708 de 126 y 128 % respectivamente, mientras que la cepa sobreexpresora *M. loti* sod produjo un incremento de 76 % respecto al testigo sin inocular (Tabla 6.1). En salinidad los incrementos de PFA fueron similares a los determinados en la condición control, aunque esta vez, las diferencias presentaron mayor contraste con incrementos de 295 y 311 % cuando fueron inoculadas con *M. loti* WT y *M. loti* 1708 respectivamente, y de un 40 % con *M. loti* sod (Tabla 6.1).

El **PSA** de las plantas inoculadas con *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod mostró incrementos del 104, 99 y 55 % en ausencia de salinidad, y de 198, 194 y 74 % en salinidad, respectivamente (Tabla 6.1). En cada condición, los incrementos de PSA en presencia de *M. loti* sod fueron significativamente menores a los observados en plantas inoculadas con las demás cepas.

El **PFR** de las plantas inoculadas con *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod no mostró diferencias significativas entre los tratamientos, aunque el análisis del efecto de la interacción cepa por tratamiento, reveló un efecto significativo de la inoculación en condiciones control con incrementos que fueron de 59, 62 y 57 % respectivamente, comparadas a las no inoculadas. En 150 mM NaCl, se encontraron incrementos del 133 y 147 % en el peso fresco de las raíces de las plantas que fueron inoculadas con *M. loti* WT y *M. loti* 1708 respectivamente, no habiéndose encontrado diferencias significativas entre las raíces de las plantas inoculadas con *M. loti* sod respecto a las plantas no inoculadas (Tabla 6.1).

Los valores de **PSR** no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos control y salino. Sin embargo, del análisis del efecto de la interacción cepa por tratamiento, surge que los pesos secos de las plantas inoculadas en condición control con *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y

M. loti sod, se incrementaron 45, 32 y 40 % respectivamente, en comparación a las no inoculadas. Por otro lado, los pesos secos de las raíces de las plantas crecidas en salinidad, mostraron incrementos significativos de 97 y 127 % cuando se inocularon con las cepas *M. loti* WT y *M. loti* 1708 respectivamente (Tabla 6.1).

El **CHA** de *L. japonicus* mostró una disminución del 0,9 % en las plantas debido a la exposición al estrés salino. Además, en ausencia de salinidad, las plantas mostraron un aumento significativo de 1,9; 2,5 y 2,1 % cuando fueron inoculadas con *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod, respectivamente. En cambio, en salinidad, no se observaron diferencias entre las plantas no inoculadas y las inoculadas con las cepas *M. loti* WT y *M. loti* 1708. Mientras que las inoculadas con *M. loti* sod mostraron una reducción del 4,5 % respecto de las no inoculadas (Tabla 6.1).

Por último, en plantas inoculadas con *M. loti* sod y creciendo en estrés salino, el **CHR** se redujo 5,1 % respecto a las no inoculadas (Tabla 6.1).

6.2 Efecto del estrés salino sobre la nodulación de *M. sativa* inoculada con *S. meliloti* sobreexpresora de SOD.

Se estableció la condición de estrés salino para el crecimiento de *M. sativa* analizando el poder germinativo de sus semillas en 0, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 y 500 mM de NaCl. Se obtuvo 100 % de germinación hasta la concentración de 200 mM NaCl, por lo que se fijó esta concentración para realizar los ensayos de inoculación.

El **número de nódulos** por planta disminuyó un 35,8 % en el tratamiento salino respecto al control. Sin embargo, en ausencia de salinidad, el número de nódulos formados por la cepa sobreexpresora de SOD fue 25 % menor respecto de las plantas inoculadas con la cepa WT (Tabla 6.2).

La **altura** de *M. sativa* mostró un aumento significativo en todas las plantas inoculadas respecto de las no inoculadas en ambas condiciones. En general, la salinidad afectó su crecimiento, sin hallarse diferencia entre las cepas inoculadas (Tabla 6.2).

La **longitud radical** disminuyó en las plantas inoculadas respecto de las no inoculadas en ambos tratamientos, excepto cuando se utilizó la cepa *M. loti* 1708 en el tratamiento control (Tabla 6.2).

Tabla 6.2: Nodulación y parámetros de crecimiento de *M. sativa* no inoculadas, e inoculadas con las cepas *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod en condición control y de estrés salino.

Planta	<i>Medicago sativa</i> PROINTA Súper Monarca							
	Control				200 mM NaCl			
Condición								
Tratamiento	No inoc.	<i>S. meliloti</i> WT	<i>S. meliloti</i> 1708	<i>S. meliloti</i> sod	No inoc.	<i>S. meliloti</i> WT	<i>S. meliloti</i> 1708	<i>S. meliloti</i> sod
N° de nódulos ¹	-	3,26 ± 0,43	3,23 ± 0,43	2,38 ± 0,33*	-	1,55 ± 0,31*	1,85 ± 0,36*	2,31 ± 0,34*
Altura (cm)	4,11 ± 0,33*	5,95 ± 0,44	5,95 ± 0,41	5,61 ± 0,52	2,82 ± 0,14**	3,93 ± 0,28*	3,98 ± 0,34*	3,52 ± 0,26*
Long. radical (cm)	18,03 ± 1,53	14,43 ± 1,07*	15,93 ± 1,07	13,69 ± 0,95*	16,81 ± 1,59	12,52 ± 1,10*	14,25 ± 1,17*	13,24 ± 1,00*
PFA (mg)	0,03 ± 3,4E ⁻³	0,03 ± 2,4E ⁻³	0,03 ± 2,4E ⁻³	0,03 ± 2,1E ⁻³	0,02 ± 3,5E ⁻³	0,03 ± 2,4E ⁻³	0,03 ± 2,6E ⁻³	0,03 ± 2,2E ⁻³
PSA (mg)	1,74 ± 0,30*	2,68 ± 0,21	2,75 ± 0,21	2,73 ± 0,19	1,73 ± 0,31*	2,23 ± 0,22	2,45 ± 0,23	2,35 ± 0,20
PFR (mg)	0,03 ± 2,9E ⁻³ *	0,03 ± 2,0E ⁻³	0,03 ± 2,0E ⁻³	0,02 ± 1,8E ⁻³	0,03 ± 3,0E ⁻³ *	0,02 ± 2,1E ⁻³	0,02 ± 2,2E ⁻³	0,03 ± 1,9E ⁻³
PSR (mg)	2,86 ± 0,27	2,28 ± 0,19	2,60 ± 0,19	1,95 ± 0,17*	2,64 ± 0,28	1,97 ± 0,20*	1,97 ± 0,21*	2,35 ± 0,18
CHA (%)	84,82 ± 1,53*	91,96 ± 1,06	91,00 ± 1,06	93,47 ± 0,95	86,26 ± 1,58*	89,80 ± 1,10	92,07 ± 1,16	90,00 ± 1,00
CHR (%)	91,33 ± 0,14*	91,27 ± 0,11*	91,24 ± 0,13*	91,53 ± 0,11	91,58 ± 0,21	91,51 ± 0,12	91,42 ± 0,14	91,50 ± 0,13

PFA = peso fresco aéreo (mg); PSA = peso seco aéreo (mg); PFR = peso fresco radical (mg); PSR = peso seco radical (mg); CHA = contenido hídrico aéreo (%); CHR = contenido hídrico radical (%). Los valores representan la media ± E. E. Los asteriscos (*) indican diferencias significativas en la interacción cepa por tratamiento con DGC test $p \leq 0,05$. ¹Se aplicó análisis para variables discretas. n=20.

El **PFA** de las plantas inoculadas con *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod, se vio incrementado en un 35,5; 37,5 y 36,7 % respectivamente en condición control, y en salinidad se observaron incrementos de 23,3; 29,0 y 27,2 %, respecto de las no inoculadas (Tabla 6.2).

El **PSA** mostró incrementos de 35,2; 34,8 y 33,0 % en las plantas inoculadas con *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod respectivamente, e incrementos de 22,4; 26,6 y 26,4 % en salinidad (Tabla 6.2).

El **PFR** fue significativamente menor en las plantas controles inoculadas con *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod, un 20,5; 18,0 y 29,1 % respectivamente, respecto de las plantas no inoculadas. En tanto que en salinidad se observaron disminuciones de 26,2; 26,5 y 12,6 %, comparadas con las plantas no inoculadas (Tabla 6.2).

El **PSR** de *M. sativa*, inoculada con *S. meliloti* sod, disminuyó un 33,5 %, comparado con las no inoculadas en condición control. En salinidad, las plantas inoculadas con *S. meliloti* WT, y *S. meliloti* 1708 mostraron disminuciones significativas de 25,4 y 25,3 % respectivamente, mientras que la inoculación con *S. meliloti* sod no produjo cambios significativos en comparación a las no inoculadas (Tabla 6.2).

El **CHA** se vio incrementado en ambas condiciones en respuesta a la inoculación. En control, las plantas inoculadas con las cepas *S. meliloti* WT, *S. meliloti* 1708 y *S. meliloti* sod presentaron incrementos de 6,2; 7,0 y 7,2 %, mientras que en salinidad los aumentos fueron de 4,0; 7,0 y 3,2 % respectivamente (Tabla 6.2).

El **CHR** mostró un incremento significativo del 0,2 % cuando las plantas fueron inoculadas con la cepa *S. meliloti* sod en condición control, en comparación con las no inoculadas, mientras que la inoculación de las cepas *S. meliloti* WT y *S. meliloti* 1708 no tuvo efecto significativo sobre el contenido acuoso de las raíces (Tabla 6.2). Por último, en el tratamiento salino no se hallaron respuestas significativas en respuesta a la inoculación.

6.3 Discusión

Los efectos adversos provocados por la salinidad sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas han sido descritos por Munns y Tester (2008) y Shabala y Munns (2017). Además, estudios realizados en *M. sativa* en simbiosis con *S. meliloti* GR4 demostraron que tanto el crecimiento vegetal como la biomasa nodular y la tasa de fijación de nitrógeno se vieron disminuidas en presencia de 200 mM de NaCl (Palma et al., 2014).

La salinidad provocó la reducción en el número de nódulos tanto en plantas de *L. japonicus* como de *M. sativa*, tal como se ha descrito en los trabajos de Liu et al. (2011) y Bruning y Rozema (2013), quienes encontraron que la capacidad de nodulación se vio afectada a partir de 50 mM de NaCl. Asimismo, la nodulación se vio mayormente afectada en el sistema *L. japonicus*-*M. loti*, esto podría estar relacionado a la baja tolerancia a salinidad que presenta la cepa *M. loti* MAFF303099 respecto de la cepa *S. meliloti* 1021 descrita por Bianco y Defez (2009) y Laranjo y Oliveira (2011).

En relación a la inhibición de la nodulación ocurrida en las plantas de *L. japonicus* que fueron inoculadas con la cepa *M. loti* sod en salinidad, es posible que exista un efecto antagónico entre la sobreexpresión de SOD en el rizobio y las respuestas de la interacción rizobio-leguminosa expuesta a estrés por NaCl.

Durante las primeras etapas del establecimiento de la simbiosis ocurre una inducción transiente de las EAOs producidas por actividad NADPH oxidasa de los pelos radicales en respuesta a la percepción de los FNs (Suzaki et al., 2015). En las leguminosas, las EAOs actúan como moléculas señales de interacción simbiótica y constituyen una de las respuestas más tempranas en la modulación de la interacción rizobio-leguminosa, necesaria para la infección y organogénesis del nódulo (Cárdenas y Quinto, 2008). Estudios realizados por Peleg-Grossman et al. (2007), demostraron la participación crucial de las EAOs en el curvado del pelo radical y la formación del hilo de infección en *M. truncatula*. Si bien en plantas crecidas en condiciones óptimas, las EAOs son generadas como parte del metabolismo en organelas como cloroplastos, mitocondria y peroxisomas, Miller et al. (2010) describe que las EAOs también pueden causar daño oxidativo a las células cuando son expuestas a condiciones de estrés abiótico como salinidad. Por consiguiente, es posible que la inhibición de la nodulación de *L. japonicus* por *M.*

loti sod en salinidad sea consecuencia de un desbalance en los niveles de EAOs que intervienen en la modulación de la respuesta a la nodulación.

Con lo anteriormente planteado, queda en evidencia que a pesar de que la sobreexpresión de SOD aumentó la tolerancia de *M. loti* a $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 en vida libre, afectó negativamente su capacidad de nodular *L. japonicus* en estrés salino. Otros experimentos para medir EAOs deberían llevarse a cabo para determinar las posibles causas de la inhibición de la nodulación de *L. japonicus* con *M. loti* sobreexpresor de SOD en salinidad.

A pesar de ello, resulta paradójico que aun no habiéndose establecido la simbiosis fijadora de nitrógeno, los parámetros de crecimiento de la parte aérea (altura y biomasa) fueron superiores a los de plantas sin inocular, sugiriendo la existencia de otros mecanismos implicados en revertir los efectos de la salinidad sobre *Lotus*. Probablemente, dicho efecto estaría asociado a una actividad PGP del microsimbionte en su estado de vida libre. En este sentido, Glick (2014) describió la presencia en *M. loti* del gen *acdS* (*mlr5932*) que codifica para la enzima ACC desaminasa. La ACC desaminasa ha sido fuertemente asociada a la mitigación de los efectos de estrés sobre el crecimiento vegetal (Goswani et al., 2016; Ghosh et al., 2018). Ello, debido a que la ACC desaminasa regula los niveles de etileno (Mayak et al., 2004; Glick et al., 2007; Glick 2014), el cual es una de las principales hormonas que se ve incrementada en situaciones de estrés y causa inhibición del crecimiento vegetal (Bernardo et al., 2000; Saleem et al., 2007). Sin embargo, también fue descrito por Sullivan et al. (2002), Uchiumi et al. (2004) y Nukui et al. (2012), que la regulación transcripcional de la ACC desaminasa de varias cepas de *M. loti* están bajo el control transcripcional del promotor *nifA*, responsable de la transcripción de los genes de la fijación de nitrógeno, por lo que probablemente pueda estar actuando otro mecanismo del tipo tolerancia sistémica inducida elicitada por la PGPR, que podría atenuar los efectos del estrés abiótico sobre la planta (Yang et al., 2009; Govindasamy et al., 2018).

En cambio, en plantas de *M. sativa*, se encontró una respuesta diferente a la de *L. japonicus*, ya que la nodulación inducida por la cepa *S. meliloti* sod no fue inhibida tanto en condición control ni de salinidad. Probablemente las diferencias en los resultados obtenidos en ambos sistemas estén relacionadas al nivel de tolerancia de los rizobios a NaCl, y también a que *M. sativa* es considerada halófila (Munns y Tester, 2008).

La salinidad provocó una reducción del crecimiento en altura de las plantas de *L. japonicus* y *M. sativa*, tal como fue descrito por López et al. (2008) y Palma et al. (2014). Sin embargo, la inoculación indujo el crecimiento de ambas plantas en ausencia y presencia de salinidad. Este mayor crecimiento de las plantas inoculadas podría responder a un efecto PGPR de los rizobios diferente a la fijación de nitrógeno, dado que aún las plantas sometidas a estrés y que no fueron noduladas por la cepa sobreexpresora presentaron elongaciones de parte aérea y radical como las que fueron noduladas. En este sentido, existen numerosos reportes que demuestran que los rizobios poseen otros efectos PGPR, incluso en plantas no leguminosas, mejorando su nutrición mineral y promoviendo el crecimiento vegetal (Poitout et al., 2017). En consecuencia, resulta conveniente analizar los datos de la biomasa de las plantas en respuesta a la inoculación con rizobios. Los aumentos en PFA y PSA experimentados por las plantas de *L. japonicus* y *M. sativa* inoculadas, probablemente estén ligados a la capacidad de inducir la formación de nódulos, ya que plantas de *L. japonicus* en salinidad inoculadas con la cepa sobreexpresora presentaron menor crecimiento.

El CH revela la capacidad de la planta de mantener la cantidad de agua en los tejidos en los niveles óptimos para hacer frente al estrés ambiental (Negrão et al., 2017). Las plantas bajo condiciones de estrés salino tienden a perder agua, lo cual puede rápidamente afectar la expansión y división celular, la apertura estomática y la acumulación de ácido abscísico (Hsiao y Xu, 2000). Se ha informado que la capacidad de las plantas para mantener niveles normales de transpiración en estrés es un indicador de la tolerancia a la sal, especialmente debido a que la transpiración se relaciona con la toma de CO₂ para la fotosíntesis (Harris et al., 2010). Así, La disminución de los valores de CHA y CHR experimentado por *L. japonicus* inoculadas con *M. loti* sod en salinidad, podría estar relacionado a que estas plantas ocurrió inhibición de la nodulación.

Capítulo 7: Conclusiones

El establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa y la fijación biológica de nitrógeno se ven a menudo altamente afectadas por situaciones de estrés abiótico como sequía y salinidad. Si bien los estreses abióticos son causados por una variedad de condiciones, tienen en común que desencadenan mecanismos comunes que conllevan al aumento de las EAOs que alteran la homeostasis celular tanto de las plantas como de los rizobios de manera independiente como en simbiosis. En este sentido, tanto las plantas hospedadoras como su contraparte microbiana, cuentan con un sistema de defensa antioxidante enzimático y no enzimático. Dentro de los componentes enzimáticos, la SOD constituye la primera barrera de defensa contra $\cdot\text{O}_2^-$ que lo dismuta a peróxido de hidrógeno y agua.

Las enzimas catalasa, peroxidasa y glutatión reductasa completan el sistema antioxidante enzimático: las dos primeras hidrolizan el peróxido a agua, y la glutatión reductasa mantiene el pool de glutatión reducido, que es uno de los componentes antioxidantes no enzimáticos. Tanto las leguminosas como los rizobios expuestos a estrés hídrico modifican las actividades enzimáticas que les permite mantener el balance redox a la vez que se producen otras adaptaciones como la acumulación de osmolitos compatibles como prolina en las plantas, y trehalosa en las bacterias. De forma general, los estreses abióticos afectan el proceso de infección de la leguminosa por el rizobio disminuyendo o inhibiendo la nodulación y la FBN, lo que puede traducirse en mermas de la producción de los sistemas agrícolas. En Argentina, la producción de cultivos extensivos en la región pampeana fue desplazando las zonas típicamente ganaderas hacia suelos sometidos a alta salinidad con ciclos alternados de sequía y anegamiento. El cultivo de leguminosas forrajeras del género *Lotus* en la Pampa Deprimida del Salado permite sostener la ganadería en esta región. Otra forrajera ampliamente cultivada en la región Pampeana es *M. sativa*, que ocupa más del 90 % de la superficie y es la principal leguminosa forrajera que sostiene la producción de carne y leche de esta región.

El uso de bacterias rizosféricas con propiedades PGPR, que desencadena la resistencia sistémica inducida es una de las estrategias que incrementan la tolerancia de las plantas a estrés abiótico.

Conjuntamente, la expresión de enzimas que incrementan la acumulación de solutos osmocompatibles así como la expresión de genes antioxidantes que permiten mejorar el sistema

de defensa contra las EAOs posibilita aumentar la nodulación y proteger a las plantas frente a las limitaciones ambientales.

Diversos autores han estudiado las enzimas antioxidantes de varias especies de rizobacterias, mostrando que es esencial mantener la homeostasis redox en el metabolismo de los rizobios para lograr su supervivencia en vida libre, y en simbiosis. Se ha demostrado que una cepa de *S. meliloti* deficiente en catalasa posee baja eficiencia en nodulación, y que la sobreexpresión del gen que codifica para esta enzima también afecta la nodulación ya que modifica los niveles de H₂O₂ apoplástico que actúa como molécula señal sensada por receptores específicos de la membrana plasmática de pelos radicales durante las primeras etapas de la interacción simbiótica. Ha sido también reportado que el curvado del pelo radical, necesario para el ingreso del rizobio, y la progresión del hilo de infección para que éstos lleguen a infectar las células corticales de la raíz, se ven obstaculizados cuando ocurre un desbalance en los niveles de EAOs.

La producción de EAOs apoplástico en la planta se origina por actividad de NADPH oxidasa, la cual transfiere un electrón a O₂ para generar superóxido y posteriormente H₂O₂. Consecuentemente, la SOD bacteriana también es relevante en la protección de los rizobios. Trabajos realizados en *S. meliloti* con deficiencia de SOD reportaron incremento en la sensibilidad del rizobio a estrés oxidativo, y también la modificación de las propiedades simbióticas con *Medicago*. Asimismo, se ha descrito que la delección de GR en *S. meliloti*, disminuyó su tolerancia a H₂O₂ en vida libre y además retrasó la nodulación de *M. sativa*.

Dos aspectos fundamentales se asocian al incremento de la tolerancia de las plantas leguminosas como *Lotus* y *Medicago* a la salinidad: la protección a través de la inoculación con rizobios con propiedades PGPR y el refuerzo del sistema antioxidante.

La sobreexpresión de catalasa en *S. meliloti* no arrojó resultados alentadores para la simbiosis, y si bien la sobreexpresión heteróloga de *sod* de *S. meliloti* en una cepa de *E. coli* deficiente en *sod* posibilitó la complementación génica y el restablecimiento del crecimiento de *E. coli* en aerobiosis, poco se conoce aún de los efectos de la sobreexpresión de *sod* en *S. meliloti* y en rizobacterias en general.

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar la inducción de las enzimas antioxidantes de *M. loti* en respuesta al estrés abiótico, y evaluar la posibilidad de disminuir los efectos nocivos del estrés salino sobre *L. japonicus* mediante la inoculación de rizobios con sobreexpresión de enzimas antioxidantes inducidas en salinidad.

En este trabajo se confirmó que las enzimas SOD y CAT de *M. loti* MAFF303099 se inducen en respuesta a estrés abiótico provocado por salinidad, aunque como era previsible, el crecimiento de la rizobacteria disminuyó en condiciones de estrés salino y osmótico.

Sin embargo, la sobreexpresión de *sod* en *M. loti* aumentó su tolerancia a salinidad, mientras que la delección de dicho gen afectó la viabilidad bacteriana.

La sobreexpresión de SOD aumentó cinco veces los niveles de actividad específica en espacio periplásmico. Los estudios de localización subcelular demostraron además, que la enzima se exportó al periplasma de *M. loti* y *S. meliloti*, aun cuando el análisis para la presencia de péptido señal Sec o TAT no identificó sitio para una peptidasa señal. De acuerdo a Krehenbrink et al. (2011), la presencia de SOD en el periplasma podría tener un efecto protector de los lípidos de membrana y proteínas periplásmicas del daño causado por $\cdot\text{O}_2^-$ extracelular.

En esta tesis, se demostró que la sobreexpresión de SOD protege a *M. loti* y *S. meliloti* frente al estrés oxidativo provocado por ion superóxido y por peróxido de hidrógeno en vida libre. Por otro lado, la adición de catalasa a la reacción de generación de superóxido permitió demostrar que la especie oxidativa que más afecta a la supervivencia de los rizobios es el H_2O_2 , y que, a pesar de que la halotolerancia de *Sinorhizobium* es mayor a la de *Mesorhizobium*, la primera se muestra más susceptible a las EAOs.

En cuanto a la aplicación de rizobios a plantas de *L. japonicus* y *M. sativa* crecidas en estrés salino, en primer lugar se comprobó, como era de esperar, que los parámetros de biomasa de la parte aérea altura y peso seco disminuyen a causa de salinidad, y en segundo lugar, que la inoculación con rizobios incrementó los valores de altura y biomasa de la parte aérea de todas las plantas en ausencia y presencia de salinidad.

Sin embargo, del análisis de la aplicación de los rizobios con sistema antioxidante reforzado a plantas de *L. japonicus* y *M. sativa* para mejorar su tolerancia a salinidad se hallaron diferentes respuestas de nodulación en los dos modelos de interacción utilizados. Por un lado, se encontró que en salinidad la nodulación de *L. japonicus* con *M. loti* sobreexpresor de SOD se inhibe; sin embargo, y a pesar de ello, se comprobó que las plantas inoculadas con este rizobio duplicaron su altura y la biomasa de la parte aérea. En consecuencia, la sobreexpresión de SOD en *M. loti* puede inhibir el establecimiento de la simbiosis en salinidad, y aun así poseer efectos benéficos sobre la planta. Es importante remarcar que las plantas de *Lotus* que fueron inoculadas en salinidad con los rizobios no sobreexpresores mostraron mayor crecimiento y biomasa que las plantas inoculadas con la cepa sobreexpresora, sin embargo los rizobios no sobreexpresores son menos tolerantes a estrés hídrico en vida libre.

Diferente respuesta se obtuvo con las plantas de *M. sativa* inoculadas con *S. meliloti* sobreexpresora de SOD en salinidad. En este caso, los rizobios fueron capaces de nodular la planta y además aumentar su biomasa aérea. Por consiguiente se podría sugerir la existencia de antagonismo y sinergismo entre la sobreexpresión de SOD y la salinidad a la que se expusieron *M. loti* con *L. japonicus* y *S. meliloti* con *M. sativa*, respectivamente.

Es interesante que a pesar de haberse inhibido la nodulación en *L. japonicus*, y por ende el aporte de nitrógeno fijado biológicamente, los parámetros de crecimiento de parte aérea fueron superiores a los de las plantas sin inocular. Se podría hipotetizar que la sobreexpresión de SOD en *M. loti* incrementa la tolerancia del rizobio a condiciones de estrés abiótico, y que su presencia reduce los efectos de la salinidad sobre la planta, probablemente a través de un mecanismo PGPR, acción que se vio reflejada el aumento de la biomasa aérea de la forrajera, lo que a su vez constituye un aspecto deseado para sostener la ganadería en suelos sometidos a salinidad.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis permitieron avanzar en la caracterización de SOD de *M. loti*, conocer la implicancia de su delección, y los efectos de la sobreexpresión en *M. loti* y *S. meliloti* en vida libre frente a estrés oxidativo, y en simbiosis con su leguminosa en salinidad. La sobreexpresión de SOD incrementó la tolerancia de los rizobios a estrés oxidativo causado por $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 , demostrando fehacientemente que en *M. loti* y *S. meliloti*, esta enzima protege de las EAOs.

En conjunto, la inoculación de un microsimbionte cuyo sistema antioxidante se encuentre reforzado por mayor actividad SOD, posibilita no sólo la nodulación de *Lotus* en ausencia de estrés, sino incrementar también el crecimiento vegetal de la parte aérea en condiciones de estrés salino lo que podría representar, potencialmente, una mejora en la producción de esta forrajera para la actividad ganadera de la Pampa Deprimida del Salado.

Bibliografía

- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, y Struhl, K. (1987). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates. Wiley Interscience, New York.
- Azcón-Bieto, J. y Talón, M. (2013). *Fundamentos de Fisiología Vegetal (2^{da} ed.)*. McGraw-Hill – Interamericana de España, S. L. Madrid.
- Basigalup, D. (2007). El Cultivo de la Alfalfa en la Argentina. Ed. INTA. EEA Manfredi.
- Beauchamp, C. y Fridovich, I. (1971). Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal. Biochem.*: 44(1), 276-287.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., Widdick, D., Palmer, T. y Brunak, S. (2005). Prediction of twin-arginine signal peptides. *BMC Bioinformatics*: 6, 167.
- Bernardo, M. A., Dieguez, E. T., Jones, H. G., Chairez, F. A., Ojanguren, C. L. T. y Cortes, A., L. (2000). Screening and classification of cowpea genotypes for salt tolerance during germination. *Int. J. Exp. Bot.*: 67, 71–84.
- Beyer, W. F. y Fridovich, I. (1987). Effect of hydrogen peroxide on the iron-containing superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*: 26(5), 1251–1257.
- Bianco, C. y Defez, R. (2009). *Medicago truncatula* improves salt tolerance when nodulated by an indole-3-acetic acid-overproducing *Sinorhizobium meliloti* strain. *J. Exp. Bot.*: 26(11), 3097-3107.
- Bienert, G. P., Schjoerring, J. K. y Jahn, T. P. (2006). Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta.*:1758(8), 994–1003.
- Boumahdi, M., Mary, P., y Hornez, J. P. (2001). Changes in fatty acid composition and degree of unsaturation of (brady)rhizobia as a response to phases of growth, reduced water activities and mild desiccation. *Antonie Van Leeuwenhoek*: 79(1), 73–79.
- Broughton, W. J. y Dilworth M. J. (1971). Control of leghemoglobin synthesis in snake beans. *Biochem J.*: 125(4), 1075–1080.
- Bruning, B. y Rozema, J. (2013). Symbiotic nitrogen fixation in legumes: Perspectives for saline agriculture. *Environ. Exp. Bot.*: 92,134-143.
- Busse, M. y Bottomley, P. (1989). Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes. *Appl. Environ. Microbiol.*: 55(10), 2431-2436.
- Cannon, S. B. (2013). The Model Legume Genomes. *Methods Mol. Biol.*: 1069, 1–14.
- Carballo, S. y Hartmann, T. (2001). *Evaluación del impacto de las lluvias de Septiembre y Octubre sobre la situación de anegamiento en la zona central*. Recuperado el 6 de febrero de 2018 en conae.gov.ar (<https://goo.gl/8w4zGV>).

- Cárdenas, L. y Quinto, C. (2008). Reactive oxygen species (ROS) as early signals in root hair cells responding to rhizobial nodulation factors. *Plant Signal. Behav.*: 3(12), 1101-1102.
- Chang, W. S., Franck, W. L., Cytryn, E., Jeong, S., Joshi, T., Emerich, D. W., Sadowsky, M. J., y Stacey, G. (2007). An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant Microbe Interact.*: 20(10), 1298–1307.
- Chen, W. X., Wang, E. T. y Kuykendall, L. D. (2005). Genus VI. *Mesorhizobium* Jarvis, van Berkum, Chen, Nour, Fernandez, Cleyet-Marel y Gillis 1997, 897VP. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2da ed.: 2, 403–408. Editado por D. J. Brenner, N. R. Krieg, J. T. Staley y G. M. Garrity. New York: Springer.
- Criado, C. A. (2014). Lotus “PAMPA” INTA Una herramienta de trabajo para los suelos bajos inundables. *EEA INTA Cuenca Del Salado*. Recuperado el 6 de febrero de 2018 en http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_-_lotus_pampa.pdf
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F., y Crowe, L. M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.*: 60(1), 73–103.
- Cytryn, E. J., Sangurdekar, D. P., Streeter, J. G., Franck, W. L., Chang, W.-S., Stacey, G., Emerich, D. W., Joshi, T. y Sadowsky, M. J. (2007). Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. *J. Bacteriol.*: 189(19), 6751–6762.
- Davies, B. W. y Walker, G. C. (2007). Identification of novel *Sinorhizobium meliloti* mutants compromised for oxidative stress protection and symbiosis. *J. Bacteriol.*: 189(5), 2110–2113.
- De Meyer, S. E., Fabiano, E., Tian, R., Van Berkum, P., Seshadri, R., Reddy, T. B. K., Markowitz, V., Ivanova, N. N., Pati, A., Woyke, T., Howieson, J., Kypides, N. C. y Reeve, W. (2015). High-quality permanent draft genome sequence of the *Parapiptadenia rigida*-nodulating *Cupriavidus* sp. strain UYPR2.512. *Stand. Genomic Sci.*: 10(1), 1-8.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., Gonzalez, L., Tablada, M. y Robledo, C. W. (2011). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D. R. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*: 77,7347–7351.
- Dombrecht, B., Vanderleyden, J. y Michiels, J. (2001). Stable RK2-derived cloning vectors for the analysis of gene expression and gene function in gram-negative bacteria. *Mol. Plant Microbe Interact.*: 14(3), 426–430.
- FAO. (2014). *FAO statistical yearbook 2014: Latin America and the Caribbean food and agriculture*. Recuperado el 6 de febrero de 2018 en <http://fao.org/publications>.

- Foyer, C. H y Harbison, J. (1994). *Causes of Photooxidative Stress and amelioration of defense systems in plants*. 1-42. Editado por C. H. Foyer y P. H. Mullineaux. University of Michigan. CRC Press.
- Fouts, D. E., Tyler, H. L., DeBoy, R. T., Daugherty, S., Ren, Q., Badger, J. H., Durking, A. S., Huot, H., Shrivastava, S., Kothari, S., Dodson, R. J., Mohamoud, Y., Khouri, H., Roesch, L. F. W., Krogfelt, K. A., Struve, C., Triplett, E. W. y Methé, B. A. (2008). Complete genome sequence of the N₂-Fixing Broad Host Range endophyte *Klebsiella pneumoniae* 342 and virulence prediction verified in mice. *PLoS Genet.*: 4(7), 1-18.
- Fridovich, I. (1985). Xanthine Oxidase. *Handbook of Methods for Oxygen Radical Research*, ed Greenwald R. A. (CRC Press, Boca Raton, FL): 51–53.
- Fridovich, I. (1997). Superoxide anion radical (O_2^-), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.*: 272(30), 18515–18517.
- Fujisawa, T., Okamoto, S., Katayama, T., Nakao, M., Yoshimura, H., Kajiya-Kanegae, H., Yamamoto, S., Yano, C., Yanaka, Y., Maita, H., Kaneko, T., Tabata, S., y Nakamura, Y. (2014). CyanoBase and RhizoBase: Databases of manually curated annotations for cyanobacterial and rhizobial genomes. *Nucleic Acids Res.*: 42(D1). doi: 10.1093/nar/gkt1145.
- Gage, D. J. (2002). Analysis of infection thread development using GFP- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*: 184(24), 7042–7046.
- Gaje, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*: 68(2), 280–300.
- Ghosh, P. K., De, T. K. y Maiti, T. K. (2018). Role of ACC deaminase as a stress ameliorating enzyme of plant growth-promoting rizobacteria useful in stress agriculture: A review. *Role of Rhizospheric Microbes in Soil*. Springer Nature Singapore Pte. Ltd. Chapter 3, 57-106.
- Glick, B. R., Cheng, Z. Y., Czarny, J. y Duan, J. (2007). Promotion of plant growth by ACC deaminase producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.*: 119(3):329–339.
- Glick, B. R. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiol. Res.*: 169, 30-39.
- Gort, A. S., Ferber, D. M. e Imlay, J. A. (1999). The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*: 32(1), 179–191.
- Goswami, D., Thakker, J. N. y Dhandhukia, P. C. (2016). Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric.*: 2, 1127500, 1-19.
- Gouffi, K., Pica, N., Pichereau, V. y Blanco, C. (1999). Disaccharides as a New Class of Nonaccumulated Osmoprotectants for *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.*: 65(4), 1491–1500.
- Govindasamy, V., George, P., Raina, S. K., Kumar, M., Rane, J. y Annapurna, K. (2018). Plant-associated microbial interactions in the soil environment: role of endophytes in imparting

- abiotic stress tolerance to crops. *Advances in Crop Environment Interaction*. Springer, Singapore.
- Gresshoff, P. M., y Rolfe, B. G. (1978). Viability of Rhizobium bacteroids isolated from soybean nodule protoplasts. *Planta*: 142(3), 329–333.
- Halverson, L. J. y Firestone, M. K. (2000). Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *Appl. Environ. Microbiol.*: 66(6), 2414–2421.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*: 166(4), 557–580.
- Hanyu, M., Fujimoto, H., Tejima, K. y Saeki, K. (2009). Functional differences of two distinct catalases in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 under free-living and symbiotic conditions. *J. Bacteriol.*: 191(5), 1463–1471.
- Harris, B., Sadras, V. y Tester, M. (2010). A water-centred framework to assess the effects of salinity on the growth and yield of wheat and barley. *Plant and Soil*: 336(1–2), 377–389.
- Hassett, D. J., Schweizer, H. P. y Ohman, D. E. (1995). *Pseudomonas aeruginosa* sodA and sodB mutants defective in manganese- and iron-cofactored superoxide dismutase activity demonstrate the importance of the iron-cofactored form in aerobic metabolism. *J. Bacteriol.*: 177(22), 6330–6337.
- Hegde, R. S. y Bernstein, H. D. (2006). The surprising complexity of signal sequences. *Trends Biochem. Sci.*: 31(10), 563–571.
- Heppel, N. (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.*: 240(9), 3685–3692.
- Hérouart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frendo, P., Touati, D. y Puppo, A. (1996). Cloning and characterization of the kata gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J. Bacteriol.*: 178(23), 6802–6809.
- Hirsch, P. R. y Mauchline, T. H. (2015). The importance of the microbial N cycle in soil for crop plant nutrition. *Adv. Appl. Microbiol.*: 93, 45–71.
- Hoelzle, I. y Streeter, J. G. (1990). Increased accumulation of trehalose in Rhizobia cultured under 1 % oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.*: 56(10), 3213–3215.
- Hsiao, T. C. y Xu, L. K. (2000). Sensitivity of growth of roots versus leaves to water stress: biophysical analysis and relation to water transport. *J. Exp. Bot.*: 51(350), 1595–1616.
- Jamet, A., Mandon, K., Puppo, A., y Hérouart, D. (2007). H₂O₂ is required for optimal establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J. Bacteriol.*: 189, 8741–8745.
- Jamet, A., Sigaud, S., Van de Syde, G., Puppo, A. y Hérouart, D. (2003). Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti* – *Medicago sativa* symbiosis and

- their crucial role ruling the infection process. *Mol. Plant Microbe Interact.*: 16(3), 217–225.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, T., Kishida, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. y Tabata, S. (2000). Complete genome structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA Res.*: 7(6), 331–338.
- Katzen, F., Becker, A., Ielmini, M. V., Oddo, C., G. y Ielpi, L. (1999). New mobilizable vectors suitable for gene replacement in Gram-negative bacteria and their use in mapping of the 3' end of the *Xanthomonas campestris* pv. *Campestris gum* operon. *Appl. Environ. Microbiol.*: 65(1), 278-282.
- Kawasaki, S., Mimura, T., Satoh, T., Takeda, K. y Niimura, Y. (2006). Response of the microaerophilic *Bifidobacterium* species, *B. boum* and *B. thermophilum*, to oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.*: 72(10), 6854-6858.
- Krehenbrink, M., Edwards, A. y Downie, J. A. (2011). The superoxide dismutase SodA is targeted to the periplasm in a SecA-dependent manner by a novel mechanism. *Mol. Microbiol.*: 82(1), 164–179.
- Laemli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*: 227, 145-151.
- Lam, H. M., Coschigano, K. T., Oliveira, I. C., Melo-Oliveira, R., y Coruzzi, G. M. (1996). The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*: 47(1), 569–593.
- Lancaster, V. L., LoBrutto, R., Selvaraj, F. M. y Blankenship, R. E. (2004). A cambialistic superoxide dismutase in the thermophilic photosynthetic bacterium *Chloroflexus aurantiacus*. *J. Bacteriol.*: 186(11), 3408-3414
- Laranjo, M. y Oliveira, S. (2011). Tolerance of *Mesorhizobium loti* type strains to different environmental stresses. *Antonie Van Leeuwenhoek*: 99(3), 651-662.
- Layzell, D., B. y Hunt, S., P., G. (1990). Mechanism of nitrogenase inhibition in soybean nodules : pulse-modulated spectroscopy indicates that nitrogenase activity is limited by O₂. *Plant Physiol.*: 92(4), 1101–1107.
- Lebrazi, S. y Fikri-Benbrahim, K. (2014). Environmental stress conditions affecting the N₂ fixing rhizobium-legume symbiosis and adaptation mechanisms. *African J. Microbiol. Res.*: 8(53), 4053–4061.
- Liu, Z. H., Zhang, H. M., Li, G. L., Guo, X. L., Chen, S. Y., Liu, G. B. y Zhang, Y. M. (2011). Enhancement of salt tolerance in alfalfa transformed with the gene encoding for betaine aldehyde dehydrogenase. *Euphytica*: 178, 363-372.

- López, M., Herrera-Cervera, J. A., Iribarne, C., Tejera, N. A. y Lluch, C. (2008). Growth and nitrogen fixation in *Lotus japonicus* and *Medicago truncatula* under NaCl stress: Nodule carbon metabolism. *Plant Physiol. Biochem.*: 165, 641-650.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*: 193(1), 265–275.
- Martin, M. E., Byers, B. R., Olson, M. O., Salin, M. L., Arceneaux, J. E., y Tolbert, C. (1986). A *Streptococcus mutans* superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor. *J. Biol. Chem.*: 261(20), 9361–9367.
- Martins, D. y English, A. M. (2014). Catalase activity is stimulated by H₂O₂ in rich culture medium and is required for H₂O₂ resistance and adaptation in yeast. *Redox Biol.*: 2, 308-313.
- Matamoros, M. A., Dalton, D. A., Ramos, J., Clemente, M. R., Rubio, M. C., y Becana, M. (2003). Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant. Physiol.*: 133(2), 499–509.
- Matés, J. M. (2000). Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology*: 153, 83-104.
- Mayak, S., Tirosh, T. y Glick, B. R. (2004). Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.*: 42,565–572.
- Melchiorre, M., Quero, G. E., Parola, R., Racca, R., Trippi, V. S., y Lascano, R. (2009). Physiological characterization of four model *Lotus* diploid genotypes: *L. japonicus* (MG20 and Gifu), *L. filicaulis*, and *L. burttii* under salt stress. *Plant Sci.*: 177(6), 618–628.
- Melillo, A. A., Mahawar, M., Sellati, T. J., Malik, M., Metzger, D. W., Melendez, J. A. y Bakshi, C. S. (2009). Identification of *Francisella tularensis* live vaccine strain CuZn superoxide dismutase as critical for resistance to extracellularly generated reactive oxygen species. *J. Bacteriol.*: 191(20), 6447-6456.
- Meyer, T. S. y Lamberts, B. L. (1965). Use of Coomassie brilliant blue R-250 for the electrophoresis of microgram quantities of parotid saliva proteins on acrylamide gel strips. *Biochim Biophys Acta.*: 107(1), 169–175.
- Miller, G., Suzuki, N., Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. (2010). Reactive oxygen species, homeostasis and signaling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.*: 33(4), 453–467.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. y Van Breusegem, F. (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*: 9(10), 490-498.
- Morrissey, J. P., Dow, J. M., Mark, G. L. y O’Gara, F. (2004). Are microbes at the root of a solution to world food production? *EMBO Rep.*: 5(10), 922-926.

- Munns, R. y Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*: 59, 651–681.
- Negrão, S., Schmöckel, S. M. y Tester, M. (2017). Evaluating physiological responses of plants to salinity stress. *Ann. Bot.*: 119(1), 1–11.
- Neu, H. C. y Heppel, L. A. (1965). The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.*: 240(9), 3685–3692.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S. y von Heine, G. (1997). Identificación de prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng.*: 10(1), 1-6.
- Nukui, N., Minamisawa, K., Ayabe, S. I. y Aoki, T. (2006). Expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase gene requires symbiotic nitrogen-fixing regulator gene *nifA2* in *Mesorhizobium loti* MAFF303099. *Appl. Environ. Microbiol.*: 72(7), 4964-4969.
- Oldroyd, G. E. D. (2013). Speak, friend, and enter: signaling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.*: 11(4), 252-263.
- Palma, F., López-Gómez, M., Tejera, N. A. y Lluch, C. (2014). Involvement of abscisic acid in the response of *Medicago sativa* plants in symbiosis with *Sinorhizobium meliloti* to salinity. *Plant Sci.*: 223, 16-24.
- Panek, H. R. y O'Brian, M. R. (2004). KatG is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*: 186(23), 7874–7880.
- Parola, R. (2007). *Evaluación del crecimiento y su respuesta antioxidante en Lotus japonicus y Mesorhizobium loti bajo condiciones de estrés salino*. Tesina de grado en Biología, F.C.E.F. y N., Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba, Argentina.
- Peleg-Grossman, S., Volpin, H. y Levine, A. (2007). Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J. Exp. Bot.*: 58(7), 1637–1649.
- Petersen, T. H., Brunak, S., von Heijne, G. y Nielsen, H. (2011). SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nat. Methods*: 8(10), 785–786.
- Poitout, A., Martinière, A., Kucharczyk, B., Queruel, N., Silva-Andia, J., Mashkoo, S., Gamet, L., Varoquaux, F., Paris, N., Sentenac, H., Touraine, B. y Desbrosses, G. (2017). Local signalling pathways regulate the *Arabidopsis* root developmental response to *Mesorhizobium loti* inoculation. *J. Exp. Bot.*: 1(68), 1199–1211.
- Potts, M. (1994). Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.*: 58(4), 755–805.
- Provorov, N. A. y Vorobyov, N. I. (2009). Simulation of bacteria – plant coevolution in the mutualistic symbiosis. *Russ. J. Genet.*: 45(5), 507–519.

- Rodríguez, E., Peirotén, Á., Landerte, J. M., Medina, M. y Arqués, J. L. (2015). Gut catalase-positive bacteria cross-protect adjacent Bifidobacteria from oxidative stress. *Microbes Environ.*: 30(3), 270-272.
- Rubio, M. C., James, E. K., Clemente, M. R., Bucciarelli, B., Fedorova, M., Vance, C. P. y Becana, M. (2004). Localization of superoxide dismutases and hydrogen peroxide in legume root nodules. *Mol. Plant Microbe Interact.*: 17(12), 1294–1305.
- Saleem, M., Arshad, M., Hussain, S. y Bhatti, A. S. (2007). Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*: 34(10), 635-648.
- Sallet, E., Roux, B., Sauviac, L., Jardinaud, M. F., Carrère, S., Faraut, T., de Carvalho-Niebel, F., Gouzy, J., Gamas, P., Capela, D., Bruand, C. y Schiex, T. (2013). Next-Generation annotation of prokaryotic genomes with EuGene-P: application to *Sinorhizobium meliloti* 2011. *DNA Res.*: 20(4), 339–354.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Sambrook, J. y Russel, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual (3rd ed.)*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Santos, R., Bocquet, S., Puppo, A. y Touati, D. (1999). Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*: 181(15), 4509-4516.
- Santos, R., Hérouart, D., Puppo, A. y Touati, D. (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in rhizobium-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.*: 38(4), 750–759.
- Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D. y Puppo, A. (2001). Oxidative burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.*: 14(1), 86-89.
- Sarath, G., Pfeiffer, N. E., Sodhi, C. S. y Wagner, F. W. (1986). Bacteroids are stable during dark-induced senescence of soybean root nodules. *Plant Physiol.*: 82(2), 346–350.
- Sato, S., Nakamura, Y., Kaneko, T., Asamizu, E., Kato, T., Nakao, M., Sasamoto, S., Watanabe, A., Ono, A., Kawashima, K., Fujishiro, T., Katoh, M., Kohara, M., Kishida, Y., Minami, C., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimizu, Y., Shinpo, S., Takahashi, C., Wada, T., Yamada, M., Ohmido, N., Hayashi, M., Fukui, K., Baba, T., Nakamichi, T., Mori, H. y Tabata, S. (2008). Genome structure of the legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.*: 15(4), 227–239.
- Schaedle, M. y Bassham, J. A. (1977). Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol.*: 59, 1011-1012.
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G. y Pühler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*: 145(1), 69–73.

- Scott, M. D., Meshnick, S. R. y Eaton, J. W. (1987). Superoxide Dismutase-rich Bacteria. *J. Biol. Chem.*: 262(8), 3640-3645.
- Seaver, L. C., e Imlay, J. A. (2001). Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*: 183(24), 7182–7189.
- Shabala, S. y Munns, R. (2017). Salinity Stress: Physiological Constraints and Adaptive Mechanisms. *Plant Stress Phisiology*, 2nd Edition.: 2, 24-63. Editado por S. Shabala. Tasmania, Australia.
- Shaw, S., L. y Long, S., R. (2003). Nod factor inhibition of Reactive Oxygen Efflux in a host legume. *Plant Physiol. Biochem.*: 132, 2196-2204.
- Smirnoff, N. (1995) Environment and Plant Metabolism: Flexibility and Acclimation. *Antioxidant systems and plant response to the environment*, 5ta ed. 217-243. Editado por N. Smirnoff. BIOS Scientific Publishers, Oxford.
- Sigaud, S., Becquet, V., Frenedo, P., Puppo, A. y Hérouart, D. (1999). Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HP11-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *J. Bacteriol.*: 181(8), 2634–2639.
- Simon, R., Priefer, U. y Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Nature Biotechnol.*: 1(9), 784–791.
- Stacey, G., Libault, M., Brechenmacher, L., Wan, J. y May, G. D. (2006). Genetics and functional genomics of legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.*: 9, 110-121.
- Steenhoudt, O. y Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiol. Rev.*: 24(4), 487–506.
- Susaki, T., Yoro, E. y Kawaguchi, M. (2015). Leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*: 316,316-358.
- Sullivan, J. T., Trzebiatowski, J. R. y Cruickshank, R. W., Gouzy, J., Brown, S. D., Elliot, R. M., Fleetwood, D. J., McCallum, N. G., Rossbach, U., Stuart, G. S., Weaver, J. E., Webby, R. J., de Bruijn, F. J. y Ronson C. W. (2002). Comparative sequence analysis of the symbiosis island of *Mesorhizobium loti* strain R7A. *J. Bacteriol.*: 184(11), 3086-3095.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*: 28(10), 2731–2739.
- Tang, G., Li, N., Liu, Y., Yu, L., Yan, J. y Luo, L. (2018). *Sinorhizobium meliloti* glutathione reductase is required for both redox homeostasis and symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.*: 84(3), pii: e01937-17.

- Taté, R., Riccio, A., Caputo, E., Cermola, M., Favre, R. y Patriarca, E. J. (1999). The *Rhizobium etli trpB* gene is essential for an effective symbiotic interaction with *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.*: 12(10), 926-933.
- Tokuda, H. (2009). Biogenesis of outer membranes in Gram-negative bacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*: 73(3), 465-473.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. y Despied, S. (1995). Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.*: 177(9), 2305-2314.
- Truchet, G., Debellé, F., Vasse, J., Terzaghi, B., Garnerone, A. M., Rosenberg, C., Batut, J., Maillet, J. y Dénarié, J. (1985). Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation. *J. Bacteriol.*: 164(3), 1200-1210.
- Uchiumi, T., Ohwada, T., Itakura, M., Mitsui, H., Nukui, N., Dawali, P., Kaneko, T., Tabata, S., Yokoyama, T., Tejima, K., Saeki, K., Omori, H., Hayashi, M., Maekawa, T., Sriprang, R., Murooka, Y., Tajima, S., Simomura, K., Nomura, M., Suzuki, A., Shimoda, Y., Sioya, K., Abe, M. y Minamisawa, K. (2004). Expression islands clustered on the symbiosis island of the *Mesorhizobium loti* genome. *J. Bacteriol.*: 186(8), 2439-2448.
- Vincent, J. M. (1970). *A manual for practical study of the root nodule bacteria*. IBP Handbook, Blackwell Scientific Publishers, Oxford.
- von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J. Mol. Biol.*: 184(1), 99-105.
- Wang, Z., Xiang, L., Shao, J., Węgrzyn, A. y Węgrzyn, G. (2006). Effects of the presence of ColeI plasmid DNA in *Escherichia coli* on the host cell metabolism. *Microb. Cell Fact.*: 5(34), 1-18.
- Weinstein, M., Roberts, R., C. y Helinski, D. R. (1992). A region of the Broad-Host-Range plasmid RK2 causes stable inheritance of plasmids in *Rhizobium meliloti* cells isolated from alfalfa root nodules. *J. Bacteriol.*: 174(22), 7486-7489.
- Yang, J., Kloepper, J. W. y Ryu, C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends Plant Sci.*: 14(1), 1-4.
- Young, N. D., Cannon, S. B., Sato, S., Kim, D., Cook, D. R., Town, C. D., Roe, B. A. y Tabata, S. (2005). Sequencing the genespaces of *Medicago truncatula* and *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*: 137(4), 1174-1181.
- Zhao, Y., Nickels, L. M., Wang, H., Ling, J., Zhong, Z. y Zhu, J. (2016). OxyR-regulated catalase activity is critical for oxidative stress resistance, nodulation and nitrogen fixation in *Azorhizobium caulinodans*. *FEMS Microbiol. Lett.*: 363(13), pii: fnw130.

Apéndice

A.1 Medios y condiciones de cultivo para bacterias.

Medio YEM (yeast extract manitol): Medio nutritivo completo que contiene por litro de solución, 10 g de manitol, 0,5 g de extracto de levadura, 0,5 g de K_2HPO_4 , 0,2 g de $MgSO_4$ y 0,1 g de NaCl pH 6,9. Para obtener medio sólido se agregó agar-agar en una concentración final 1,5 % y rojo Congo a una concentración de 0,025 g por litro. Para el cultivo líquido la solución de $MgSO_4$ fue esterilizada por separado y mezclada con el resto del medio de cultivo en el momento de su utilización a una concentración final de 0,8 mM (Vincent, 1970). Para los tratamientos salinos se usaron concentraciones finales de 50, 100, 150 y 200 mM NaCl y para los osmóticos 8,54 %, 11,34 %, 15 % y 18,50 % de polietilenglicol (PEG 8000) que desarrollara las presiones osmóticas equivalentes a las de NaCl de -0.55, - 0.66, -0.85 y -1 Mpa.

Medio nutritivo Lisogeny broth (LB): Medio compuesto por triptona 1 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 % pH 7,0 (Sambrook et al., 1989). Para obtener este medio sólido se agregó agar-agar a una concentración final de 1,5 %.

Medio TY: Medio compuesto por triptona 0,5 %, extracto de levadura 0,3 %. pH 7,0. Una vez esterilizado en autoclave y enfriado se añadió $CaCl_2$ estéril 9 mM concentración final. Para obtener este medio sólido se agregó agar-agar a una concentración final de 1,5 %.

Medio TY modificado: Al medio TY sólido se le agregó rojo Congo a una concentración final de 0,025 g por litro.

Medio mínimo B- : Medio de cultivo que contiene por litro de solución, 10 g de manitol, 1,3 g de $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$, 0,55 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,55 g de KNO_3 , 2,5 mL de Fe(III)-NaEDTA [a] y 2,5 mL de microelementos [b].

Se ajustó el pH a 5,0 y se esterilizó en autoclave (120 °C, 20 min). Una vez frío se le añadió 1 mL de K_2HPO_4 1 M pH 7,2 estéril por cada litro de medio. Las vitaminas fueron disueltas en agua y esterilizadas por filtración (0,2 μm de diámetro de poro). Se adicionaron a una concentración final de 0,2 $\mu g/mL$ y 5 $\mu g/mL$, biotina y tiamina respectivamente.

[a]. La solución Fe(III)-NaEDTA se preparó separadamente al 1,3 %, y se esterilizó mediante filtración usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm .

[b]. La solución de microelementos consta de:

H ₃ BO ₃	1,269 g
MnSO ₄ •H ₂ O	0,462 g
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	0,398 g
ZnSO ₄ •7H ₂ O	0,0974 g
CuSO ₄ •5H ₂ O	0,0354 g
H ₂ Odest.	1 L

La solución se preparó y almacenó a temperatura ambiente.

Stock de antibióticos: Los antibióticos fueron utilizados a partir de un stock conservado a -20 °C con las siguientes concentraciones: tetraciclina (Tc) 5mg/mL en alcohol, kanamicina 50 mg/mL en agua, espectinomicina (Spc) 50 mg/mL en agua, estreptomicina (Sm) 50 mg/mL en agua (Sambrook et al., 1989), ácido nalidíxico (Nal) en discos comerciales para antibiograma de 30 µg.

Conservación y mantenimiento de las cepas: Para el almacenamiento de las cepas bacterianas se hicieron crecer los microorganismos en cultivo líquido con agitación a 160 rpm hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,8. Del cultivo se tomaron 0,85 mL a los que se le agregaron 0,15 mL de glicerol 87 % estéril, se mezcló y se guardó a -80° C. Para recuperar la cepa, se raspó la superficie con ansa y se estrió en una placa de LB (Sambrook et al., 1989). Para el uso cotidiano de las cepas, se mantuvieron a 4 °C en medio sólido y repicadas mensualmente.

A.2 Medios y condiciones de cultivo para plantas.

Medio Agar-Agua: Medio compuesto por agar-agar disuelto en agua a una concentración final de 0,8 %8 %.

Medio ByD: Medio para cultivo de *L. japonicus* y *M. sativa*. Para preparar 1 litro de medio 10X se mezclaron 5 mL de solución A, Sequestrene a una concentración final de 27 µM, 5 mL de solución B. Se agregó NH₄NO₃ a una concentración final de 5mM o 0,25 mM (esta última concentración se utilizó cuando se requirió el medio con bajo contenido de nitrógeno), 5 mL de solución D. pH 6,6. (Broughton y Dilworth, 1971).

Solución A:	CaCl ₂	1 mM
Solución B:	KH ₂ PO ₄	0,5 Mm

Solución D:	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 mM
	K ₂ SO ₄	0,25 mM
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1 μM
	H ₃ BO ₃	2 μM
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0,5 μM
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,2 μM
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,1 μM
	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0,1 μM

Solución tampón PBS (phosphate buffered saline): La solución está compuesta por NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, NaHPO₄ 10 mM y KH₂PO₄ 1,8 mM. La solución fue ajustada a pH 7.4 con HCl y esterilizada en autoclave a 115 °C durante 20 min (Sambrook et al., 1989).

A.3 Técnicas de manejo de ADN.

PCR de colonia: Para las PCRs de colonia se picaron colonias aisladas con palillos estériles y se introdujeron en la mezcla de reacción de PCR. Esta técnica se fundamenta en que durante el primer ciclo de 95 °C del termociclador se lisan las bacterias liberando el material génico que sirve de molde para los primers. Alternativamente las colonias seleccionadas se resuspendieron en 100 μl de agua, se incubaron durante 5 min en un baño de agua hirviendo, se centrifugaron 5 min a 12000 xg y 1 a 2 μl del sobrenadante se usó como ADN templado para la reacciones de PCR.

Extracción de ADN genómico: Para la extracción de ADN total se empleó el protocolo de CTAB adaptado de Ausubel (1987). El cultivo bacteriano se centrifugó a 4 °C 5 min a 12.000 xg. El pellet se resuspendió en 600 μL de buffer de lisis (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 20 % SDS, 20 mg/mL Proteinasa K (3 μL) y se incubó 1 h a 37 °C. Luego se adicionó 100 μL de NaCl 5 M y 80 μL de solución de CTAB precalentada a 65 °C (2 % P/V bromuro de hexadecil trimetil amonio (CTAB); 1,4 M NaCl; 0,2 % V/V β-mercaptoetanol; 20 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl pH 8). Los ácidos nucleicos se separaron mediante adición de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 (700μl) y centrifugación a 12.000 xg 5 min, recuperando la fase acuosa. El ADN se precipitó por adición de 0,6 V de isopropanol frío e incubación por 10 min a -80 °C y posterior centrifugación a 12.000 xg 10 min. El pellet se resuspendió en 30 μL de agua destilada (Ausubel et al., 1987)

Método rápido para detectar clones recombinantes (cracking): Se tomó una pequeña cantidad de bacterias a partir de colonias de 0,5-1 mm crecidas en medio sólido con antibiótico

apropiado, y se resuspendió en microtubo de 1,5 mL conteniendo 20 µL de solución NaOH 50 mM, SDS 0,5 % y EDTA 5 mM. Las muestras fueron incubadas a 55 °C por 30 min y se agitó en vortex vigorosamente por 1 min. Se agregó suficiente solución de carga y se sembraron las muestras en geles de agarosa 0,8 %. Como control se utilizaron bacterias sin transformar (Sambrook et al., 1989).

Extracción de ADN plasmídico (Miniprep de rutina): Tres mililitros de cultivos se hicieron crecer durante toda la noche a 37 °C con agitación a 180 rpm en medio LB con antibiótico apropiado. Las células se cosecharon en tubos de 2 mL en dos centrifugaciones consecutivas. Se agregaron 200 µL de solución de resuspensión (Buffer GTE: EDTA 10 mM pH 8,0; Tris-HCl 25 mM pH 8,0; glucosa 50 mM) + RNAsa 100 µg/mL y se resuspendió con pipeta. Se agregaron 200 µL de solución de lisis (SDS 1 %; NaOH 0,2 N) y se mezcló por inversión hasta obtener una solución clara. Luego se agregaron 200 µL de solución de neutralización (AcNa/AcH 3 M) y se mezcló rápidamente por inversión hasta observar la formación de grumos. Se centrifugaron las muestras durante 15 min a velocidad máxima y el sobrenadante fue trasvasado a un tubo limpio. Se agregaron 10 µL de suspensión de sílica y se centrifugó a 3.000 xg por 30 s. El sobrenadante fue descartado y se hicieron tres lavados consecutivos con 500 µL de solución de lavado (NaCl 50 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,5; EDTA 2,5 mM y etanol 50 %). Se dejó secar la sílica a 37 °C y se agregaron 10-15 µL de agua. Se incubó a 60 °C por 5 min y se centrifugó a velocidad máxima por 1 min. El sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico fue trasvasado a un tubo limpio.

Extracción de ADN plasmídico (para secuenciar): La extracción de ADN plasmídico para secuenciar se realizó empleando DNA GeneJet Plasmid® miniprep Kit (Fermentas) o mediante la técnica de extracción alcalina sin fenol, que se detalla a continuación: 5 mL de suspensión de bacterias recombinantes se cultivaron durante toda la noche en medio LB suplementado con antibiótico apropiado. Luego se cosecharon por centrifugación a 12.000 g durante 2 a 3 min. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 200 µL de solución de resuspensión P1 (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM, pH 8). Se homogeneizó y se agregó 6 µL de ARNsa 10 mg/mL, luego se adicionaron 200 µL de solución de lisis P2 (NaOH 0,2 N, SDS 1 %) preparada en el momento y se mezcló por inversión hasta lograr una solución transparente por un tiempo máximo de 5 min. A la solución anterior, se le adicionaron 200 µL de solución de neutralización P3 (KAc 3 M, pH 4,8) y se mezcló por inversión hasta la formación de grumos. Luego se incubó

5 min en hielo para favorecer la precipitación de proteínas. La mezcla anterior se centrifugó a 12.000 xg durante 3 min y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio al que se le adicionaron 300 µL de cloroformo, se agitó en vórtex, y se centrifugó a máxima velocidad por 5 min. Posteriormente se transvasaron 530 µL de la fase superior a un tubo limpio. Se agregaron 500 µL de isopropanol para precipitar el ADN, se homogeneizó por inversión y se incubó a -20 °C durante 5-10 min. La solución se centrifugó a 12.000 xg y a temperatura ambiente durante 15 min. El sobrenadante fue retirado, se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70 %, preparado en el momento. Se centrifugó durante 5 min, luego se retiró el alcohol y se dejó secar en estufa a 50 °C por 10 min. El precipitado se resuspendió en 32 µL de agua bidestilada estéril, y se adicionaron 8 µL de NaCl 4 M y 40 µL de PEG 8000 al 13 % (preparada en el momento), se mezcló suavemente y se incubó 60 min en hielo. La solución se centrifugó a 12.000 xg durante 30 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 400 µL de etanol al 70 %. Se centrifugó 5 min a 12.000 xg, se retiró el alcohol y se dejó secar completamente en estufa a 50 °C (aprox. 10-15 min o hasta que el precipitado se tornara blanquecino). Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20 µL de agua Milli-Q estéril.

A.4 Clonación del ADN amplificado.

Reacción de ligación: Durante el proceso de ligación para la formación de una molécula de ADN recombinante, se utilizó la enzima ADN T4 ligasa que cataliza la formación de un enlace fosfodiéster 3'- 5' entre el grupo hidroxilo del extremo 3' de un fragmento de ADN y el grupo fosfato del extremo 5' del plásmido de clonación. La reacción de ligación para el producto de PCR se realizó según instrucciones del fabricante (Fermentas) y siguiendo las recomendaciones de Sambrook et al. (1989) en un volumen de reacción total de 7 µL. Se mezclaron 0,7 µL de solución tampón de ligasa 10X; 4 µL del producto de amplificación por PCR (banda única) o del extracto de banda con tamaño esperado purificada a partir de gel de agarosa con el kit de extracción de ADN QIAquick (QIAGEN); 1,8 µL de vector y 0,5 µL de T4 ADN ligasa (5 U/ µL). La mezcla de reacción se incubó a 16 °C por 16 h. Una vez finalizada la incubación, se tomaron 3 µL para la transformación de células de *E. coli* DH5α químicamente competentes.

Separación de ácidos nucleicos por electroforesis en geles de agarosa: Las muestras se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa entre un 0,8 y 1,2 % (p/v) en buffer TAE 0,5X y las corridas se hicieron a 100 V. Los fragmentos se observaron en transiluminador

UV. Las impresiones de las imágenes se tomaron con un analizador de imágenes (Biorad) modelo Gel Doc XR. El tamaño de los fragmentos se determinó utilizando como patrón el ADN del fago Sc3, digerido con la enzima de restricción *HindIII* (Sambrook y Russel, 2001) o el marcador comercial 1Kb ADN Ladder Plus (Fermentas). La concentración del ADN se estimó por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm.

A.5 Obtención de células competentes.

Por método químico: Una colonia de *E. coli* DH5 α aislada se sembró en 5 mL de medio LB líquido y se cultivó toda la noche a 37 °C con agitación a 160 rpm. Un mL de este cultivo se transfirió a 50 mL de medio LB líquido y se incubó con agitación a 160 rpm a 37 °C hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,4-0,6. Inmediatamente el cultivo se enfrió en hielo 10 min, para todos los pasos siguientes se mantuvieron las células a una temperatura cercana a 0 °C en un baño agua/hielo. Los 50 mL de cultivo se transfirieron a tubos de polipropileno y se centrifugaron a 2.900 xg, en centrífuga Beckman refrigerada durante 3 min a 4° C. El precipitado se resuspendió en 50 mL de 100 mM CaCl₂ frío y se incubó en hielo 30 min. La suspensión se centrifugó nuevamente, como se describió anteriormente, y el precipitado se resuspendió en 30 mL de CaCl₂ 100 mM frío y se volvió a incubar en hielo durante 30 min. Las células fueron centrifugadas a 3200 xg 10 min a 4 °C. Las células fueron resuspendidas en 2 mL de CaCl₂ 100 mM, incubadas nuevamente en hielo por 30 min y se le agregó glicerol estéril a una concentración final del 20 %. El cultivo de células competentes fue fraccionado en muestras de 50 μ L en tubos Eppendorf de 1.5 mL y congeladas inmediatamente en aire líquido para su posterior conservación a -80 °C.

Por electroporación: A partir de una colonia de *E. coli* se obtuvo un cultivo siguiendo el mismo procedimiento que para la obtención de células competentes por el método químico. Las células fueron centrifugadas a 4.000 g por 15 min a 4 °C en tubos de polipropileno de 50 mL para centrífuga previamente enfriados. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 50 mL de glicerol 10 % frío. Se volvieron a centrifugar las células a 4.000 xg por 15 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Las células fueron resuspendidas en 25 mL de glicerol 10 % y se volvieron a centrifugar a 4.000 xg por 15 min. Se resuspendieron las células en 2 mL de glicerol 10 % y se centrifugaron nuevamente en las condiciones descriptas anteriormente. Por último, las células se resuspendieron en 1 mL de glicerol 10 % y se alicuotaron en 50 μ L en

tubos Eppendorf de 1,5 mL. Las alícuotas fueron congeladas inmediatamente en aire líquido y conservadas a -80 °C.

A.6 Transformación de *E. coli*.

Transformación por choque térmico: Una alícuota de células competentes de *E. coli* DH5 α se descongeló en hielo a 0 °C. Se agregaron 1-2 μ L de ADN plasmídico (200 ng/ μ L) o 5-10 μ L de mezcla de ligación y se mantuvo en hielo durante 30 min. Posteriormente se realizó un choque térmico a 42 °C durante 90 s. Inmediatamente se incubó la mezcla durante 2 min en hielo y se le agregó 1 mL de medio LB a temperatura ambiente. La suspensión se incubó a 37 °C durante 45 min con agitación constante a 100 rpm. Se tomaron 2 alícuotas de 100 μ L de la mezcla y se sembró cada una en placas de Petri de 10 cm de diámetro con medio LB suplementadas con los antibióticos apropiados. Para la transformación con plásmidos provenientes de una ligación se sembró la totalidad de las células. Para ello se centrifugó a 2.500 xg por 5 min a temperatura ambiente y se extrajeron 800 μ L de sobrenadante, dejando aproximadamente 200 μ L para resuspender el pellet. Finalmente se tomaron 100 μ L de las suspensiones y se sembraron por duplicado en medio sólido LB con antibiótico apropiado.

Transformación por electroporación: Se descongelaron las células en hielo a 0 °C y se enfriaron cubetas de electroporación de 0,2 cm. Se agregaron de 1 a 2 μ L de ADN plasmídico (previamente resuspendido en una solución de baja fuerza iónica para evitar la formación de arcos eléctricos). La mezcla se traspasó a una cuba de electroporación fría y se incubó en hielo por aproximadamente 1 min. Las células se electroporaron en electroporador Gene Pulser Xcell (Bio Rad) a 2,5 kV por 5 ms. Inmediatamente se resuspendieron agregando 1 mL de medio LB a la cubeta de electroporación y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 1,5 mL. Las células se incubaron a 37 °C en agitación a 160 rpm por 45 min. Alícuotas de 100 μ L fueron sembradas en placas de 10 cm de diámetro conteniendo medio LB suplementadas con el antibiótico apropiado. Para la transformación con plásmidos provenientes de una ligación se sembraron la totalidad de las células concentrándolas por centrifugación a 2.500 xg por 5 min a temperatura ambiente.

A.7 Estimación relación DO/UFC/mL:

La relación entre la densidad óptica y las unidades formadoras de colonias (UFC) se evaluó en medio YEM, donde se observó que no hubo diferencias significativas entre las UFC obtenidas para una misma DO₆₀₀ entre *M. loti* WT y las transformadas (tabla A7.1).

Tabla A7.1: Correlación de UFC/mL correspondientes a una DO₆₀₀=1 en las cepas de *M. loti* WT, *M. loti* 1708 y *M. loti* sod.

Los valores representan la media ± E.E. Letras distintas indican diferencias significativas (p≤

Cepa	D.O. 600nm	UFC/mL
<i>M. loti</i> WT	1	3,90 x 10 ¹⁰ ± 2,51 x 10 ⁹ a
<i>M. loti</i> 1708	1	4,19 x 10 ¹⁰ ± 2,40 x 10 ⁹ a
<i>M. loti</i> sod	1	3,93 x 10 ¹⁰ ± 2,31 x 10 ⁹ a

0,05); n=3.