



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Farmacia y Bioquímica

**Aportes a la producción sustentable de soja mediante
el mejoramiento genético de los rizobios.**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área
"Ciencias Biológicas".

Lic. Karen Ivana Liebrezn

Director: Dr. Nicolás Ayub

Directora adjunta: Dra. Gabriela Soto

Lugar de trabajo:

Laboratorio de ingeniería genética de microorganismos benéficos

Instituto de Genética E. A. Favret; g.v. al IABIMO (CONICET-INTA)

Lic. Karen Ivana Liebrezn
Tesisista

Dr. Nicolás Ayub
Director

Dra. Gabriela Soto
Directora adjunta

Dra. Patricia Benavides
Consejera de estudios

Los resultados de la presente tesis doctoral fueron publicados en los siguientes artículos:

- “Whole-Genome Resequencing of Spontaneous Oxidative Stress-Resistant Mutants Reveals an Antioxidant System of Bradyrhizobium japonicum Involved in Soybean Colonization”.

Liebrenz K, Gómez C, Brambilla S, Frare R, Stritzler M, Maguire V, Ruiz O, Soldini D, Pascuan C, **Soto G**, **Ayub N**.

Microbial Ecology 2021,

doi: 10.1007/s00248-021-01925-2 PMID: 34782938

- “Multiple ways to evade the bacteriostatic action of glyphosate in rhizobia include the mutation of the conserved serine 90 of the nitrogenase subunit NifH to alanine”

Liebrenz K, Frare R, Gómez C, Pascuan C, Brambilla S, Carrió A, Soldini D, Maguire V, Ruiz O, McCormick W, **Soto G**, **Ayub N**.

Research in Microbiology 2022,

doi: 10.1016/j.resmic.2022.103952 PMID: 35436545.

RESUMEN

La soja es el cultivo que consume más inoculantes a nivel global. Estos inoculantes están basados casi en su totalidad en cepas relacionadas de las especies *Bradyrhizobium japonicum* y *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Actualmente, se han reportado numerosas evidencias empíricas acerca de la mayor eficiencia de colonización de soja de *B. japonicum* por sobre *B. diazoefficiens*. Sin embargo, los mecanismos moleculares relacionados con estas diferencias de eficiencia de simbiosis permanecen desconocidas. En esta tesis doctoral, la secuenciación de los genomas de cuatro mutantes espontáneas resistentes a estrés oxidativo derivadas del inoculante comercial *B. japonicum* E109 combinado con estudios moleculares y fisiológicos permitió la identificación de un *cluster* antioxidante (BjAC) que contiene un regulador transcripcional (*glxA*) que controla la expresión de una catalasa (*catA*) y una fosfatohidrolasa (*yfbR*) relacionadas con las hidrólisis de peróxido de hidrógeno y nucleótidos oxidados, respectivamente. La integración de análisis de sintenia y filogenia sugieren la emergencia del *cluster* BjAC en la especie *B. japonicum* E109 luego de su divergencia con el linaje de *B. diazoefficiens*. La transformación de la cepa modelo *B. diazoefficiens* USDA110 con el *cluster* BjAC de la cepa E109 incrementó significativamente su habilidad de colonizar raíces de soja, recapitulando experimentalmente los beneficios de la ocurrencia de BjAC en *B. japonicum*. Ensayos de inoculación en soja mostraron que la mutación en el gen *glxA* aumenta la competitividad de nodulación y la actividad *PGRP* de la cepa E109.

Una amplia variedad de mecanismos de resistencia a glifosato ha sido reportada en distintos organismos. Sin embargo, la emergencia de la resistencia a glifosato en rizobios no ha sido estudiada a nivel génico. En esta tesis doctoral, la secuenciación del genoma de mutantes espontáneas resistentes a glifosato derivadas de la cepa E109 permitió la identificación de genes probablemente asociados con la incorporación (*gltL* y *cya*) y la degradación (*zigA* y *betA*) del glifosato, así como con la fijación de nitrógeno (*nifH*). Estas mutaciones reducen la inhibición del crecimiento inducida por el glifosato en cultivos bacterianos puros e *in planta*. Así, todas las mutaciones descritas conducen a fenotipos

capaces de revertir los efectos bacteriostáticos del glifosato. Además, la mutación S90A en la proteína NifH incrementó la actividad citrato sintasa, la tasa de crecimiento y la actividad *PGPR* en ausencia de glifosato. Estos resultados sugieren que esta mutación contribuye a mitigar el efecto bacteriostático del glifosato vía un incremento en la actividad metabólica celular y sugiere que este sitio de fosforilación juega un papel relevante tanto en vida libre como en simbiosis. Hasta donde sabemos, esta sería la primera evidencia de una función de la nitrogenasa por afuera del proceso de fijación de nitrógeno y un posible rol de este sitio de fosforilación en la modulación del metabolismo.

Finalmente, se discute la potencial aplicación de este tipo de microbios mutantes no genéticamente modificados (incluyendo las mutantes espontáneas resistentes a estrés oxidativo y glifosato) en el cultivo de soja a nivel global, tanto para soja transgénica (*GMO*) como para soja convencional (*non-GMO*) o editada.

ABSTRACT

Soybean is the most inoculant-consuming crop in the world, carrying strains belonging to the extremely related species *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Currently, it is well known that *B. japonicum* has higher efficiency of soybean colonization than *B. diazoefficiens*, but the molecular mechanism underlying this differential symbiotic performance remains unclear. In the present doctoral thesis, genome resequencing of four spontaneous oxidative stress-resistant mutants derived from the commercial strain *B. japonicum* E109 combined with molecular and physiological studies allowed identifying an antioxidant cluster (BjAC) containing a transcriptional regulator (*glxA*) that controls the expression of a catalase (*catA*) and a phosphohydrolase (*yfbR*) related to the hydrolysis of hydrogen peroxide and oxidized nucleotides. Integrated synteny and phylogenetic analyses supported the fact that BjAC emergence in the *B. japonicum* lineage occurred after its divergence from the *B. diazoefficiens* lineage. The transformation of the model bacterium *B. diazoefficiens* USDA110 with BjAC from E109 significantly increased its ability to colonize soybean roots, experimentally recapitulating the beneficial effects of the occurrence of BjAC in *B. japonicum*. In addition, the *glxA* mutation increased the nodulation competitiveness and plant growth-promoting efficiency of E109.

A variety of glyphosate resistance mechanisms, including target alteration and control of the uptake, export and degradation of glyphosate, has been reported in different organisms. However, the emergence of glyphosate resistance in rhizobia has not been studied at genetic level. In the present doctoral thesis, the genome resequencing of spontaneous glyphosate-resistant mutants derived from the soybean inoculant *Bradyrhizobium japonicum* E109 allowed identifying genes associated with the uptake (*gltL* and *cya*) and degradation (*zigA* and *betA*) of glyphosate as well as with nitrogen fixation (*nifH*). Mutations in *gltL*, *cya*, *zigA*, *betA* and *nifH* reduce the initial lag phase under glyphosate stress, supporting the contribution of these mutations to bypass the bacteriostatic effects of glyphosate. In addition to glyphosate resistance, mutation of the serine 90 phosphorylation site of NifH to alanine increased the citrate synthase activity,

growth rate and plant growth-promoting efficiency of E109 in absence of glyphosate stress. These results suggest that this mutation contributes to mitigating the bacteriostatic action of glyphosate via an increased metabolic activity, and indicates that this phosphorylation plays roles during both the free-living and symbiotic growth stages of rhizobia. To our knowledge, this is the first report to describe a function of nitrogenase, in particular NifH, besides nitrogen fixation and a possible role of its phosphorylation site in the modulation of metabolism.

Finally, the potential applications of these types of non-genetically modified mutant microbes (spontaneous oxidative stress-resistant and glyphosate-resistant mutants) in soybean production worldwide are discussed.

AGRADECIMIENTOS.

Esta tesis, como todo en la vida, no es un trabajo individual, sino un trabajo en grupo con muchísimos actores. A todos ellos, ¡gracias! No hubiera podido ser posible sin ustedes.

Gracias,

Familia. Mamá y papá por apoyar cada decisión que tomo, aun sabiendo que probablemente eso implique más kilómetros de distancia entre nosotros. Mamá, sos mi ejemplo en todo, luchadora y valiente como pocas. Gracias Alex y Marce por cada palabra de aliento y cada visita.

Nico y Gaby por abrirme las puertas de su laboratorio y permitirme desarrollarme en un ámbito tan cálido y ameno, trabajando en un tema que, definitivamente, me encanta.

Alfalfa team + Euge. Creo que no podría haber llegado a un mejor grupo. Amables, cariñosas, responsables, pacientes y compañeras; siempre bien predispuestas al momento de ayudar con algún desarrollo o ensayo. Que nunca nos falten las risas y los encuentros. ¡Las quiero infinito!

Chule, Maca y Orne, porque cuando vuelvo a mi lugar en el mundo, están ahí. Y con eso es suficiente. ¡Las quiero!, aunque todavía no sepan bien qué es lo que hago.

Pau, Lu, Fio, Emi, Sofi e Ine, mis santafesinas preferidas, porque ayudan a tomar decisiones, acompañan a la distancia y se alegran con cada objetivo logrado. Las admiro profundamente a cada una de ustedes.

Andre y Caro, por ser mi sostén imprescindible en esta vida en la ciudad de la furia, por alegrar mis fines de semana y por aguantar tanto caos y quejas el último tiempo.

Tom, Fede, Nancy y Vero, por los consejos al momento de tomar decisiones, por alegrarse conmigo y estar presentes, a pesar de la distancia.

Elisa, Gigi y Pipo, porque mejor vecindad no pude haber pedido. Hicieron que la cuarentena y la nueva vida en Bs. As. fuera muchísimo más llevadera, y eso es invaluable.

Diego, Ale, Lalo y Carlos del Grupo de mejoramiento genético de soja de la EEA Marcos Juárez, por el apoyo técnico en todo lo relacionado al campo y por todo lo que aprendí con ustedes.

Instituto de Genética Ewald A. Favret del INTA Castelar, a su directora y demás integrantes por brindar el apoyo necesario para llevar a cabo este trabajo doctoral.

FFyB-UBA por permitirme llevar adelante mi doctorado en esta prestigiosa institución.

ANPCyT por ser el sostén económico en esta etapa.

GLOSARIO.

- *betA*: gen que codifica para la enzima dehidrogenasa de colina
- BjAC: *cluster* antioxidante
- C: carbono
- cAMP: AMP cíclico
- CAT: enzima catalasa
- *catA*: gen que codifica para la enzima catalasa.
- cDNA: ADN copia
- CIM: concentración inhibitoria mínima
- CO₂: dióxido de carbono
- CS: enzima citrato sintasa
- *cya*: gen que codifica para una enzima adenilato ciclasa
- DO: densidad óptica
- E109: cepa de *B. japonicum* utilizada como cepa parental
- EEA: estación experimental agropecuaria
- EPSPS: enzima 5-enolpiruvil-3-shikimato fosfato sintasa
- FBN: fijación biológica de nitrógeno
- Fe: hierro
- GAT: enzima glifosato N-acetil transferasa
- GEI: gases de efecto invernadero
- *gltL*: gen que codifica para un transportador de glutamato
- *glxA*: gen que codifica para el regulador transcripcional GlxA.
- *glxA*: mutantes espontáneas tolerantes a peróxido de hidrógeno derivadas de *B. japonicum* E109
- GlxA: regulador de la transcripción de genes que forma parte del cluster BjAC.
- GM: grupo de madurez
- GMM: microbios genéticamente modificados
- GMO: (del inglés), organismos genéticamente modificados
- GOX: enzima glifosato oxidasa

- GR: mutantes espontáneas tolerantes a glifosato derivadas de *B. japonicum* E109
- H₂O₂: peróxido de hidrógeno
- Ha: hectáreas
- HCl: ácido clorhídrico
- His: histidina
- INTA 13 s/N: medio de cultivo mínimo sin nitrógeno
- kDA: kilodalton
- Mo: molibdeno
- N: nitrógeno
- N₂: nitrógeno molecular
- N₂O: óxido nitroso
- NF: factores nod
- NH₄: amonio
- *nifH*: gen que codifica para una subunidad estructural de la enzima nitrogenasa
- NJ: (del inglés), método utilizado para filogenia *neighbor-joining*
- NO: óxido nítrico
- NO₂⁻: ion nitrito
- NO₃⁻: ion nitrato
- *nosZ*: gen que codifica para la enzima óxido nitroso reductasa
- P: fósforo
- Pb: pares de bases
- RMM y RMM2: medios de cultivo mínimos para *Bradyrhizobium*.
- ROS: (del inglés), especies reactivas del oxígeno
- SD: (del inglés), desviación estándar
- SEM: (del inglés), error estándar de la media
- SOD: enzima superóxido dismutasa
- Str: estreptomicina
- StrR: estreptomicina resistente
- T: toneladas

- UFC: unidades formadoras de colonias
- USDA110: cepa de *B. diazoefficiens* utilizada como microorganismo modelo
- YEM: medio de cultivo rico
- YfbR: enzima fosfato hidrolasa de nucleótidos oxidados
- *yfbR*: gen que codifica para la enzima fosfato hidrolasa de nucleótidos oxidados
- *zigA*: gen que codifica para una metalchaperona de unión a zinc
- Zn: zinc

ÍNDICE.

Resumen.....	3
<i>Abstract</i>	5
Agradecimientos.....	7
Glosario.....	9
Introducción.....	13
Objetivos generales y específicos.....	24
Hipótesis de trabajo.....	24
Materiales y métodos.....	25
Resultados.....	32
Producción y análisis genómico de mutantes espontáneas resistentes a H ₂ O ₂	32
Estudios bioinformáticos para establecer el origen del <i>cluster</i> BjAC.....	35
Relevancia del <i>cluster</i> BjAC en la colonización de las raíces de las plantas de soja..	37
Impacto de la mutación en el gen <i>glxA</i> sobre el crecimiento vegetal.....	39
Producción y análisis genómico de mutantes espontáneas resistentes a glifosato..	40
Análisis del efecto de la transformación de E109 con alelos mutantes.....	44
Impacto de las mutaciones en la resistencia a glifosato en cultivos puros e <i>in planta</i>	45
Explorando un posible mecanismo de tolerancia a glifosato en la cepa GR5.....	46
Efectos de la mutación S90A sobre la emisión de N ₂ O de la cepa E109.....	49
Efectos de la mutación S90A sobre la actividad PGPR de la cepa E109.....	49
Discusión.....	52
Conclusiones y perspectivas.....	66
Referencias.....	69

INTRODUCCIÓN

Características generales del cultivo de soja y su valor económico

La soja (*Glycine max*) es una especie vegetal perteneciente a la familia de las leguminosas, con un número diploide de cromosomas, con una reproducción autógena, y una gran producción de semillas con contenido elevado de proteína y aceite. Se distinguen cuatro etapas del desarrollo del cultivo: la embrional, que comienza con la formación del cigoto y concluye con la emergencia y la constitución de una planta capaz de autoabastecerse de fotoasimilados; la etapa juvenil, que se caracteriza por la incapacidad de la planta para formar órganos reproductivos, pero crece a nivel vegetativo; la de madurez, donde se inicia la transformación de los meristemas vegetativos en reproductivos; y la senil, en el cual se desencadenan una serie de mecanismos que llevan a la muerte de la planta ^[1].

Respecto a la sensibilidad de la soja al fotoperíodo, hay variedades que son insensibles al mismo y otras presentan una gran sensibilidad ^[2]. Existe una clasificación que divide a los cultivares en grupos de madurez (GM), la cual comienza con el grupo 000 que resulta tolerante a bajas temperaturas e indiferente al fotoperíodo; y concluye con los GM que poseen mayores requerimientos de días cortos. Según el GM al que pertenece el cultivar y la ubicación geográfica en la que se encuentra, se favorecerá el crecimiento vegetativo o el reproductivo.

La extensión del sistema radical de las plantas de soja varía considerablemente con el manejo del suelo y el estado estructural del mismo. La raíz principal puede llegar a una profundidad de más de 2 metros y las laterales tienen la capacidad de extenderse más de 50 cm en sentido horizontal. El factor que más afecta al patrón de distribución y al crecimiento de las raíces es el contenido de agua del suelo, haciendo que normalmente se desarrollen más en la capa superficial que en las profundas ^[3]. Otra característica importante de este cultivo es su plasticidad. Las plantas pueden recuperarse

completamente luego de una destrucción total de su follaje o sus flores, compensando reducciones en su rendimiento.

A nivel mundial, la soja es la leguminosa de mayor importancia en cuanto a área sembrada y a venta de semillas, y es el cuarto cultivo más importante en volumen de negocios, solo por detrás de los tres grandes cereales: maíz, trigo y arroz. El cultivo de soja es también particularmente relevante para el desarrollo socioeconómico de la región, siendo Brasil y Argentina el segundo y tercer país con mayor producción de este grano, respectivamente ^[4]. En nuestro país, en la zona de la pampa húmeda se concentra la mayor cantidad de hectáreas sembradas de soja. En la campaña 2019/2020 hubo 17 mil hectáreas sembradas de soja, las cuales generaron un rendimiento de 2925 kg/ha según lo reportado por la Bolsa de Comercio de Rosario (BCR). La mayor parte de esa cosecha fue exportada, generando divisas por más de USD 14 mil millones.

La importancia del nitrógeno y la fertilización biológica

El rendimiento de los cultivos depende en buena medida de la disponibilidad de nitrógeno. Las principales fuentes de este nutriente son el nitrógeno inorgánico presente en el suelo, el cual proviene de la transformación de residuos orgánicos y de fertilizantes, y el nitrógeno atmosférico que es fijado por las bacterias de vida libre y simbiotes de leguminosas, conocidas en conjunto como microbios diazotrofos ^[5]. Normalmente, la acumulación de nitrógeno por parte de las plantas es baja al comienzo del cultivo, pero se va incrementando hasta llegar al máximo durante la floración y el establecimiento de los frutos. Luego, cuando comienza el llenado de los granos, las tasas de asimilación de nitrógeno empiezan a declinar. Los procesos de producción, distribución y aplicación de fertilizantes nitrogenados sintéticos utilizan derivados del petróleo, lo cual la posiciona como una de las principales industrias productoras de gases de efecto invernadero. La fertilización nitrogenada sintética produce un 15% del dióxido de carbono (CO₂) y un 71% del óxido nitroso (N₂O) total liberado a la atmósfera por acción del hombre ^[6]. La agricultura necesita más de 130 millones de toneladas de fertilizantes nitrogenados sintéticos por año

para sostener sus altos niveles de productividad. Es por esto que la comunidad científica ha mostrado un consenso respecto a la no sustentabilidad de la agricultura moderna basada en la fertilización nitrogenada sintética ^{[7], [8], [9]}.

Una alternativa sustentable para mitigar la problemática del nitrógeno es la promoción de la fijación biológica de nitrógeno (FBN) mediada por diazótrofos ^[10]. Esta es una estrategia eficiente en especies de leguminosas como la soja y la alfalfa, que forman nódulos simbiotes con rizobios ^[11]. Estas especies vegetales son capaces de crecer sin fertilización nitrogenada sintética, y, además, aportan nitrógeno al suelo disminuyendo el uso de productos químicos derivados del petróleo ^{[12], [13]}. Además, debido al alto contenido de materia orgánica, los suelos con ecologías microbianas dinámicas muestran requerimientos de fertilizantes más bajos ^[14]. Asimismo, la FBN resulta económicamente más accesible, ya que el costo de la misma es de aproximadamente USD 1 por hectárea (costo de peleteado de semillas con rizobios), mientras que la aplicación de fertilizantes nitrogenados requiere alrededor de U\$S 100 por hectárea sembrada.

Al argumento económico hay que agregarle la practicidad de la aplicación de los productos: a diferencia de los fertilizantes sintéticos, los cuales deben ser trasladados al lugar de uso y aplicados al campo por el productor agropecuario, la fertilización biológica implica que simplemente que el productor agropecuario compre las semillas impregnadas con los microorganismos benéficos, favoreciéndose así su difusión en el mercado.

Es evidente entonces que la fijación biológica de nitrógeno provee beneficios sustanciales, tanto agronómicos como ambientales, ya que sustituyen la utilización de fertilizantes sintéticos en las plantaciones ^[15]. Así, los inoculantes son actores claves en el mejoramiento de la sustentabilidad de la agricultura moderna.

La simbiosis leguminosa-rizobio

La simbiosis leguminosa-rizobio resulta en la formación de nódulos en las raíces de las plantas, los cuales proveen de un ambiente apropiado para la fijación de nitrógeno. La formación de los nódulos requiere dos procesos de desarrollo ^[16]: la organogénesis del

nódulo, y la infección del mismo por parte de las bacterias. Ambas fases requieren del reconocimiento de las moléculas de señalización conocidas como factores Nod (NF) generadas por las bacterias. Éstos son lipoquitooligosacáridos específicos de la simbiosis y son percibidos en las células de la epidermis a través de receptores específicos, resultando suficientes para activar la organogénesis del nódulo ^{[17], [18]}.

La infección normalmente comienza con la adhesión de las bacterias al extremo de raíces en crecimiento, lo cual es seguido por la formación de la estructura curva característica dentro de la cual se establecen las microcolonias bacterianas. En este punto, se comienzan a formar los hilos de infección en el cual las bacterias empiezan a reproducirse ^[19]. Los hilos de infección se extienden a través de la epidermis y hacia el nódulo en crecimiento, donde las bacterias empiezan a fijar nitrógeno.

Los nódulos por lo general varían en forma y tamaño, pero todos son estructuras y modificaciones de las células normales de la raíz que cumplen con la función de proteger a las enzimas de los rizobios que son sensibles al oxígeno ^[20]. Para que la FBN sea llevada a cabo se requiere una baja y controlada concentración de oxígeno dado que el complejo nitrogenasa, responsable de la reducción del nitrógeno, es irreversiblemente inhibido en presencia del mismo. Para ello, los nódulos poseen una capa de células no infectadas que rodea al grupo central de células infectadas, restringiendo el flujo de oxígeno y generando el ambiente microaeróbico necesario ^[21].

El complejo enzimático nitrogenasa tiene dos componentes de metal-proteína: la subunidad que se une a hierro (Fe) y la que se une a molibdeno (Mo) ^[22]. Se organiza como un tetrámero $\alpha_2\beta_2$ de 230 kDa ^[23] y está codificada por los genes *nifHDK*, que se encuentran contiguos dentro del genoma bacteriano. Los genes *nifH* en particular, se encuentran altamente conservados en todas las nitrogenasas ^[24].

El problema de la ausencia de nuevos inoculantes para soja en las últimas décadas

Como describimos anteriormente, la incorporación de la tecnología de inoculación ha reducido el consumo de petróleo, la emisión de gases de efecto invernadero y la

liberación de agroquímicos potencialmente tóxicos. De esta manera, los inoculantes son actores claves en el mejoramiento de la sustentabilidad de la agricultura moderna. Desde el origen de esta tecnología, la investigación público-privada ha estado focalizada en obtener nuevos aislamientos microbianos y en desarrollar nuevas tecnologías de aplicación para maximizar los beneficios económicos y ambientales de los inoculantes. A pesar de la expansión del uso de inoculantes en cultivos no leguminosos y leguminosas de menor relevancia económica en las últimas décadas, la mayoría de los inoculantes producidos actualmente a nivel mundial son rizobios aislados originalmente en la década de 1960. Éstos son utilizados para cultivos de leguminosas de alto impacto económico ^[25], principalmente en soja (cepas del género *Bradyrhizobium*) y en menor medida en alfalfa (cepas del género *Sinorhizobium*). La ausencia de innovaciones en la genética de rizobios aplicada al cultivo de soja se debe en buena medida a las limitaciones de la aplicación de ingeniería genética en microbios utilizados en el ámbito de la agricultura debido a que los mismos (bacterias recombinantes) son considerados *GMOs* por las autoridades regulatorias y la liberación masiva de estas bacterias recombinantes implica riesgos a nivel ambiental y de salud pública ^[26].

Dentro de los inoculantes más utilizados a nivel mundial, y que fueron aislados hace décadas, se puede incluir los microsimbiontes *Sinorhizobium meliloti* B399 (originalmente denominado *Rhizobium meliloti* 102F34) y *S. meliloti* B401 para alfalfa, y *Bradyrhizobium japonicum* SEMIA 5079, *B. japonicum* E109 (derivada de la cepa USDA 138) y *B. diazoefficiens* SEMIA 5080 para soja ^[27-30]. Esta situación negativa, que se extiende en el tiempo, contrasta con el continuo mejoramiento genético de los germoplasmas de alfalfa y de soja llevado a cabo por grupos de investigación y por empresas privadas que utilizan tanto mejoramiento convencional como biotecnología, evidenciando la necesidad de mejorar los inoculantes actuales con técnicas alternativas como la selección de mutantes espontáneas derivadas de inoculantes actuales. Mientras que diversos estudios han demostrado los beneficios de la inoculación comercial de soja con rizobios, muchos puntos permanecen sin dilucidar, incluyendo los factores genéticos responsables de la mayor

competitividad de nodulación de las cepas de la especie *B. japonicum* por sobre cepas de la especie *B. diazoefficiens* [31-33].

Características generales de *B. japonicum* E109 y *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110

Los rizobios son bacterias gram negativas que habitan en el suelo y tienen los genes requeridos para llevar a cabo la nodulación y fijación de nitrógeno [34]. *Bradyrhizobium japonicum* en particular es una especie perteneciente al *subphylum* α -*Proteobacteria*. En los años '70, se recibieron en nuestro país varias cepas del género *Bradyrhizobium* para ser evaluadas bajo condiciones agronómicas, incluida la cepa 2860 (anteriormente denominada USDA138) enviada desde Nueva Zelanda, la cual fue posteriormente renombrada como *B. japonicum* E109. Desde hace décadas esta cepa elite es la recomendada por los organismos nacionales de ciencia y tecnología para inocular soja debido a su efectividad al colonizar la planta y fijar nitrógeno, aumentando su productividad y calidad nutricional [29]. *B. japonicum* E109, al igual que las demás especies del género *Bradyrhizobium*, no posee elementos extra-cromosómicos (por ejemplo, plásmidos) en su genoma [35], [36], [37], el cual tiene un tamaño de 9.224.208 pb, un contenido de GC del 63.6% y codifica para más de 8 mil probables proteínas. Además, contiene una región de bajo contenido de GC (59%) el cual contiene a la mayoría de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno. También, contiene genes relaciones con los sistemas de secreción de tipo II y VI, síntesis de fitohormonas y de un estilo de vida rizosférico [29].

Por su parte, *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA110 fue aislada originalmente en Florida, EE.UU. en el año 1957. Ha sido ampliamente utilizada en genética molecular, fisiología y ecología por sus características superiores respecto a la fijación de nitrógeno, convirtiéndose de esta forma en la cepa modelo de la interacción soja-rizobio [38]. El genoma de *B. diazoefficiens* USDA110 es circular y contiene 9.105.828 pb, con un contenido de GC del 64,1%. Al igual que E109, no contiene plásmidos y también incluye una región de menor contenido de GC (59,4%) en la cual se encuentra la región relacionada a la simbiosis además de casi la totalidad de genes de transposasas. Tiene, también, 8 mil probables genes que

codifican para proteínas ^[38]. En promedio, los genes homólogos de las cepas E109 y USDA110 presentan una alta conservación, con valores promedios de identidad nucleotídica entre genes homólogos cercanos al 90%. Tal es el grado de similitud entre los genomas de estas cepas elite y modelo, que la cepa USDA110 fue originalmente denominada *B. japonicum* USDA110. Actualmente, con herramientas de genómica y filogenia, es claro distinguir que estas cepas elite y modelo forman parte de dos subgrupos (dos especies) diferentes pero muy cercanas en términos evolutivos.

La importancia de la resistencia a estrés oxidativo en la colonización de la raíz de soja.

Durante el proceso de infección rizobial, la leguminosa huésped produce una batería de moléculas oxidantes como un mecanismo de defensa temprano ^[39]. Consecuentemente, la eficiencia de la colonización de los rizobios en las raíces de las leguminosas depende de su capacidad de producir enzimas y compuestos antioxidantes de bajo peso molecular que reducen el exceso de especies reactivas del oxígeno ^[40, 41]. En la bacteria modelo USDA110, algunos estudios muestran que las enzimas de detoxificación (por ejemplo, catalasas, peroxidasas y superóxido dismutasas), tradicionalmente relacionadas con la respuesta de las bacterias a estrés oxidativo, no se expresan diferencialmente bajo durante el proceso de simbiosis ^[42, 43]. Además, estos estudios sugieren que la cepa *B. diazoefficiens* USDA110 responde a estrés oxidativo mediante la expresión de mecanismos alternativos, incluyendo el incremento de la movilidad, la expresión de chaperonas, la expresión de factores de transcripción alternativos y la producción de polímeros altamente reducidos ^[42, 43]. Sin embargo, no hay datos acerca de los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta a estrés oxidativo en inoculantes comerciales de soja incluyendo cepas pertenecientes a la especie *B. japonicum sensu stricto*, tales como el inoculante más utilizado en Argentina para inocular soja (*B. japonicum* E109). Considerando este contexto y la estrecha relación filogenética entre las especies *B. japonicum* y *B. diazoefficiens* ^[44], las diferencias de la capacidad de nodulación de soja entre estas especies podría relacionarse con los cambios en los sistemas de respuesta a estrés oxidativo, los cuales podrían

modificarse por diversos motivos incluyendo eventos de micro-evolución o de transferencia horizontal [27, 45].

El uso del glifosato en la agricultura moderna y en el cultivo de soja

El glifosato (*N-phosphonomethyl glycine*) es el herbicida más utilizado a nivel mundial. Desde la primera liberación de un cultivo tolerante a glifosato (específicamente una variedad de soja transgénica) ocurrida en el mercado de Estados Unidos en el año 1996, el uso de este herbicida se ha incrementado drásticamente. Durante las últimas décadas, la adopción de germoplasmas tolerantes a herbicidas, incluyendo una amplia diversidad de cultivos de leguminosas (por ejemplo, la alfalfa y la soja) y no leguminosas (por ejemplo, el algodón, el maíz y el arroz), se ha expandido drásticamente tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. El cultivo de estos transgénicos en asociación con el glifosato ha constituido la más efectiva y más extensiva tecnología de control de malezas que desarrolló la humanidad. Sin embargo, a pesar de que el glifosato es toxicológicamente inocuo para la salud humana y de los animales (al menos bajo un manejo adecuado de bioseguridad) y su impacto ambiental es bajo en comparación con la aplicación de múltiples herbicidas no selectivos (tecnología que reemplazó el glifosato), su uso extendido ha generado la ocurrencia de malezas tolerantes a este herbicida, además de alterar la nutrición mineral de las plantas, afectar la microbiota de los animales e incrementar la susceptibilidad de las plantas a patógenos [46].

El impacto del glifosato sobre la simbiosis de la soja con los rizobios

El glifosato inhibe la enzima *5-enolpyruvyl-3-shikimate phosphate synthase* (EPSPS) involucrada en la síntesis *de novo* de los aminoácidos aromáticos en plantas, bacterias y otros organismos (Figura 1). Una característica clave de este herbicida sistémico que explica su éxito comercial es su particular capacidad de translocar rápidamente por los tejidos vegetales, matando meristemas en regiones muy lejanas a su sitio de aplicación y así

controlando una amplia diversidad de malezas incluyendo especies vegetales perennes. Los actuales cultivos comerciales tolerantes a glifosato, incluyendo los cultivares transgénicos de soja, expresan una enzima EPSPS insensible y no una enzima de degradación del mismo; de esta forma los endófitos naturales e inoculantes comerciales son indirectamente expuestos al herbicida. Un claro ejemplo del impacto negativo del glifosato sobre las bacterias promotoras del crecimiento vegetal es la reducción en la fijación de nitrógeno y la productividad en el cultivo de soja transgénica, probablemente vía la inhibición de sus rizobios [47]. Esta situación evidencia la necesidad de mejorar los inoculantes actuales para maximizar la fijación de nitrógeno en cultivos tolerantes a glifosato.

Diversos mecanismos de resistencia a glifosato han sido descritos en una amplia variedad de microbios, incluyendo la alteración del sitio *target* y variaciones en los niveles de importación, exportación y/o degradación del glifosato [48]. Sin embargo, la emergencia de resistencia a glifosato en rizobios no ha sido estudiada a nivel genético. En este contexto, es interesante seleccionar y estudiar mutantes espontáneas tolerantes a glifosato derivadas del inoculante comercial E109 aplicado a la soja transgénica en Argentina.

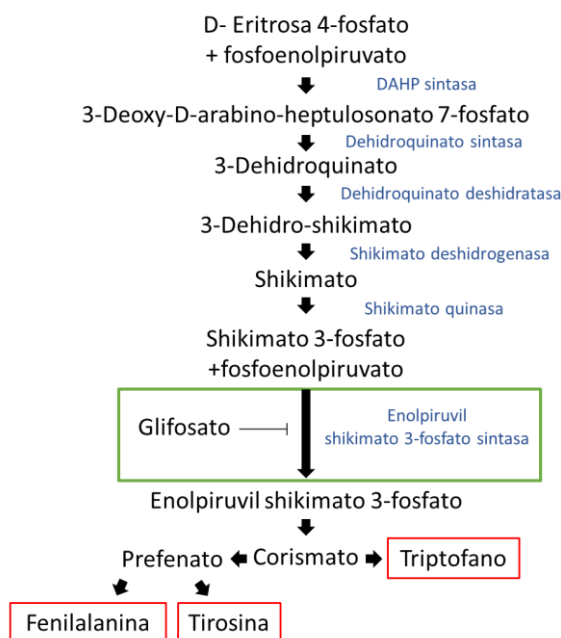


Figura 1: El glifosato inhibe la biosíntesis de amino ácidos aromáticos. El glifosato inhibe la acción de la enzima enolpiruvil shikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS), impidiendo la síntesis de los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano.

El glifosato pertenece al grupo de los compuestos amino fosfonatos [49], caracterizados por su resistencia a hidrólisis química, descomposición termal y fotólisis, gracias a la unión C-P que presenta su estructura [50]. De todas formas, algunas bacterias tienen la capacidad de utilizar al glifosato como fuente fósforo, como distintas cepas pertenecientes a los géneros *Flavobacterium*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes* y *Arthrobacter* [51], [52], [53], [54]. De manera similar, especies pertenecientes a los géneros *Achromobacter*, *Agrobacterium* y *Ochrobactrum* lo pueden emplear como única fuente de carbono o de nitrógeno [55].

Las enzimas responsables de la capacidad de utilizar al herbicida como fuente de nutrientes son oxidasas, en el caso de la utilización como fuente de nitrógeno; y una C-P liasa, en el caso del uso como fuente de fósforo [54], [48]. Pero además se han encontrado otras enzimas como la glifosato oxidasa (GOX) y la glifosato N-acetiltransferasa (GAT), que tienen la capacidad de escindir el enlace C-N de la molécula de herbicida y N-acetilarla, respectivamente [48, 54, 55]. También se han identificado enzimas conocidas como “fosfonatasas”, las cuales son capaces de degradar fosfonatos con una gran especificidad de sustrato [56], [57], [58] (Figura 2).

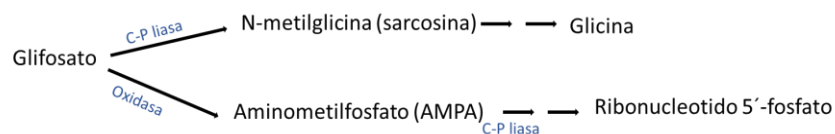


Figura 2. Posibles vías de degradación bacteriana del glifosato. Algunas especies bacterianas tienen la capacidad de degradar al glifosato por medio de diversos caminos, los cuales en su mayoría implican la acción de enzimas liasas y oxidasas.

Emisión de óxido nitroso en el sistema agrícola

Un tópico importante que ha surgido en los últimos años es el aumento de las emisiones de los gases de efecto invernadero (GEI) como el dióxido de carbono (CO₂), el metano (CH₄) y el óxido nitroso (N₂O), lo cual resulta en el cambio climático mundial. La seguridad alimentaria se ve afectada por el cambio climático y éste puede afectar los patrones de precipitaciones, aumentar la temperatura global y afectar directamente al

sistema agrícola ^[59]. Se estima que la agricultura contribuye entre el 60 y el 70% del total mundial de emisiones antropogénicas de N₂O, principalmente debido al uso de fertilizantes nitrogenados y emisiones de desecho animal ^[59]. Muchos sistemas agrícolas requieren la aplicación de fertilizantes nitrogenados para lograr un alto rendimiento de cultivos ^[60] y la absorción de este nitrógeno aplicado por parte de los cultivos es frecuentemente baja ^[61]. En los cultivos de leguminosas, los flujos de N₂O de la superficie del suelo se originan principalmente del proceso de nitrificación seguido de desnitrificación mediado en gran medida por los rizobios liberados del nódulo senescente (Figura 3) ^[62], ^[63]. Los genes involucrados en la ruta de la desnitrificación son los que codifican para los complejos enzimáticos nitrato reductasa (*napAB*), nitrito reductasa (*nirK*), óxido nítrico reductasa (*norCB*) y óxido nítrico reductasa (*nosZ*). El proceso de desnitrificación completo es inocuo a nivel ambiental pero si el rizobio es incapaz de realizar la oxidación de N₂O en N₂ (NOS-), se convierte en un productor de N₂O (Figura 3) ^[64]. Esto ocurre con la cepa E109, que produce N₂O (NAP+, NIR+, NOR+) pero no degrada el N₂O (NOS-) ^[65]. Por lo tanto, es importante seleccionar nuevas cepas que sean capaces de emitir bajas cantidades del gas en cuestión pero que, a su vez, generen un mayor rendimiento en los cultivos.

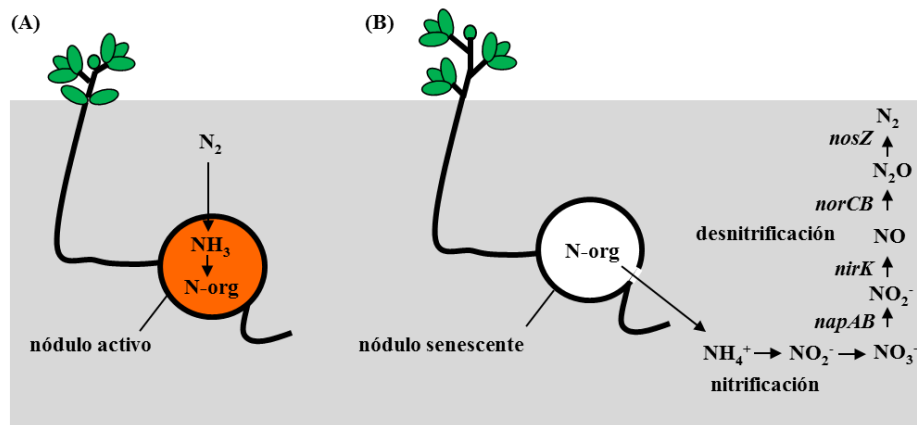


Figura 3. Esquema de las principales transformaciones de los compuestos nitrogenados en el cultivo de leguminosas. (A) Fijación biológica de nitrógeno (FBN). (B) Nitrificación seguida de desnitrificación. Se muestra al menos un gen estructural presente en cada uno de los complejos enzimáticos relacionados con las reacciones de reducción de compuestos nitrogenados durante el proceso de desnitrificación ^[64].

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECIFICOS

El objetivo general de esta tesis es realizar un aporte a la sustentabilidad económica y ambiental de la producción de soja mediante el mejoramiento de la tolerancia a estrés oxidativo y glifosato de los rizobios utilizados como inoculantes. Se plantean entonces, los siguientes Objetivos Específicos (OE):

- OE1- Evaluar las sensibilidades intrínsecas y las dosis mínimas inhibitorias de dos agentes de estrés abiótico (peróxido de hidrógeno y glifosato) en la cepa E109.
- OE2- Seleccionar posibles mutantes espontáneas derivadas de la cepa E109 que sean tolerantes a peróxido de hidrógeno y glifosato utilizando los protocolos de selección previamente establecidos en el OE1.
- OE3- Corroborar la identidad y el fenotipo de tolerancia de los clones seleccionados en el OE2, y caracterizar con detalle los niveles de tolerancia de los clones individuales frente a peróxido de hidrógeno y glifosato, según corresponda.
- OE4- Identificar las mutaciones responsables de los fenotipos encontrados mediante la secuenciación y el análisis de los genomas de los clones mutantes con distintos niveles de tolerancia a estrés abiótico caracterizados en el OE3 y su comparación respecto a su parental salvaje (cepa E109).
- OE5 - Evaluar el efecto de las mutaciones identificadas en el OE4 presentes en los clones seleccionados en los OE2-OE3 sobre su actividad de promoción del crecimiento vegetal en plantas de soja expuestas a distintas condiciones de crecimiento.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

En la introducción se describió la importancia de la resistencia a estrés oxidativo y a glifosato de los rizobios en su actividad de promoción del crecimiento vegetal. En ese contexto se propone la siguiente hipótesis: “La obtención y aplicación de rizobios mutantes tolerantes a estrés oxidativo y a glifosato derivados del inoculante comercial E109 puede contribuir a mejorar el crecimiento y la calidad nutricional de la soja”.

MATERIALES Y METODOS

Producción de mutantes resistentes a H₂O₂ e identificación de sitios de mutación.

Las mutantes espontáneas (glxA-glxA4) derivadas de la cepa salvaje E109 fueron seleccionadas en medio YEM (Manitol 10.0 g/l, K₂HPO₄ 0.5 g/l, MgSO₄ 7H₂O 0.2 g/l, NaCl 0.1 g/l, extracto de levadura 1.0 g/l y agar 15 g/L) suplementado con 5 mM H₂O₂. Se sembraron 100 µl de un cultivo de *B. japonicum* E109 (DO_{580mm}=0.8) para la obtención de colonias tolerantes. Luego de 10 días en estufa a 28°C, se tomaron aquellas colonias que se desarrollaron cerca del centro de la placa y se recuperaron en placas con medio YEM.

La tolerancia a H₂O₂ fue confirmada por ensayos de inhibición por discos, como se describió previamente ^[66]. Se realizó un cultivo de las colonias recuperadas en YEM líquido (DO_{580mm} =0.8) y se dispensaron 100 µl en placas con YEM sólido. Se dejó secar 10 minutos con la placa abierta en esterilidad, y luego se dispuso un disco de papel de filtro estéril, sobre el cual se descargaron 5 µl de H₂O₂ 10% o 30%. Luego de 7 días de incubación a 28°C se determinó el grado de tolerancia a estrés oxidativo de los clones obtenidos mediante la cuantificación del halo de inhibición que se formó en torno al disco.

Para la identificación de sitios de mutación asociados a los fenotipos de resistencia a estrés abiótico, el ADN genómico de esas cuatro mutantes y la cepa salvaje E109 (control) fueron aislados de cultivos estacionarios utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit (#A1120, Promega, USA). La secuenciación de los genomas fue realizada en el Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), Argentina. Un total de 1.1 millones de bases de entre 35-250 pb de largo fueron obtenidas mediante la tecnología Illumina HiSeq1500. Las secuencias nucleotídicas fueron depositadas en base de datos EMBL, bajo los siguientes números de acceso: glxA (SAMN20560778), glxA2 (SAMN20570040), glxA3 (SAMN20570553), glxA4 (SAMN205700556), y reseqE109 (SAMN20570598). La secuenciación de los *reads* mapeados contra el cromosoma (NZ_CP010313) de la cepa de referencia E109 fue realizada con Geneious software (www.geneious.com). El análisis fue llevado a cabo utilizando los siguientes parámetros: Mapper: Geneious, Sensitivity: Low

Sensitivity / Fastest, Fine Tuning: None (fast / read mapping), Minimum mapping quality: 30, and Map multiple best matches: Randomly. Las diferencias entre los *reads* ensamblados de las cepas mutantes y la secuencia de la cepa de referencia fueron descartados cuando las hipotéticas mutaciones espontáneas también fueron observadas en el ensamblado de *reads* provenientes de la re-sencuenciación de la cepa E109.

Estudios fisiológicos de las cepas mutantes resistentes a H₂O₂ y ensayos de inoculación

Para el análisis de la actividad catalasa, las cepas salvaje (E109) y mutante (*glxA*) se cultivaron en medio YEM sólido a 28°C por 7 días. Luego de la incubación, las colonias fueron lavadas con una solución de H₂O₂ 30% por 15 segundos. La aparición de burbujas de oxígeno indica una actividad catalasa. El estudio del efecto de H₂O₂ en la aparición de mutantes espontáneas resistentes a estreptomicina (*StrR*) se llevó a cabo cultivando las cepas salvaje (E109) y mutante (*glxA*) en YEM suplementado con 0,05 mM de H₂O₂ a 28° C por 7 días. Los controles se realizaron en las mismas condiciones, pero sin el agregado de H₂O₂. Luego de la incubación, los cultivos fueron diluidos de manera seriada con solución fisiológica (0,9% NaCl) e inoculados en placas con YEM sólido con y sin el agregado de 400 ug/ml de estreptomicina. Se incubaron las placas a 28°C por 7 días y se calcularon las frecuencias de ocurrencia de colonias *StrR* a partir de las unidades formadoras de colonias (UFC).

Para el análisis de expresión heteróloga, *B. diazoefficiens* USDA110 fue transformada con el plásmido pBBR1-MCS2 ^[67] el cual contiene el *cluster* BjAC de la cepa E109 (RN69_RS05810-20). Se utilizó 50 µg/ml de kanamicina para la selección de las células transformadas ^[68]. Las transformantes resistentes a kanamicina (USDA110-BjAC) fueron mantenidas en medio YEM sólido con el agregado del antibiótico.

La determinación de la unión a la raíz de las cepas se realizó según la bibliografía ^[69]. Brevemente, plántulas de soja de dos días de edad fueron incubadas en tubos de vidrio por 4 días, en condiciones de cámara de crecimiento. Cinco días después de la inoculación, las bacterias adheridas a la raíz se eliminaron por lavado. La aparición de la cepa de tipo salvaje E109, la cepa de tipo salvaje USDA110 y la cepa recombinante USDA110-BjAC fue analizada

utilizando placas con agar YEM con y sin el agregado de 50 µg/ml de kanamicina y por la amplificación y secuenciación del gen *hisS* de E109 (WP_014491987.1) y USDA110 (NP_774097.1) [70].

La ocupación de nódulos fue estudiado como se describió previamente [71]. En los ensayos de competición, la aparición de las cepas E109 y los mutantes espontáneos StrR y *glxA* en los nódulos fue analizada utilizando placas de agar YEM con y sin 400 µg/ml de estreptomycin o 30% de H₂O₂, respectivamente. La fijación efectiva de nitrógeno de las cepas salvajes y mutantes se analizó cultivando plantas de soja inoculadas con rizobios en hidroponía (vermiculita 100%) e irrigadas con el medio mínimo INTA13 sin nitrógeno (CaCl₂ 0,25 g/l; MgSO₄ 0,25 g/l; Na₂HPO₄ 0,142 g/l; KH₂PO₄ 0,1 g/l; Na₂MoO₄ 0,001 g/l; MnSO₄ 0,0006 g/l; CuSO₄ 0,001 g/l; ZnSO₄ 0,0011 g/l; H₃BO₃ 0,001 g/l; FeCl₃ 0,004 g/l; pH= 6,5), como se describió anteriormente [72]. Las semillas de soja utilizadas en este caso son del genotipo Alim 5.09 cv [73, 74] las cuales, previo a la siembra, se desinfectaron con vapores de 100 ml de hipoclorito de sodio comercial y 3.3 ml de HCl fumante por 4 h. El paso siguiente fue depositar las semillas y cubrirlas con vermiculita. La inoculación se realizó con 1 ml de inóculo por semilla conteniendo aproximadamente 10⁶ UFC/ml, luego de la siembra de las semillas. También se realizó un recuento de las UFC/ml de cada cepa bacteriana ensayada, sembrando 100µl de una dilución 10⁻⁶ de los cultivos correspondientes en placas de Petri conteniendo medio rico. Las mismas fueron incubadas a 28°C por 7 días, para luego realizar el recuento. Las plantas fueron crecidas en cámara de crecimiento en un rango de temperatura que osciló entre 24 y 28°C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. El inóculo se preparó con un cultivo a 28°C por 7 días en agitación en medio YEM de cada cepa a ensayar.

Verificación de género y especie de las cepas mutantes obtenidas

Las cepas del género *Bradyrhizobium*, incluyendo la bacteria E109 y sus cepas derivadas, crecen lentamente, y por lo tanto, los cultivos son particularmente susceptibles a contaminación. Para descartar que los clones elegidos son producto de una

contaminación, se amplificó el gen *nodC* en las probables mutantes obtenidas. Para la preparación del templado para PCR, la disolución de la colonia se realizó en 100 µL de *buffer* TTE (Vf= 1 ml; 10 ul Tritón 1X; 20 ul Tris HCl 0.02 M pH=8; 4 ul EDTA 2 mM pH=8; 966 ul Agua deionizada) se dispuso a 100°C durante 10 min y se enfrió rápidamente en hielo. Para la ejecución de las PCR se utilizó 1 µl de *colony en buffer* TTE y las siguientes condiciones de ciclado: 5 min a 94°C, seguidos de 34 ciclos de: 1 min a 94°C, 45 seg a 58°C y 1 min 20 seg a 72°C, finalizando con una elongación de 10 min a 72°C. La *mix* de PCR se preparó en un volumen final de 25 µl con: 18.50 µl de H₂O (PB-L Productos bio-lógicos®), 2.5 µl de *buffer* 10X (PB-L Productos bio-lógicos®), 0.75 µl de MgCl₂ 50 mM (PB-L Productos bio-lógicos®), 0.5 µl de dNTPs 10 mM (INBIO Highway), 0.3 µl de Taq Pegasus (PB-L Productos bio-lógicos®) y 0.7 µl de cada *primer* con una concentración de 10 µM. El producto de PCR obtenido se corroboró mediante gel de agarosa 1%. Para la amplificación de la secuencia del gen se diseñaron los siguientes *primers* (IDT, USA.) que amplifican una secuencia de 1200 pb: *nodCF195*: CGCCGAATGTCTGGAGTCG y *nodCR1394*: CCTGAGTCATCAGCCGACC.

Estudios de expresión y de secuencia de cepas mutantes resistentes a H₂O₂.

Los análisis de qRT-PCR fueron realizados como se describió anteriormente con algunas modificaciones [75]. La expresión de los genes *catA* e *yfbR* fue normalizada con la expresión del gen *housekeeping sigA* [76]. Estos procedimientos se realizaron luego de la incubación de las cepas en medio YEM por tres días. La eficacia de la unión de los *primers* se determinó mediante regresión lineal representando gráficamente el valor umbral del ciclo frente al logaritmo de la dilución de cDNA. Las reacciones de qPCR fueron realizadas con tres replicas biológicas y dos replicas técnicas.

La comparación genómica entre cepas de *Bradyrhizobium* fue llevada a cabo utilizando el *plugin* LASTZ de Geneious software [77]. La secuencia nucleotídica del *cluster* BjAC de *B. japonicum* E109 se utilizó como *query* para la búsqueda en la base de datos del NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), usando BLASTN (identidad de nucleótidos y límites de cobertura ≤ 80%). El análisis evolutivo de las especies de *Bradyrhizobium* basado en el gen

conservado *recA* se realizó utilizando el software MEGA ^[96]. Los árboles filogenéticos se generaron usando el método *neighbor-joining* (NJ), con las distancias genéticas calculadas usando el modelo de corrección de Poisson y enraizadas en el punto medio.

Producción y caracterización de mutantes resistentes a glifosato

Se seleccionaron mutantes resistentes al glifosato espontáneos derivados de la cepa salvaje E109 en medio RMM (K₂HPO₄ 2,05 g/l; KH₂PO₄ 1,45 g/l; NH₄NO₃ 0,5 g/l; NaCl 0,15 g/l; sacarosa 2 g/l; FeSO₄ 0.0025 g/l; MnSO₄ 0.0005 g/l; ZnSO₄ 0.0005 g/l; CuSO₄ 0.005 g/l; H₃BO₃ 0.005 g/l; NaMoO₄ 0.005 g/l; biotina 0.00001 g/l; pantotenato de calcio 0.00001 g/l; tiamina 0.00001 g/l; CaCl₂ 0,5 g/l; MgSO₄·7H₂O 0,01 g/l. pH= 6,8-7,2); para ello, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) del herbicida llevando a cabo una curva de concentraciones para determinar cuál es la mínima que provoca una inhibición del crecimiento bacteriano en medio mínimo RMM. Una vez determinada la CIM, a un cultivo en medio YEM de la cepa bacteriana de 7 días a 28°C en agitación (DO_{580mm} 0.8) se le realizaron dos lavados sucesivos con solución fisiológica, centrifugando 3 minutos a 5000 xg cada vez, descartando el sobrenadante. Se sembraron 100 µl del mismo en placas de Petri con medio RMM y 7 mM de glifosato. Luego de aproximadamente 15 días de incubación en estufa a 28°C, y una vez que se obtuvieron colonias resistentes al herbicida, se recuperaron las mismas en placas con medio YEM. La resistencia al glifosato de cada clon mutante espontáneo independiente se confirmó sembrando colonias aisladas en el medio selectivo; para llevarlo a cabo se realizaron cultivos de los clones como se indicó anteriormente. De estos cultivos, se sembraron 100 µl de una dilución 10⁻⁶ en placas con medio RMM con 7 mM de glifosato para confirmar la tolerancia de cada clon individual.

Los sitios de mutación asociados a este fenotipo de resistencia a estrés fueron identificados según lo anteriormente descrito ^[78]. Las secuencias de nucleótidos de las cepas mutantes y la cepa de tipo salvaje E109 se depositaron en el EMBL con los siguientes números de acceso: GR1 (SAMN24505280), GR2 (SAMN24518821), GR3 (SAMN24519010), GR4 (SAMN24527104), GR5 (SAMN24529885) y E109 (SAMN24528291). Para los ensayos

de complementación, la cepa E109 fue transformada con el plásmido pBBR1-MCS3 conteniendo los alelos mutantes, como se describió anteriormente ^[78].

Para los estudios fisiológicos en condiciones de aerobiosis, los cultivos bacterianos se realizaron en Erlenmeyers de 125 ml conteniendo 25 ml de medio RMM líquido suplementado con 50 mg/l de extracto de levadura (medio RMM2). Se incubaron a 28°C en agitación a 250 rpm. Se utilizaron células en estado estacionario de crecimiento para inocular medio RMM2 fresco suplementado con el agregado de 0 o 0,7 mM de glifosato, y una densidad óptica inicial de 0,05 (DO_{580nm}). El crecimiento bacteriano fue monitoreado por medición de la densidad óptica, el tiempo de duplicación y por actividad citrato sintasa (CS) ^[79]. Para determinar la reversión del fenotipo de alta emisión de N₂O de la cepa E109, se la complementó con el cósmido pYC7 que contiene el *cluster* de la N₂O reductasa. Previamente se realizó una conjugación utilizando *E. coli* S17-1 con tetraciclina 1 mg/l.

Análisis de la potencial eficiencia de las mutantes resistentes a glifosato

La eficiencia simbiótica fue analizada mediante el crecimiento de plantas de soja inoculadas con rizobios en hidroponía y regadas con el medio mínimo INTA13 sin nitrógeno como se describió previamente ^[78]. El inóculo se preparó con un cultivo a 28°C por 7 días en agitación en medio YEM de cada cepa a ensayar. Luego, se centrifugaron a 5000 xg durante 10 minutos, y se resuspendieron las células en igual volumen de solución fisiológica. Para analizar la habilidad de nodulación de los mutantes bajo estrés por el herbicida, plántulas jóvenes de soja transgénica tolerantes a glifosato se expusieron a la aplicación de 90 mg/l del mismo, en la etapa de cotiledones. Una semana después de la aplicación del herbicida, la presencia de nódulos se determinó mediante evaluación visual.

La eficiencia promotora del crecimiento vegetal de las cepas mutantes en soja sensible al glifosato, sin estrés por glifosato, se analizó dos meses después de la inoculación, como se describió previamente ^[78]. Previo a la siembra, se desinfectaron las semillas con vapores de 100 ml de hipoclorito de sodio comercial y 3.3 ml de HCl fumante por 4 horas. El paso siguiente fue depositar las semillas y cubrirlas con vermiculita. La suspensión

bacteriana se agregó una vez sembradas las semillas. La inoculación se realizó con 1 ml de inóculo por semilla, conteniendo aproximadamente 10^6 UFC/ml. También se realizó un recuento de las UFC/ml de cada cepa bacteriana ensayada, sembrando 100 μ l de una dilución 10^{-6} de los cultivos correspondientes en placas de Petri conteniendo medio rico. Las mismas fueron incubadas a 28°C por 7 días, para luego realizar el recuento. Las plantas fueron crecidas en cámara de crecimiento en un rango de temperatura que osciló entre 24 y 28°C, con un fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Las plantas fueron regadas con solución INTA 13 sin nitrógeno y el inóculo bacteriano se preparó como se explicó anteriormente.

Los ensayos de inoculación en condiciones de campo se llevaron a cabo en la EEA Marcos Juárez (Córdoba) del INTA. Se realizaron 5 parcelas de 3mx1m por cada cepa ensayada, además de un control sin inocular. Las semillas se trataron con una mezcla de Premax® adicionado al inóculo y se sembraron a razón de 30 unidades por metro lineal. Luego de tres meses, se tomaron muestras foliares al azar de las parcelas. El contenido de nitrógeno total en la materia vegetal se estableció por el método Kjeldahl en el Instituto Tecnológico Chascomús (CONICET-UNSAM). Se utilizaron las muestras foliares de las plantas, previamente trituradas en mortero. Las semillas de soja sensibles y tolerantes al glifosato utilizadas fueron las variedades comerciales Alim 5.09 y Andrea 63.1, respectivamente.

El efecto de los tratamientos bacterianos sobre las emisiones de N_2O en el suelo se analizó como se describió anteriormente ^[62] con ligeras modificaciones. Los microcosmos se prepararon colocando aproximadamente 150 g de suelo agronómico que contenía 2 μ M de nitrato ^[72] en botellas esterilizadas de 500 ml expuestas a 150 μ l de cultivo bacteriano cultivado durante siete días en medio YEM y lavado dos veces en solución fisiológica. Los microcosmos se incubaron a 25°C durante 24 h y los flujos de N_2O se midieron mediante cromatografía de gases ^[80].

RESULTADOS

Producción y análisis genómico de mutantes espontáneas resistentes a H₂O₂

Luego de aplicar una fuerte presión de selección en medio sólido conteniendo altas concentraciones de H₂O₂ (5 mM), se obtuvieron cuatro mutantes espontáneas tolerantes a estrés oxidativo (glxA-glxA4) derivadas de la cepa salvaje *B. japonicum* E109. La tolerancia a estrés oxidativo de estos cuatro clones seleccionados fue confirmada por ensayos de inhibición con filtros impregnados de H₂O₂, en donde un mayor halo de inhibición implica mayor susceptibilidad a este compuesto oxidante (Figura 4).

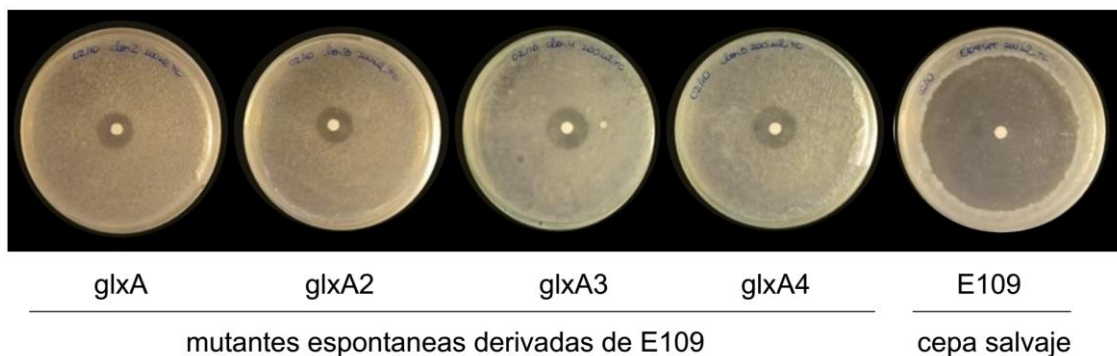


Figura 4. Ensayo de inhibición por discos. El ensayo de inhibición por discos confirmó la tolerancia a H₂O₂ de las cuatro mutantes espontáneas (glxA-glxA4) derivadas de la cepa E109.

Los análisis genómicos revelaron que las cepas mutantes glxA-glxA4 son completamente isogénicas a la cepa parental E109, con la excepción de sustituciones de un único nucleótido en el locus RN69_RS05820 que codifica un probable regulador transcripcional denominado *glxA* (Figura 5). Estas sustituciones no sinónimas introdujeron reemplazos de aminoácidos únicamente en dos sitios de la proteína GlxA: F208L en las cepas glxA-glxA2 y glxA4 y A82E en la cepa glxA3 (Figura 5).

El análisis de la región flanqueante al gen *glxA* demostró que el mismo se encuentra localizado en un probable *cluster* antioxidante (denominado aquí como BjAC), el cual contiene una catalasa (*catA*) y una fosfatohidrolasa (*yfbR*), las cuales se encuentran asociadas a la hidrólisis de peróxido de hidrógeno ^[81] y de nucleótidos oxidados ^[82], respectivamente (Figura 5).

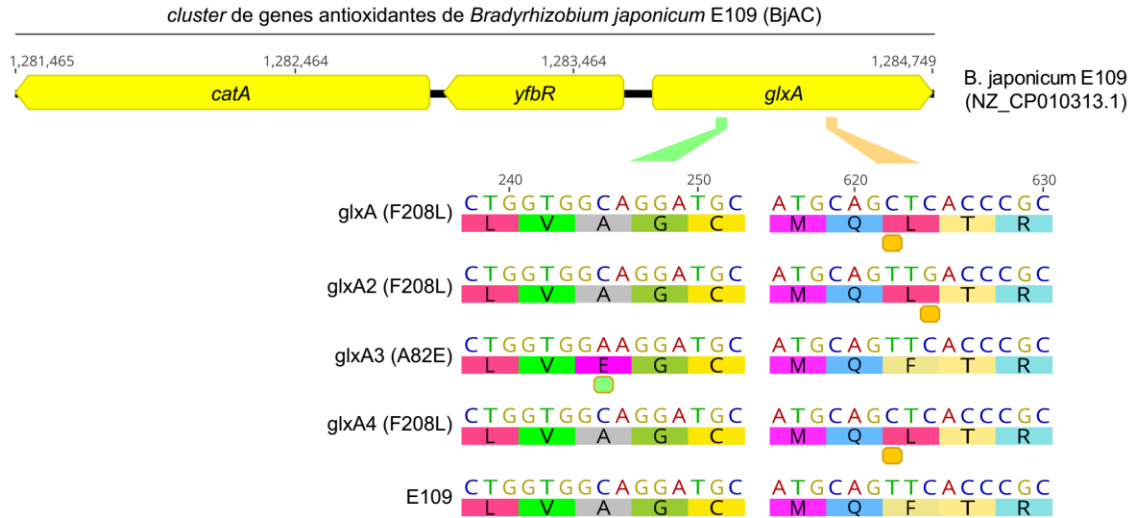


Figura 5. Identificación de las mutaciones responsables de los fenotipos de tolerancia a estrés oxidativo en las mutantes espontaneas derivadas de la cepa E109. Al comparar con el genoma de la cepa parental E109, los genomas de las cepas tolerantes a estrés oxidativo (glxA-glxA4) muestran mutaciones únicamente en el gen *glxA* que codifica para un probable regulador transcripcional (RN69_RS05820). Este gen formaría parte del *cluster* antioxidante, llamado aquí “BjAC”, el cual también codificaría para una catalasa (*catA*) y una fosfatohidrolasa (*yfbR*) involucradas en la detoxificación por estrés oxidativo. CatA (WP_014491374), YfbR (WP_014491375) y GlxA (WP_039154670).

Como se esperaba por el fenotipo y el análisis bioinformático, la mutante *glxA* mostró una mayor expresión constitutiva de los genes antioxidantes *catA* y *yfbR* respecto a la cepa parental E109 (Figura 6).

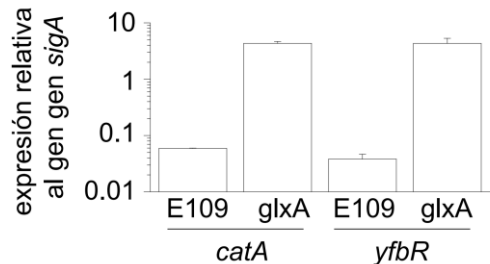


Figura 6. Efectos de la mutación del gen *glxA* en la expresión de los genes *catA* y *yfbR*. Los estudios de RT-PCR en tiempo real de la expresión de *catA* y *yfbR* en *B. japonicum* E109 y la mutante *glxA* mostraron que en la cepa mutante *glxA* estos genes tienen mayor expresión respecto a la cepa parental E109. Los valores representan la media \pm SD (n=3).

En la misma línea que este patrón de expresión, la mutante *glxA* exhibió una mayor actividad catalasa que la cepa E109 (Figura 7).

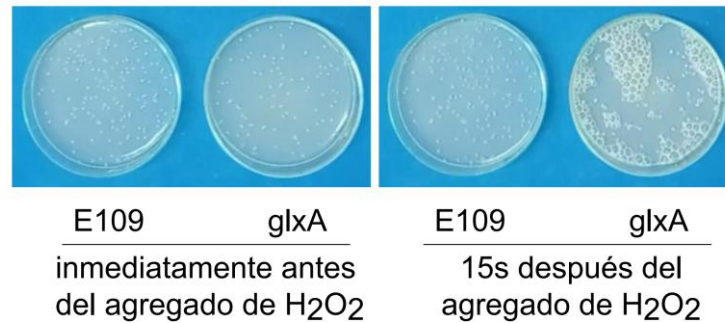


Figura 7. Determinación cualitativa de actividad catalasa. Las colonias de la mutante *glxA* producen un gran número de burbujas de oxígeno luego de la exposición a H₂O₂, respecto a las colonias de la cepa parental E109. Esto sugiere un incremento en la tasa de hidrólisis del peróxido de hidrógeno.

Además, esta mutante tuvo una baja frecuencia de aparición espontánea de colonias resistentes a la estreptomicina respecto a la cepa salvaje E109, bajo estrés oxidativo (Figura 8), sugiriendo una mayor actividad fosfato hidrolasa de nucleótidos.

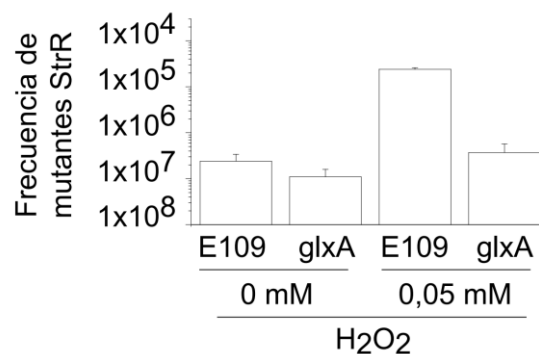


Figura 8. Aparición espontánea de colonias StrR. La cepa *glxA* mostró una menor frecuencia de aparición espontánea de colonias resistentes a estreptomicina respecto a la cepa parental E109 en condiciones de estrés oxidativo. Los valores representan el promedio \pm SD (n=3).

En conjunto, estos resultados muestran la probable relevancia del gen *glxA* en el control de la expresión de los genes *catA* y *yfbR*, y una posible función antioxidante del *cluster* BjAC en el inoculante comercial E109.

Estudios bioinformáticos para establecer el origen del *cluster* BjAC.

Al comparar la secuencia nucleotídica de la región aledaña al *cluster* BjAC de *B. japonicum* E109 con los genomas de otras especies del género *Bradyrhizobium*, incluida la bacteria modelo *B. diazoefficiens* USDA110, se observó que el *cluster* BjAC no es una característica ancestral del género en cuestión y, por lo tanto, no fue heredado por transferencia vertical en las especies de *B. japonicum* (Figura 9).



Figura 9. Evidencias de la adquisición por transferencia horizontal del *cluster* BjAC en el ancestro común de las especies de *B. japonicum*. El *cluster* BjAC perteneciente a las especies de *B. japonicum*, como por ejemplo la cepa E109, se encuentra situado en una región conservada del genoma de *Bradyrhizobium*, inmediatamente río abajo de un *target* de elementos móviles: el gen *ffs*. En este probable *hot spot*, las especies de *Bradyrhizobium* exhiben diferentes bloques genómicos no conservados (resaltados con diferentes colores). Los genes ortólogos conservados se muestran en blanco, con la excepción de los genes *ffs*, que se muestran en negro. En azul se muestran los bloques genómicos no conservados que se encuentran aguas debajo del gen *ffs* (gen metabólico), mientras que en rojo se muestran los genes metabólicos y en amarillo los genes antioxidantes. En gris, se observa una secuencia de inserción (IS) de *B. arachidis*.

Una búsqueda de BjAC en BLAST, excluyendo especie de *B. japonicum*, detectó al *cluster* únicamente en un elemento móvil del simbionte de microalgas *Sinorhizobium* sp. RAC02 [83] (Figura 10), lo cual sostiene que BjAC es un elemento poco común y transferible.



Figura 10. Presencia de BjAC en *Sinorhizobium* sp. RAC02. En el conjunto de cepas secuenciadas en la actualidad, y considerando por afuera de la especie *B. japonicum*, el *cluster* BjAC estaría presente solo un elemento extra-cromosómico (plasmidos pBSY16_1) de la cepa *Sinorhizobium* sp. RAC02.

En *B. japonicum*, el *cluster* BjAC se encuentra localizado inmediatamente río abajo del gen *ffs* (Figura 10), el cual es un *target* muy común de elementos móviles [84]. Otro dato para resaltar es que el *cluster* BjAC habría surgido en el ancestro común de la especie *B. japonicum* después de su divergencia del linaje de *B. diazoefficiens* (Figura 11).

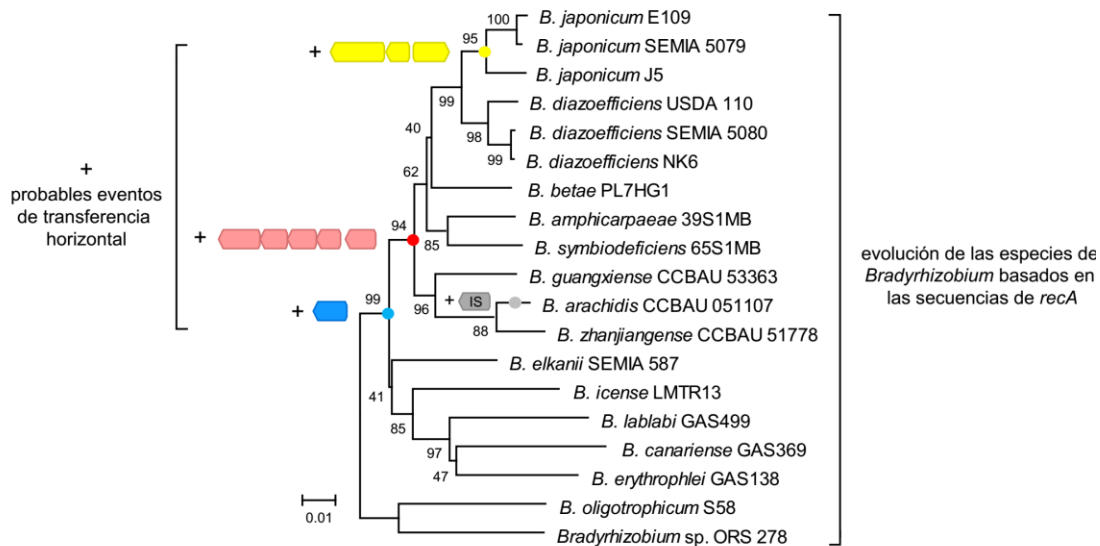


Figura 11. Relaciones filogenéticas entre las especies representativas del género *Bradyrhizobium* basada en el análisis NJ del gen *recA*. Los porcentajes de *bootstrap* mayores o iguales al 40% se indican en los puntos de bifurcación. Cuando se integró este análisis con el estudio de sintenia surge la hipótesis de que la presencia de BjAC en *B. japonicum* se debe a un evento de transferencia horizontal en el ancestro común de estas especies.

Relevancia del *cluster* BjAC en la colonización de las raíces de las plantas de soja

Teniendo en cuenta los resultados anteriores y la relevancia de la respuesta al estrés oxidativo en la colonización de soja por diferentes simbiontes fijadores de nitrógeno, incluidos *Rhizobium leguminosarum* 3841^[56] y *Sinorhizobium fredii* HH103^[105], el *cluster* BjAC es un candidato natural para explicar las capacidades diferenciales de colonización de las especies relacionadas *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*. En este contexto, recreamos experimentalmente los hipotéticos efectos benéficos de la incorporación del *cluster* en el ancestro común de las especies *B. japonicum* sobre la colonización de soja transformando *B. diazoefficiens* USDA110 con el *cluster* BjAC de *B. japonicum* E109 y analizando sus fenotipos de adhesión a la raíz.

Las plantas de soja inoculadas de manera individual con las cepas E109, USDA110 y USDA110-BjAC mostraron un número similar de bacterias unidas a la raíz (Figura 12). Por otro lado, cuando se realizó la co-inoculación con USDA110 y E109, esta última cepa superó ampliamente a *B. diazoefficiens* USDA110 (Figura 12). Por su parte, la transformación de *B. diazoefficiens* USDA110 con el *cluster* BjAC incrementó la habilidad de competencia, proveyendo una capacidad de colonización similar a la demostrada por *B. japonicum* E109 (Figura 12). Estos resultados sugieren que, en un contexto de simbiosis, el *cluster* BjAC puede actuar como un factor importante de la misma.

Luego de observar que el *cluster* BjAC fue probablemente adquirido por transferencia horizontal y que posee probablemente funciones relacionadas a la colonización de raíces, evaluamos las potenciales aplicaciones de las mutaciones *glxA* en la cepa comercial E109. Es sabido que un inoculante para ser exitoso debe poder competir con una gran diversidad de microbios autóctonos y colonizar de manera eficiente los nódulos de las plantas leguminosas^[85]. Para evaluar la competencia en la nodulación, se inocularon plantas de soja con un combinado 1:1 de la cepa parental E109 y las mutantes *glxA* (resistente a estrés oxidativo) y *StrR* (resistentes a estreptomicina). Cada una de las cepas se identificó por su fenotipo de catalasa y su resistencia a antibióticos, respectivamente.

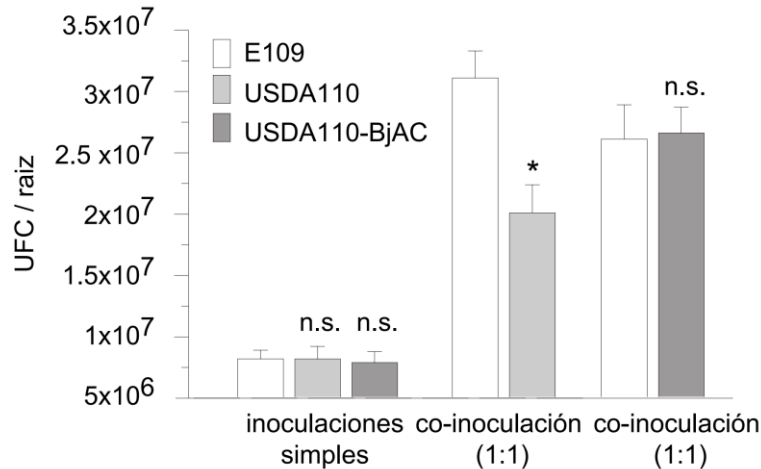


Figura 12. Colonización de raíces de soja por *B. japonicum* E109, *B. diazoefficiens* USDA110 y *B. diazoefficiens* USDA110-BjAC. Las cepas conteniendo (E109 y USDA110-BjAC) o no (USDA110) el *cluster* BjAC se utilizaron para realizar inoculaciones individuales o co-inoculaciones en plántulas de soja. El análisis estadístico se llevó a cabo con ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett, comparando todos los tratamientos con el control E109 en ensayos de inoculación única y la prueba t de Student (*p < 0,05) en ensayos de co-inoculación. Los valores son la media ± SEM (n=4).

En este ensayo se halló que la mayoría de los nódulos fue colonizado por la cepa mutante *glxA* (>80%), lo cual contrasta con la relación 1:1 (48.7 ± 1.5 %) en la cepa control *StrR* (Figura 13). Por lo tanto, estos resultados sugieren que la mutación en *glxA* puede incrementar la actividad de promoción del crecimiento vegetal del inoculante E109.

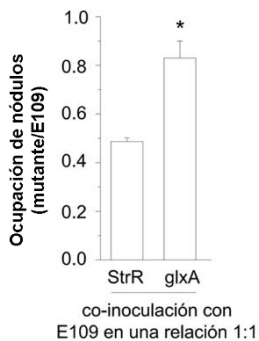


Figura 13. Efectos de la mutación *glxA* en la colonización. La cepa *wild type* E109 y sus mutantes espontáneas *StrR* y *glxA* fueron inoculadas en una relación 1:1. La ocupación de los nódulos se determinó utilizando medios selectivos con estreptomycinina o H₂O₂, según corresponda. Los datos fueron obtenidos de cinco nódulos tomados de cada una de las 20 plantas, las cuales se consideran como n=1. Los valores son del promedio ± SEM (n=3). El análisis estadístico se realizó con la prueba t de Student (*p < 0,05).

Impacto de la mutación en el gen *glxA* sobre el crecimiento vegetal

Para analizar el impacto de la mutación en el gen *glxA* sobre la actividad de promoción del crecimiento de soja de la cepa E109 se realizaron inoculaciones con la cepa salvaje E109 y con las cepas mutantes *glxA* y *StrR*. En esta condición de cultivo libre de nitrógeno y en donde la productividad es directamente proporcional al nitrógeno fijado, luego de 60 días de crecimiento las plantas no inoculadas exhibieron un crecimiento pobre y una fuerte clorosis, mientras que todos aquellos individuos inoculados se mostraron vigorosos y con un color verde saludable en sus hojas (Figura 14a).

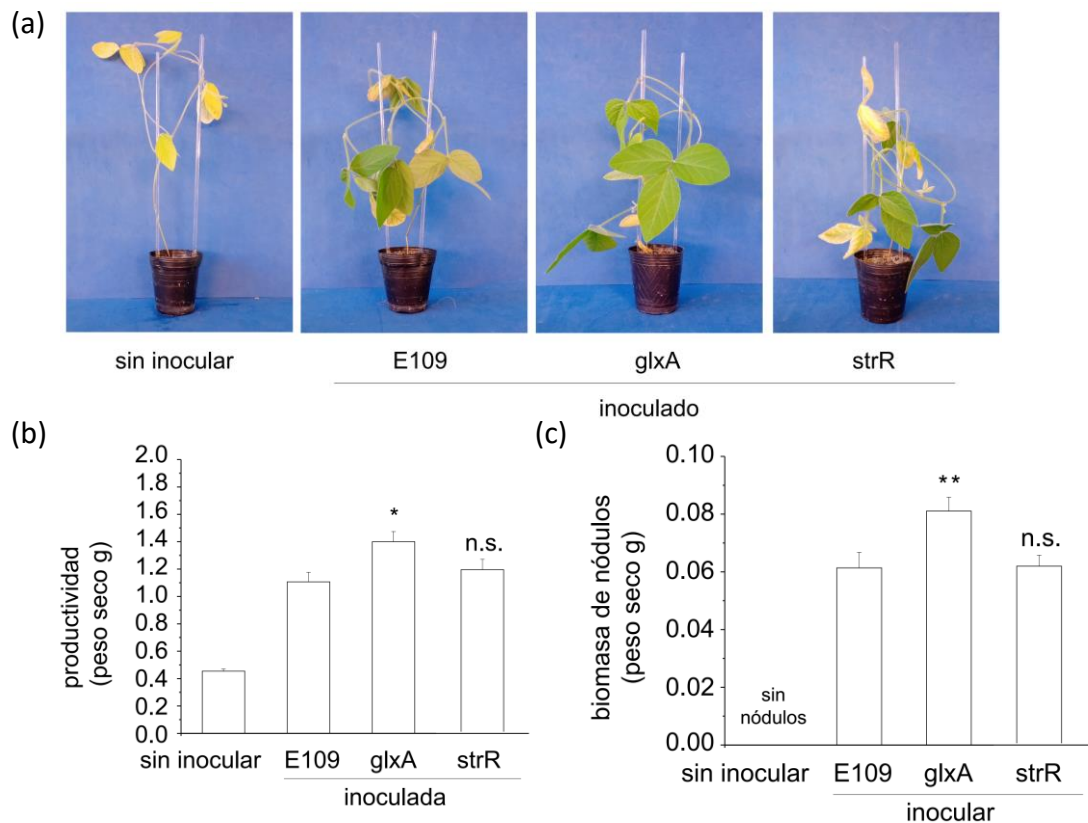


Figura 14. Efectos de la mutación de *glxA* en la eficiencia de la promoción de crecimiento. Se analizó el fenotipo (a), la productividad (b) y la biomasa de nódulos (c) de las plantas de soja inoculadas con las cepas E109 y *glxA* en ausencia de nitrógeno en el sustrato. Los valores mostrados corresponden al promedio + SEM ($n = 24$), donde $n=1$ es el promedio de los valores obtenidos para tres plantas individuales que crecieron en macetas separadas. Las diferencias significativas entre los inoculantes fueron analizadas con ANOVA seguido de una comparación múltiple de Dunnett (n.s.: no significativo, $**p < 0.01$, $*p < 0.05$).

Más importante aún, se observaron diferencias significativas en la productividad (Figura 14b) y en la biomasa de nódulos (Figura 14c) entre las plantas inoculadas con las cepas E109 y glxA pero no entre E109 y StrR. Esto sugiere que los mutantes resistentes al estrés oxidativo con mayor competitividad para nodular la soja pueden reemplazar al inoculante actual E109 debido a su mayor eficiencia en la promoción del crecimiento.

Producción y análisis genómico de mutantes espontáneos resistentes a glifosato

Luego de aplicar una fuerte presión de selección en medio sólido conteniendo altas concentraciones de glifosato (7 mM), se obtuvieron cinco mutantes espontáneos tolerantes a este herbicida (GR1-GR5) derivadas de la cepa salvaje *B. japonicum* E109. La tolerancia a glifosato de estos cinco clones seleccionados fue confirmada por ensayos de crecimiento de colonias aisladas en las mismas condiciones de selección de mutantes (Figura 15).

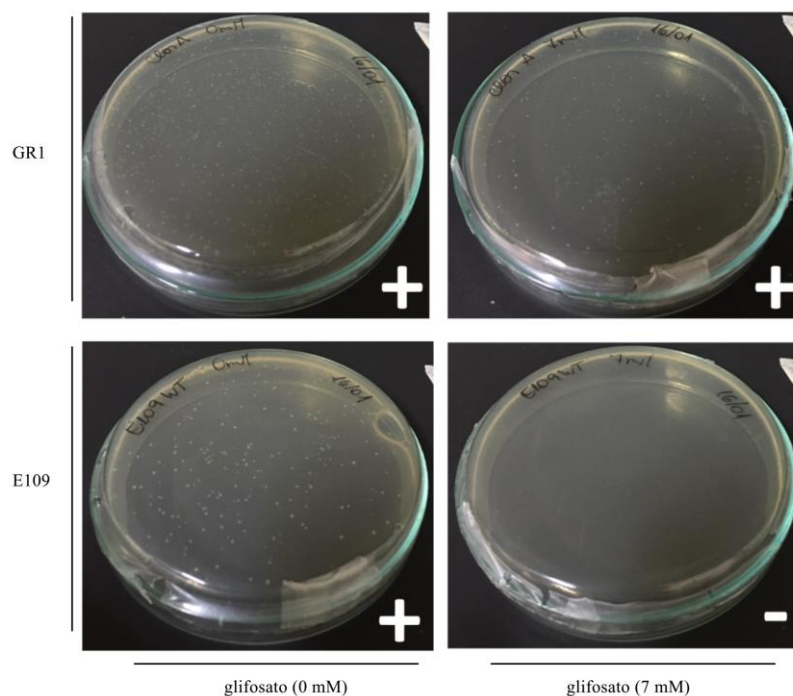


Figura 15. Ejemplo de confirmación de la resistencia a glifosato de las mutantes espontáneas obtenidas. Se ilustra el crecimiento de la mutante GR1 y la cepa parental E109 en medio mínimo RMM suplementado o no con glifosato. Es importante aclarar que se realizó un control de crecimiento de las mismas en medio rico YEM para confirmar la presencia de bacterias en la dilución.

Por otra parte, los análisis genómicos revelaron que las mutantes espontáneas tolerantes al glifosato (cepas GR1-GR5) son isogénicas respecto a la cepa parental E109 con la excepción de sustituciones de un solo nucleótido en los genes *gltL* (Figura 16a), *cya* (Figura 16b), *zigA* (Figura 16c), *betA* (Figura 16d), y *nifH* (Figura 16e). Estos genes codifican un transportador de glutamato, una adenilato ciclasa, una metalo-chaperona que se une a Zn, una colina deshidrogenasa y una subunidad estructural esencial de la nitrogenasa, respectivamente. De estas cinco proteínas bien conocidas, la única que se ha encontrado que está directamente asociada con la aparición de bacterias resistentes al glifosato es el transportador de glutamato, el cual fue descrito como el principal responsable de la incorporación del glifosato al espacio intracelular en cepas bacterianas gram + [86].

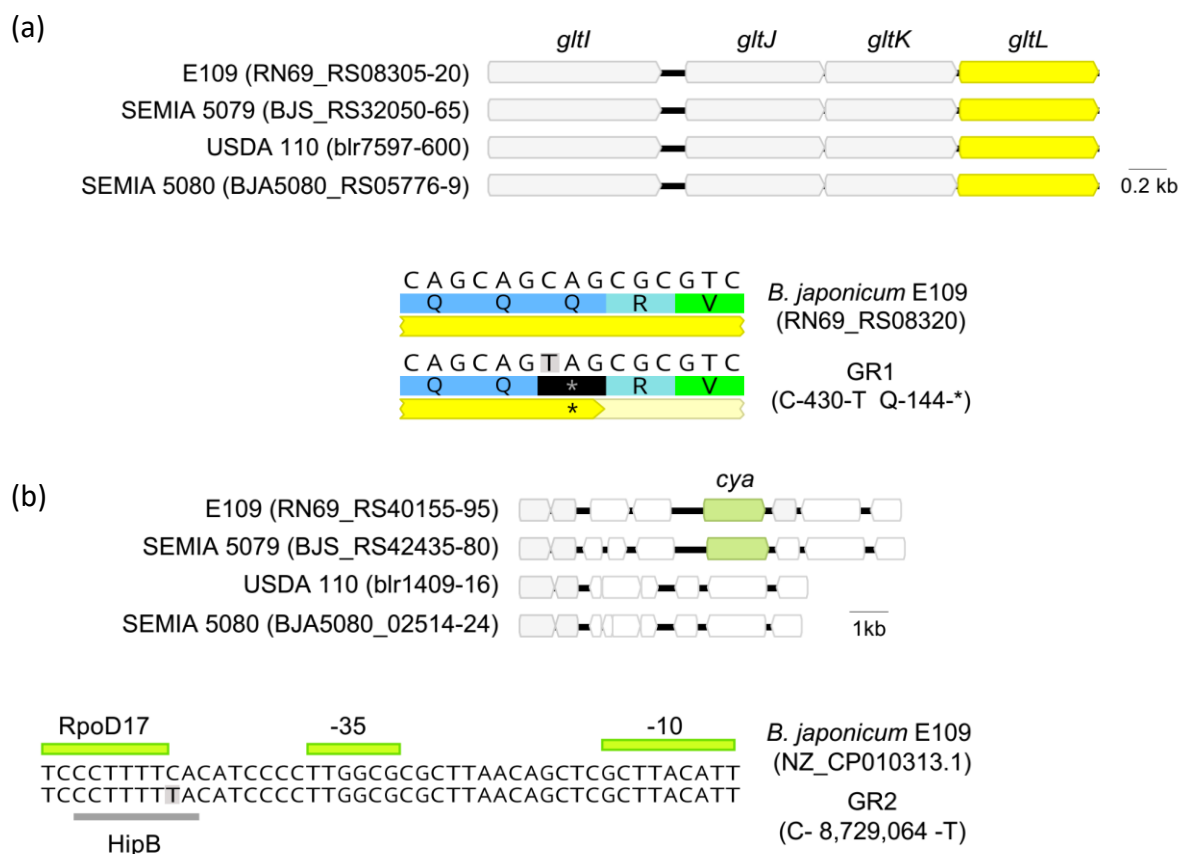
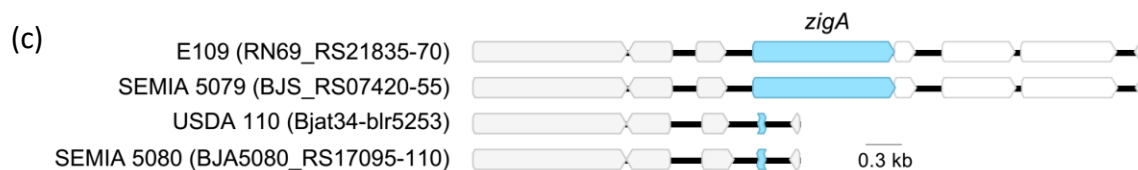


Figura 16. La figura continua en la siguiente página.



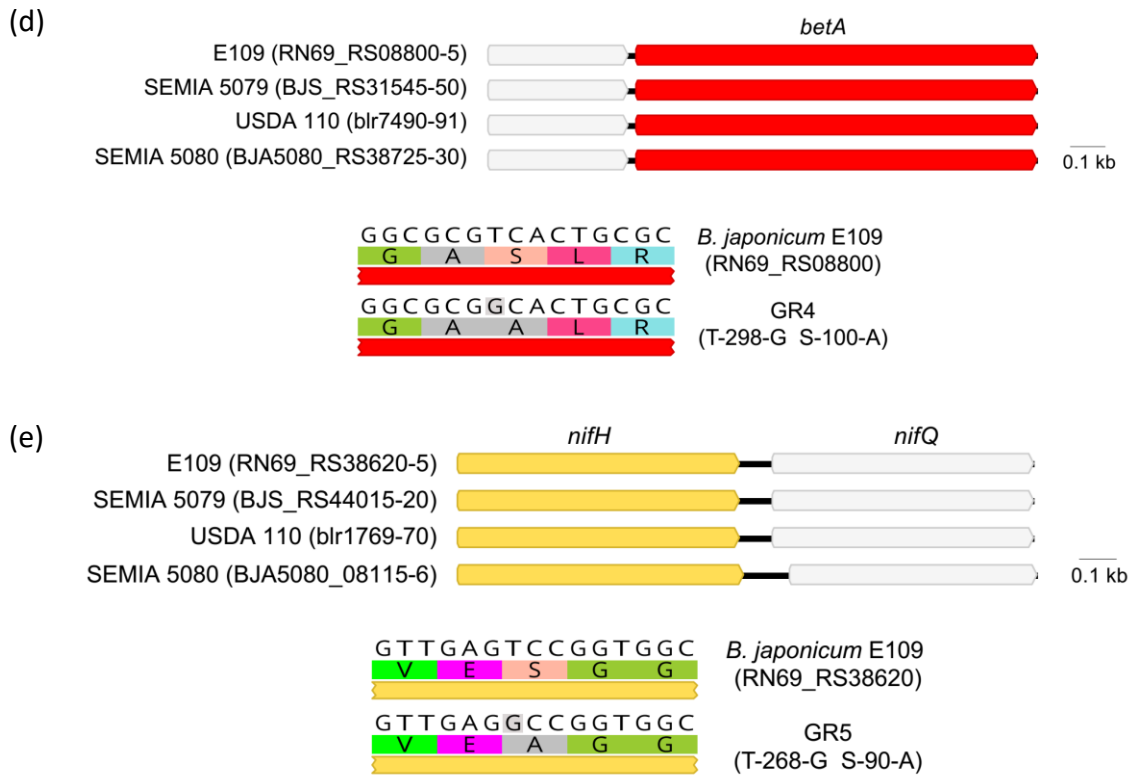


Figura 16. Mutaciones responsables del fenotipo de resistencia a glifosato en las cepas mutantes derivadas del inoculante comercial de soja E109. Al comparar el genoma de la cepa parental E109 con los genomas de las mutantes tolerantes a herbicidas GR1 (a), GR2 (b), GR3 (c); GR4 (d) y GR5 (e), éstas muestran mutaciones únicamente en los genes *gltL* (amarillo), *cya* (verde), *zigA* (celeste), *betA* (rojo) y *nifH* (naranja) que codifican un transportador de glutamato, una adenilato ciclasa, una metalochaperona de unión a Zn, una colina deshidrogenasa y una subunidad de nitrogenasa, respectivamente. Las mutaciones se encuentran resaltadas en gris y el impacto que tienen en las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se describen abajo.

Las consecuencias que tienen estas mutaciones en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos se describen a continuación. En la mutante GR1, se observa el cambio de nucleótidos C-430-T, el cual genera la emergencia de un stop prematuro en el probable transportador que utiliza el glifosato para entrar a la célula bacteriana (Figura 16a). En la mutante GR2 se observa la mutación C-8729064-T en el promotor del gen *cya*, la cual da

origen a la emergencia de un sitio de reconocimiento de un inhibidor de la transcripción (Figura 16b), denominado HipB ^[87]. Dado que la adenilato ciclasa está relacionada con el transporte activo de sustratos y que se ha observado que su mutación incrementa la tolerancia a distintos antibióticos, se puede predecir que la mutación observada en GR2 probablemente este inhibiendo el *uptake* del glifosato en forma similar a lo que estaría ocurriendo en la cepa GR1. En ambos casos, el mecanismo de tolerancia al glifosato sería por exclusión de este inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos. En la mutante GR3 (Figura 16c) y en la mutante GR4 (Figura 16d) se observan sustituciones de nucleótidos que conllevan a cambios de aminoácidos que, *a priori*, no estarían eliminando la función de las proteínas ZigA (D186A) y BetA (S100A), respectivamente. Recientemente, se ha descrito la importancia de la función de la metalchaperona de unión a Zn, ZigA, y de la dehidrogenasa de colina ,BetA, en la degradación de la histidina y la biosíntesis de glicina-betaína en *Acinetobacter baumannii* ^[88] y en rizobios de alfalfa ^[30], respectivamente. Además, la exposición a glifosato induce tanto la depleción de la biodisponibilidad de zinc intracelular, como la expresión de la dehidrogenasa de colina ^[89, 90]. En nuestro caso mostramos la aparición de sustituciones de nucleótidos no sinónimos dentro del gen *zigA* en la cepa GR3 (Figura 16c) y de *betA* en la cepa GR4 (Figura 16d), las cuales mejoraron la habilidad de E109 de crecer en condiciones de estrés por el herbicida. Considerando los trabajos previos que describen la función de ZigA y BetA en el metabolismo de aminoácidos y nuestros resultados, se puede inferir que las mutaciones encontradas estarían modificando el metabolismo del glifosato, específicamente incrementando su velocidad de degradación. Así, el mecanismo de tolerancia a glifosato de las cepas GR1-2 y GR3-4 sería diferente.

Por último, el gen *nifH* de la mutante GR5 muestra la mutación T268G en su secuencia nucleotídica, la cual conlleva el cambio S90A en los aminoácidos. Dado que este gen codifica para una subunidad estructural del complejo nitrogenasa, y el mismo solo se ha descrito como involucrado en la fijación de nitrógeno, no habría una explicación evidente para la tolerancia a glifosato resultante de esta mutación. Sin embargo, como se analizará más adelante, la mutación NifH-S90A podría resultar en una tolerancia a glifosato

por medios indirectos. De ser así, la cepa GR5 tendría un mecanismo de tolerancia a esta herbicida distinto de las cepas GR1-4.

Análisis del efecto de la transformación de E109 con alelos mutantes

Cuando se transformó la cepa E109 con los alelos mutantes de *zigA*, *betA* y *nifH* de las cepas GR3-5 se observó un incremento de la tolerancia al glifosato (Figura 17). Por el contrario, cuando se realizó la transformación de la cepa E109 con los alelos mutantes de los genes *gltL* y *cya* de las cepas GR1-2, no se observó modificaciones en su habilidad de crecer en medios con glifosato. Esto nos lleva a concluir que las mutaciones en GR3-5 y en GR1-2 se tratan de mutaciones de ganancia y de pérdida de función, respectivamente.

glifosato (mM)	cepas					
	E109	GR1 (<i>gltL</i>)	GR2 (<i>cya</i>)	GR3 (<i>zigA</i>)	GR4 (<i>betA</i>)	GR5 (<i>nifH</i>)
0	++	++	++	++	++	++
4	-	-	-	+	++	+
7	-	-	-	+	+	+

Figura 17. Crecimiento frente al herbicida de las cepas transformadas con los alelos mutantes. El crecimiento de la cepa parental E109 y sus cepas recombinantes derivadas que contienen los alelos mutantes *gltL*, *cya*, *zigA*, *betA* y *nifH* respectivamente, fue analizado en medio mínimo sólido RMM con glifosato (4 o 7mM). Referencias: (-): ausencia de crecimiento; (+): crecimiento moderado; (++): crecimiento vigoroso; definidos en base al tamaño relativo de la colonia.

Impacto de las mutaciones en la resistencia a glifosato en cultivos puros e *in planta*.

El glifosato actúa como un antibiótico bacteriostático frente a bacterias gram positivas y gram negativas [91, 92]. En concordancia con su mayor tolerancia al herbicida en medios sólidos (Figura 15), las cepas GR1-GR5 muestran una fase *lag* más corta (Figura 18) y una nodulación más temprana (Figura 19) que la cepa E109 en presencia del herbicida,

confirmando la capacidad de estas mutantes espontaneas de evadir los efectos bacteriostáticos del glifosato en cultivos puros e *in planta*.

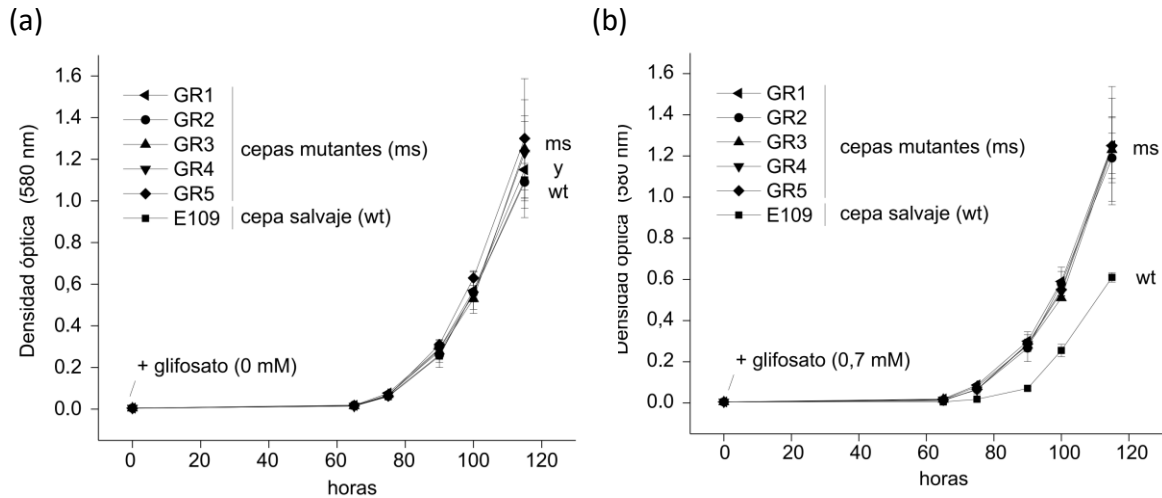


Figura 18. Habilidad de las cepas mutantes de evitar los efectos bacteriostáticos del glifosato en cultivos puros. La duración de la fase lag de la cepa E109 y las mutantes derivadas GR1-GR5 fue evaluada en el medio RMM2 con (b) y sin (a) el agregado de glifosato. Los valores representan el promedio \pm SD (n=3).

Los resultados anteriormente mencionados proveen las primeras evidencias genéticas de que la alteración de la simbiosis entre las plantas de soja y los rizobios bajo el efecto de glifosato se encuentra directamente relacionada con su acción antibiótica sobre los microorganismos.

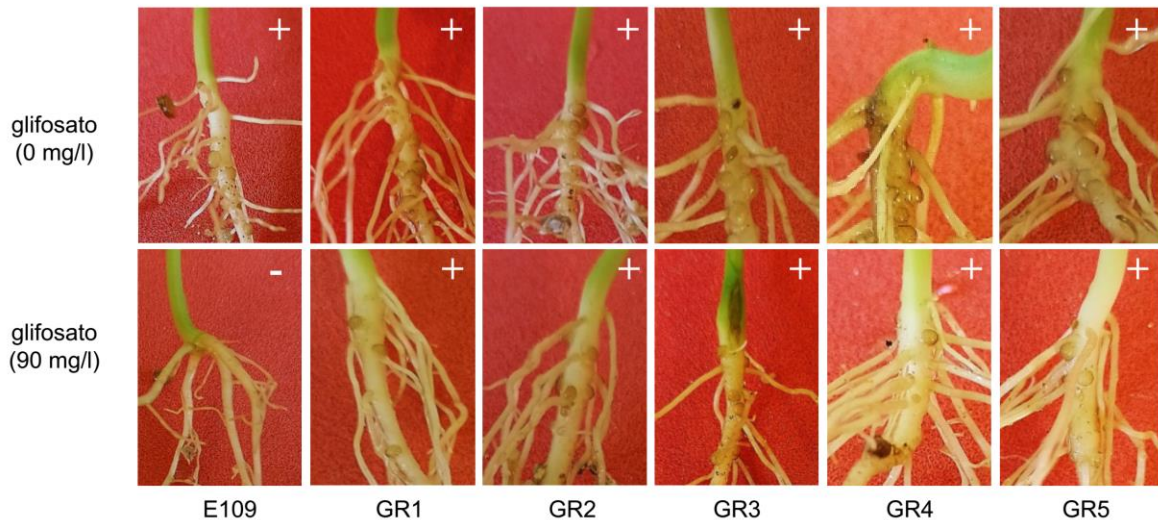


Figura 19. Habilidad de las cepas mutantes de evitar los efectos bacteriostáticos del glifosato *in planta*. La capacidad de nodulación de las cepas E109 y GR1-GR5 en plantas de soja tolerantes a glifosato se analizó en medio mínimo INTA13 sin nitrógeno. Las plantas inoculadas fueron expuestas a la aplicación de glifosato, a excepción de las plantas control. El ensayo de inoculación fue realizado por duplicado utilizando ocho réplicas por cada tratamiento. (90mg/l glifosato= 0,5 mM) Referencias: (+): raíces con nódulos; (-): raíces sin nódulos.

Explorando un posible mecanismo de tolerancia a glifosato en la cepa GR5

Recientemente, un análisis del fosfoproteoma de *Zymomonas mobilis* ZM4 ha mostrado que la subunidad NifH de la nitrogenasa se fosforila en la serina 90 cuando se encuentra en condiciones de fijación de nitrógeno [93]; pero en la actualidad no se encuentran reportes que describan el rol de esta modificación postraduccional. Por nuestra parte, en un análisis de alineamiento, se pudo observar que este sitio se encuentra altamente conservado en distintas cepas fijadoras de nitrógenos, incluyendo los inoculantes comerciales *B. japonicum* E109 y *Azospirillum brasilense* Az39 (Figura 20). Estos resultados sugieren que la cepa GR5 probablemente posee un alelo *nifH* que codifica para una subunidad NifH constitutivamente desfosforilada y que esta situación induce de alguna forma la tolerancia a glifosato.

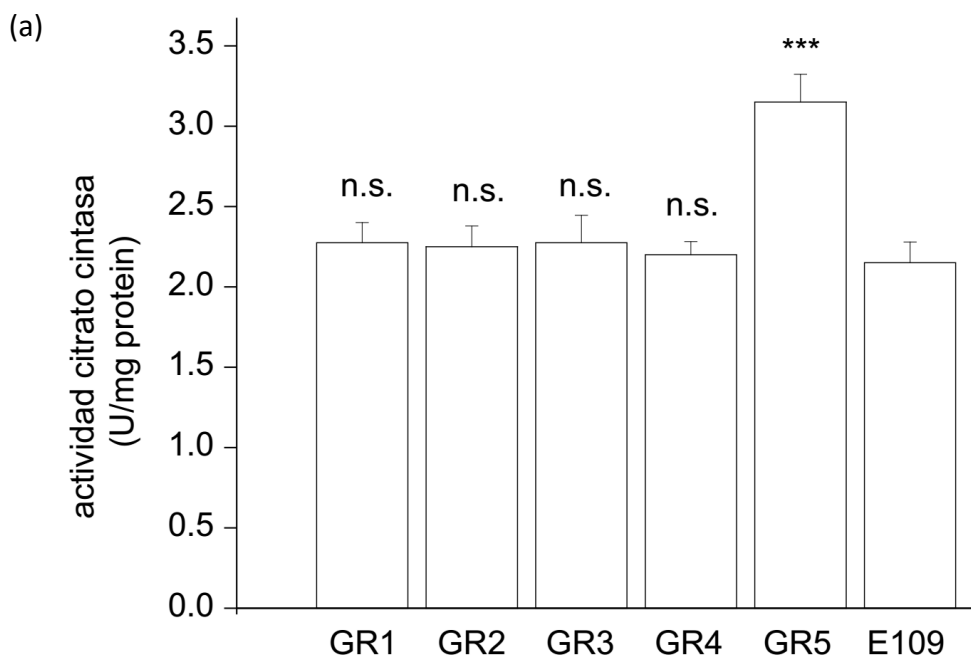
	* ***★***** ** * **
<i>B. japonicum</i> E109	EDVMKVG YQDIRC VESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEEN
<i>Z. mobilis</i> ZM4	EDVLKLG YKDIKC VESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEEN
<i>A. brasilense</i> Az39	EDVLKIG YKGIKC VESGGPEPGVGCAGRGVITSINFLEEN
<i>C. bornimense</i>	DSIMKIG YGGTKC VESGGPEPGVGCAGRGIITSIGMLERL
<i>Nostoc</i> sp. PCC 6720	HEVMLTG FRGVR CVESGGPEPGVGCAGRGIITAINFLEEN

Figura 20. Alto grado de conservación de la serina 90 y de la región flanqueante en la subunidad NifH del complejo nitrogenasa de distintas y distantes especies fijadoras de nitrógeno. El alineamiento de aminoácidos de proteínas NifH parciales de cepas pertenecientes a distintos *phyla*, muestra que el sitio de fosforilación de la serina 90 identificada en *Zymomonas mobilis* ZM4 se

encuentra conservada en esta unidad de la nitrogenasa. En este alineamiento se encuentran las proteínas NifH de *Bradyrhizobium japonicum* E109 (WP_011084578), *Zymomonas mobilis* ZM4 (WP_011241556), *Azospirillum brasilense* Az39 (AIB12323), *Clostridium bornimense* (WP_044035927), *Nostoc* sp. PCC 6720 (CAA83510).

Considerando que la inhibición del crecimiento de los microorganismos por el efecto bacteriostático de los antibióticos se encuentra asociado con una reducción del metabolismo y una supresión de la respiración celular [91, 94, 95], decidimos estudiar la actividad de la citrato sintasa (CS), la cual juega un rol crucial en el metabolismo central del carbono y de la energía [79], y la tasa de crecimiento bacteriano en la cepa E109 y sus mutantes derivadas.

En contraste con las demás cepas mutantes (GR1-GR4), la cepa GR5 mostró una mayor actividad CS (Figura 21a) y un tiempo de duplicación más bajo (Figura 21b) que la cepa parental E109, cuando se evaluaron estos parámetros en células en crecimientos exponencial sin estrés por herbicida. Estos resultados sugieren que la cepa GR5 podría estar evitando la inhibición por glifosato mediante un incremento de la respiración aeróbica.



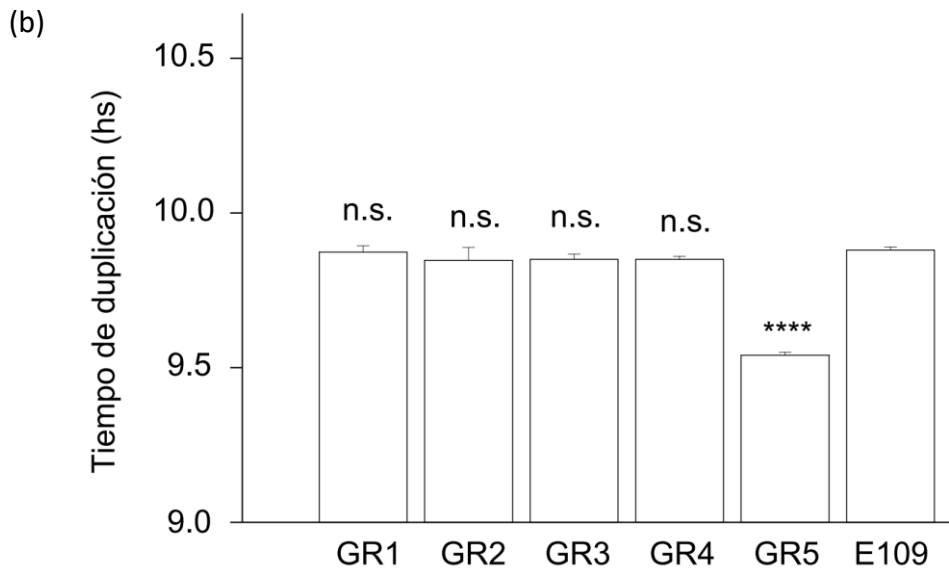


Figura 21. Efectos de la mutación S90A en la actividad citrato sintasa y la tasa de crecimiento bacteriano de la cepa E109. La actividad citrato sintasa (a) y el tiempo de duplicación (b) de la cepa salvaje E109 y las mutantes GR1-GR5 fueron evaluadas en células en crecimiento exponencial sin la adición de glifosato. La cepa GR5 contiene la mutación S90A. Los valores representan el promedio \pm SD (n = 4). Las diferencias significativas entre los inoculantes fueron analizadas con ANOVA seguido de un test de Dunnett (n.s.: no significativa; ****p < 0.0001, ***p < 0.001).

Efectos de la mutación S90A sobre la emisión de N₂O de la cepa E109

Por otra parte, al igual que los inoculantes comerciales de alfalfa ^[96], varios inoculantes de soja incluida la cepa E109 han conservado las reductasas de nitrato, nitrito y óxido nítrico relacionadas con la producción del gas de efecto invernadero óxido nitroso (N₂O) a partir del nitrato; pero perdieron la reductasa de óxido nitroso, la cual se encuentra asociada a la degradación del mismo a nitrógeno gaseoso ^[65]. Así, muchos inoculantes de leguminosas, y en particular la cepa E109, son rizobios con alta emisión de N₂O ^{[65], [62]}.

La complementación de la cepa E109 con el cósmido pYC7, que contiene el *cluster* de la reductasa de N₂O de *Sinorhizobium meliloti* 1021, suprimió parcialmente el fenotipo de alta emisión de N₂O que presentaba la cepa E109 (Figura 22). Además, la cepa GR5 mostró una disminución significativa de las emisiones de N₂O con respecto a la cepa E109 en los ensayos de microcosmos, como se visualiza en la Figura 22. Estos resultados constituyen evidencias adicionales de cómo la mutación NifHS90A podría alterar el metabolismo celular, y además, muestra un impacto ambiental positivo de la misma.

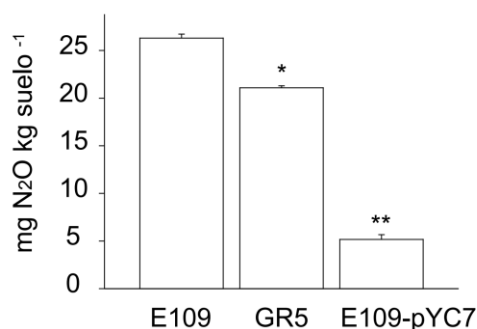


Figura 22. Emisión de N₂O evaluada en microcosmos. Se muestran los valores de flujos promedio de N₂O del microcosmos de suelo inoculado con las distintas cepas. Los valores representan el promedio + SEM (n = 20). *p < 0,05; **p < 0,01, prueba t.

Efectos de la mutación S90A sobre la actividad PGPR de la cepa E109

Cuando se analizó la eficiencia de promoción del crecimiento de la cepa E109 y sus mutantes derivadas en medio libre de nitrógeno en donde la producción de biomasa es directamente proporcional a la eficiencia de simbiosis, se observaron grandes diferencias en productividad (Figura 23a) y en biomasa de nódulos (Figura 23b) entre la cepa E109 y la cepa GR5 en ensayos de inoculación de soja sin estrés por glifosato. Mientras que el resto de las cepas mutantes (GR1-4) tuvieron un comportamiento similar a su cepa parental (Figura 23). Estos resultados sugieren que el residuo de serina 90 de la proteína NifH podría también tener funciones en el proceso de simbiosis fijadora de nitrógeno y que la mutante GR5 podría tener un excelente potencial tecnológico.

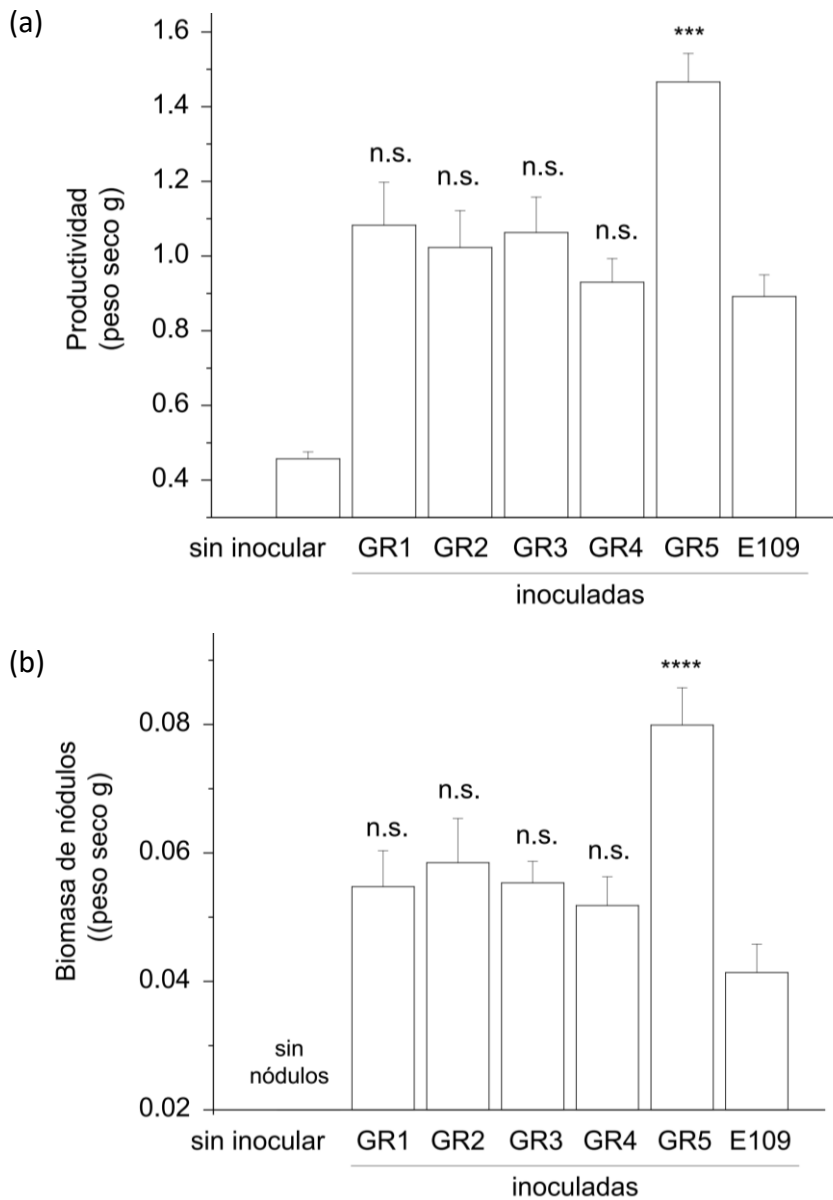


Figura 23. La leyenda de la figura se encuentra en la próxima página.

Figura 23. Efectos de la mutación S90A en la eficiencia de la promoción de crecimiento vegetal.

La productividad (a) y la biomasa de nódulos (b) de las plantas inoculadas con la cepa parental E109 y las mutantes GR1-GR5 fueron analizadas en ausencia de nitrógeno en el sustrato y sin la adición de glifosato. La cepa GR5 contiene la mutación S90A. Los valores son del promedio + SEM (n = 24). Las diferencias significativas entre los inoculantes fueron analizadas con ANOVA y test de Dunnett (n.s.: no significativa, ****p < 0.0001).

Para confirmar este potencial tecnológico, se realizaron ensayos en condiciones controladas y en condiciones agronómicas sin la utilización de glifosato, en donde se observó que las plantas de soja inoculadas con GR5 tuvieron incrementos del 21% y 8% en el contenido de nitrógeno de las hojas con respecto a las plantas inoculadas con la cepa parental E109 en cámara (Figura 24a) y en campo (Figura 24b), respectivamente.

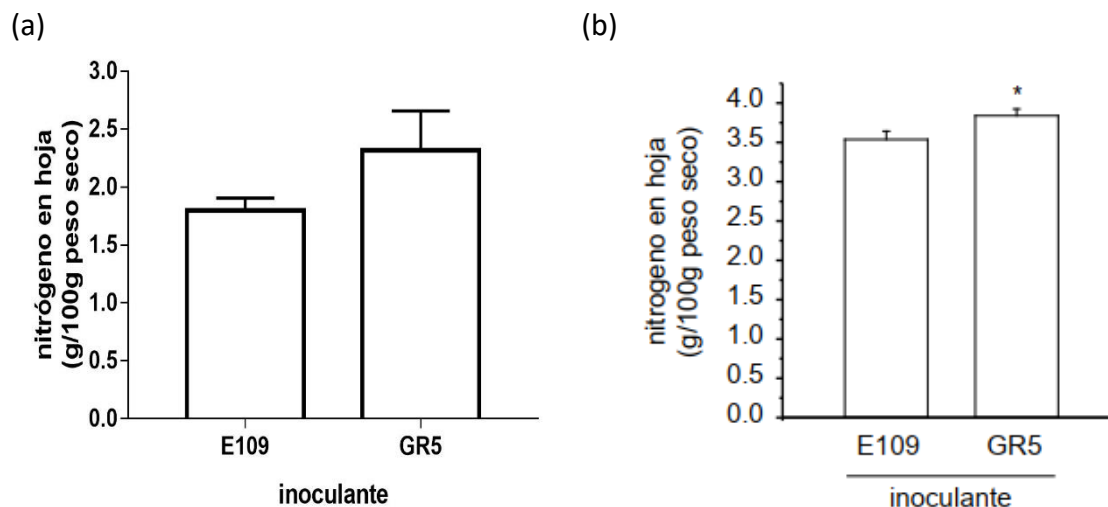


Figura 24. Contenido de nitrógeno foliar. En condiciones de cámara (a) y de campo (b) se observaron incrementos del contenido de nitrógeno en las hojas de plantas inoculadas con la cepa GR5 respecto a la cepa E109. (a) No se realizó estadística por tener un número bajo de réplicas. (b) Los valores representan el promedio + SEM (n=9); *p < 0,05; prueba t.

DISCUSIÓN

En la primera parte de este trabajo de tesis se llevó a cabo la caracterización de los mutantes espontáneos tolerantes a peróxido de hidrógeno, identificando un nuevo sistema anti-estrés y determinando su posible relación con la capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno en *B. japonicum*, particularmente de la cepa E109. La presencia de *clusters* de tolerancia a estrés oxidativo se han encontrado en otras especies bacterianas, en las cuales estos elementos se encuentran regulados y forman parte de la respuesta de adaptación a condiciones variables del ambiente [69], [97], [98], [99]. La cepa mutante *glxA* mostró una expresión de los genes catalasa y fosfatohidrolasa aumentada respecto a la cepa salvaje E109 y, además, mostró una actividad catalasa mayor cuando se sometió a las cepas a estrés por peróxido de hidrógeno. Al estimar la actividad fosfato hidrolasa mediante la aparición de mutantes espontáneas tolerantes a antibiótico, los resultados también dieron cuenta de una posible actividad aumentada de esta enzima antioxidante en la mutante *glxA*. Estos resultados sugieren la importancia del gen *glxA* en el control de la expresión de estos genes antioxidantes, independientemente de su mecanismo de acción. Probablemente no se trate de un simple regulador negativo, porque de ser así, las mutaciones esperadas en este gen que den tolerancia estrés oxidativo serían las típicas de pérdida de función como la aparición de mutaciones sin sentido, pequeños *indels* que corran el marco de lectura o mutaciones en la región promotora que reduzcan o inactiven la transcripción.

En numerosas cepas bacterianas se demostró que aquellas que tienen el gen de la catalasa sin represión, son más tolerantes al estrés por H_2O_2 [100], [101]. Además, lógicamente, la regulación al alza de la enzima catalasa mejora la resistencia de las bacterias frente a diversas concentraciones de H_2O_2 [102], mientras que la ausencia o disminución de la misma muestra una baja sobrevivencia por estrés oxidativo en tales cepas ya que resultan hipersensibles al peróxido de hidrógeno [101], [103]. Diversos análisis transcriptómicos de células de *Bradyrhizobium* estresadas con peróxido de hidrógeno mostraron que dos factores de función extracitoplasmática (ECF), los cuales serían los responsables controlar la transcripción de genes involucrados en la respuesta general estrés, se mostraron

inducidos: EcfQ y EcfF. Además, varios genes involucrados en la respuesta al estrés oxidativo se vieron regulados al alza, entre ellos el que codifica para la enzima catalasa ^[104]. También en *Rhizobium etli* la enzima catalasa se encuentra dentro de un regulón que compone el sistema de respuesta al estrés que dependen de los ECF ^[105]. En *E. coli* ambas catalasas son controladas por elementos activadores ubicados en regulones e inducidas en respuesta a la presencia de H₂O₂ externo. Por su parte, en algunas cepas de *Bradyrhizobium* se encontró un gen regulador de la catalasa (KatA) codificado en orientación opuesta ^[98], al igual que el gen GlxA mutado en nuestros clones tolerantes. También en *M. loti* y *S. meliloti* se encontraron elementos reguladores de la actividad catalasa, quienes actúan de similar manera que en *E. coli* ^[106]. *S. meliloti* además mostró que mutantes sin la acción del elemento regulador tuvieron mayor actividad catalasa que la cepa salvaje ^[98], lo cual nos indica que en algunos microorganismos, la enzima catalasa puede tener un regulador negativo de su transcripción. En *Corynebacterium glutamicum* el modificador de la transcripción muestra una actividad represora ^[102], lo cual fue comprobado en cepas mutantes que carecían del factor, las cuales fueron más tolerante al estrés por peróxido de hidrógeno por la desrepresión de la enzima catalasa ^{[101], [100]}. El factor de transcripción de *C. glutamicum* es una proteína con alta reactividad frente a la presencia de H₂O₂ y sufre cambios estructurales en presencia del compuesto. Cuando no hay presencia de H₂O₂ el factor se une a la región promotora de la catalasa e inhibe su transcripción, mientras que cuando sufre cambios en su estructura libera el sitio de unión, regulándose la enzima catalasa al alza y mejorando la resistencia de la bacteria frente a altas concentraciones de peróxido de hidrógeno ^[102]. En *C. glutamicum*, la enzima catalasa se encuentra codificada en un operón en sentido contrario al factor de transcripción, al igual que GlxA y CatA en nuestras mutantes tolerantes.

También pudimos vislumbrar que el *cluster* BjAC no habría sido heredado de forma vertical por las especies *B. japonicum* ya que no es una característica ancestral que comparte E109 con otras especies del género. La búsqueda de BjAC en genomas secuenciados demostró que se encuentra únicamente en un elemento móvil de *Sinorhizobium* sp. RAC02, sugiriendo que es un elemento transferible muy particular.

Además, BjAC se encuentra cercano a los genes *ffs*, los cuales son un target común de elementos móviles. Esto se condice con los datos encontrados para otras especies de rizobios, como *R. etli* por ejemplo, que contiene parte de los genes de respuesta al estrés codificados en el cromosoma, y parte en plásmidos. En particular la catalasa se encuentra codificada en forma plasmídica ^{[69], [107]} lo cual sugiere que el sistema antiestrés de una gran cantidad de cepas bacterianas es un elemento susceptible a ser transferido.

Respecto a los beneficios de la incorporación del *cluster* BjAC en cepas de ancestros comunes de las especies *B. japonicum*, pudimos observar que su presencia incrementó la habilidad de competencia de la cepa *B. diazoefficiens* USDA110 proveyéndole una capacidad de colonización similar a la de *B. japonicum* E109. Estos datos nos sugieren que, en situación de simbiosis, el *cluster* BjAC tiene un rol de gran importancia. Esto coincide con algunos estudios que han determinado que el sistema de respuesta a estrés es crucial para la generación efectiva de nódulos y la fijación de nitrógeno por parte de diversas especies de rizobios. Tanto en plantas de soja como de frijol, las mutantes defectuosas en la respuesta a estrés oxidativo mostraron estructuras nodulares aberrantes, además de una FBN retardada ^[69]. En simbiosis de alfalfa, el análisis de mutantes bacterianos deficientes en la acción de las enzimas superóxido dismutasa y catalasa mostró cómo la ausencia del sistema de desintoxicación impacta negativamente en la formación de nódulos e induce su senescencia prematura ^{[97], [108], [109]}. Además, la disfuncionalidad de la enzima catalasa en *S. meliloti* mostró una disminución en la capacidad de fijar nitrógeno debido a la mala diferenciación de los bacteroides ^[106]. Tanto estos estudios mencionados anteriormente como los resultados obtenidos en este trabajo sugieren la importancia del sistema antioxidante, y en particular de la enzima catalasa, en la interacción de los rizobios con su hospedero y en la consiguiente formación de los nódulos en las raíces y la fijación biológica de nitrógeno.

Al evaluar la competencia en la nodulación de las cepas E109 y los mutantes *glxA* y *StrR*, hallamos que la mayoría de los nódulos estuvo colonizado por la cepa mutante *glxA*. Estos resultados se encuentran en sintonía con la hipótesis de que la expresión diferencial de las enzimas antioxidantes es un rasgo importante para el rendimiento de la soja y

además son coherentes con los obtenidos por otros grupos de investigación, quienes realizaron coinoculaciones de cepas de rizobios salvajes conjuntamente con mutantes defectivas en el sistema de respuesta al estrés. En este caso, la cepa salvaje fue más competitiva y ocupó una mayor proporción de nódulos respecto a la mutante, demostrando la importancia del sistema anti-estrés de las células en la competitividad para ocupar nódulos ^[69].

Los ensayos de inoculación de plantas de soja en condiciones de cámara de cultivo mostraron diferencias significativas en la productividad de las plantas entre las cepas E109 y glxA pero no entre E109 y StrR. Esto demuestra que los mutantes glxA, resistentes al estrés oxidativo, tienen además de una mayor competitividad al nodular, una mayor eficiencia en la promoción del crecimiento de las plantas. Siguiendo esta línea, se ha determinado que genes relacionados a la fijación de nitrógeno muestran una mayor expresión en condiciones de estrés oxidativo ^[42], con lo cual las diferencias significativas que hemos encontrado entre la productividad de las plantas inoculadas con la cepa E109 y la mutante glxA, podrían deberse a esta expresión génica diferencial.

Como ya hemos declarado anteriormente, la deficiencia o ausencia del sistema de defensa frente al estrés en distintas cepas bacterianas afecta considerablemente la nodulación y la fijación de nitrógeno en las distintas plantas leguminosas ^{[97], [69], [108]}. Además, se ha visto que la falta de genes codificantes de enzimas encargadas de la descomposición de las especies reactivas del oxígeno afecta gravemente la capacidad de fijación de nitrógeno ^[97, 109]. El problema radica en que los rizobios con ausencia de estos genes, en particular de la catalasa, no tienen la capacidad de diferenciarse en bacteroides y por lo tanto no se establece la simbiosis ^[110]. Esta falta de habilidad para la diferenciación ha sido probada mediante análisis basados en microscopía los cuales revelaron que las células precisan de un sistema de respuesta al estrés funcional y activo en las etapas tempranas de la interacción bacteria-leguminosa, mientras que una vez que se diferenciaron en bacteroides el sistema se encuentra en un estado de funcionamiento basal ^{[69], [71]}.

En la segunda parte de este trabajo nos centramos en los diversos mecanismos de tolerancia al herbicida glifosato que mostraron las mutantes espontáneas obtenidas, determinando su capacidad de evitar la acción bacteriostática del compuesto y su influencia en la fijación de nitrógeno en plantas de soja. La mutante tolerante GR1 presenta una mutación sin sentido en el gen *gltL* que codifica para un transportador de glutamato, la cual generaría una inactivación del transporte llevada a cabo por esta proteína. La utilización de los transportadores de aminoácidos para el ingreso de diversas sustancias al interior celular es un mecanismo muy común en bacterias. Recientemente se ha reportado en *B. subtilis* la utilización efectiva de transportadores de glutamato y aspartato para el ingreso de glifosato al interior de las células ^[86], mientras que mutaciones de diversa índole (mutaciones puntuales o deleciones de más de 1000 pb) les confirieron a las células tolerancia a diversas concentraciones del herbicida. Además, la mutación en el transportador de glutamato también generó una alta tolerancia a glufosinato, un herbicida estructuralmente similar al glutamato y al glifosato ^{[86], [111]}, lo cual nos daría la pauta de que nuestra mutante GR1 también podría ser resistente a este herbicida de uso intensivo.

La transformación de la cepa parental E109 con el alelo mutante del gen *gltL* nos mostró un restablecimiento de la sensibilidad a glifosato por parte de la cepa salvaje, lo cual se encuentra en coincidencia con los resultados obtenidos al expresar de forma ectópica el gen de transporte del glutamato de *E. coli* en las cepas de *B. subtilis* tolerantes a glifosato ^[86]. Esta concomitancia en los resultados nos confirmaría que la mutación en particular genera una pérdida de función en E109 además de que ratificaría la utilización de los transportadores de aminoácidos para ingresar glifosato al interior celular. También se ha reportado que en tejidos epiteliales de mamíferos los transportadores de aminoácidos se encuentran involucrados en el transporte de glifosato ^[112]. En *E. coli* y *B. subtilis*, los transportadores de glutamato en estudio son de la familia del simportador dicarboxilato/aminoácido:cación (Na^+ o H^+) ^{[113], [114]}, por lo cual nos queda por determinar en un futuro a qué familia de transportadores pertenece GltL, cómo es su funcionamiento en particular y cuál sería la consecuencia fisiológica en *B. japonicum* E109 del cierre de este transportador, respecto a la entrada y utilización del glutamato.

La enzima adenilato ciclasa se encuentra asociada a una gran cantidad de vías de señalización celular, modulando las mismas a través del mensajero AMP cíclico (cAMP). En muchos sistemas bacterianos el cAMP es un regulador importante de la utilización de fuentes de carbono, la movilidad de las bacterias y la generación de energía ^{[115], [116]}. En *E. coli* y *S. typhimurium*, el cAMP se encuentra involucrado en la regulación del transporte y tolerancia a antibióticos ^{[117], [118]}, análogos de fuentes de carbono y aminoácidos ^[117], el control de canales, la biosíntesis de aminoácidos y la resistencia a diversos factores de estrés ^[119]. En cepas del género *Bradyrhizobium* se ha detectado que el cAMP se encuentra involucrado de forma relevante en la fijación biológica de nitrógeno ya que activa al complejo nitrogenasa y reprime a las enzimas encargadas de la asimilación del amonio ^{[120], [121], [116]}.

Respecto a la tolerancia a antibióticos, se demostró que células tanto de *E. coli* como de *R. meliloti* con mutaciones en el gen *cya*, manifiestan tolerancia a antibióticos como la fosfomicina ^[117]. En *E. coli* está bien dilucidado el sistema por el cual los antibióticos fosfomicina y fosfomicidina ingresan a la célula, y se ha confirmado que la utilización de estos canales depende de la acción del cAMP ^[122]. Además, en esta misma especie bacteriana, el factor de transcripción *hipB* tiene un rol importante en la tolerancia de las células a antibióticos ^[87]. Podemos notar entonces que la enzima adenilato ciclasa y su producto, el cAMP, están ampliamente descritos para diversas cepas bacterianas y para diversas funciones, pero aún no se han encontrado reportes para el género *Bradyrhizobium* en relación a la tolerancia a diversos factores de estrés, entre ellos la presencia de herbicidas. Los trabajos anteriormente citados dan cuenta que resulta altamente probable que la mutación CxT en la región promotora de *cya* permite la unión del factor inhibidor de la transcripción HipB, con lo cual, la enzima adenilato ciclasa no estaría activa y se generaría menor energía lo cual impediría el ingreso del glifosato al interior celular por medio de alguno de los diversos canales de transporte que se encontrarían regulados por cAMP. Además, como ya se describió en este trabajo, el glifosato tiene la propiedad de ingresar por medio de diversos transportadores al interior celular. Sería muy probable que haya una relación entre la función del transportador de glutamato GltL y la adenilato ciclasa Cya y las

mutaciones que presentan nuestros clones GR1 y GR2, respectivamente. Queda por analizar esta correspondencia, aunque estudios anteriores han demostrado que diversos transportadores de aminoácidos se encuentran bajo el control de cAMP ^[117].

El zinc es parte del grupo de los micronutrientes necesarios para todas las células ya que se encuentra y es utilizado por proteínas y enzimas con diferentes funciones celulares. La superóxido dismutasa, que funciona como parte de la defensa de las bacterias frente al estrés oxidativo, es una de ellas ^{[123], [124], [125]}. Grandes concentraciones de zinc pueden ser nocivas para la supervivencia de los microorganismos y por lo tanto, las bacterias deben controlar la concentración de este metal logrando una homeostasis perfecta del mismo ^[126]. Algunos microorganismos, como *E. coli* por ejemplo, tienen transportadores del tipo ABC con alta afinidad por el zinc, los cuales son utilizados para mantener el equilibrio del mismo ^[127], mientras que otros como *Acinetobacter baumannii* usan diversos aminoácidos libres para generar los pools de Zn dejándolo disponible de manera sencilla para cuando sea necesario ^[88]. Como muchos metales, el zinc puede formar complejos de coordinación con diversas moléculas, entre ellas el glifosato quien tiene un gran poder como agente quelante generando de esta manera, una gran baja en su disponibilidad y utilización ^{[128], [90]}. Los complejos de coordinación formados entre el glifosato y el zinc son muy estables ^{[129], [130]}, y se ha planteado que el uso del glifosato no solo afecta la disponibilidad del mismo en el entorno extracelular, sino que también puede eliminarlo del interior celular ^[90]. Además, se determinó que el aumento de la concentración de glifosato se correlaciona con, además del agotamiento de zinc, un aumento de la generación de ROS, por no estar activas diversas enzimas antioxidantes que necesitan al metal para su funcionamiento ^[90].

En diversas cepas bacterianas ^{[88], [131]}, la depleción de la concentración de zinc induce la expresión de genes como *zigA* (metalchaperona de unión a Zn), *hutH* (que codifica para un sistema de utilización de histidina) y *zur* (*Zinc uptake repressor*), permitiendo la utilización del metal que estaba almacenado en la célula. En particular en *A. baumannii*, *ZigA* es necesaria para el crecimiento del microorganismo en condiciones limitantes de Zn. Cuando esto sucede la enzima se une al metal y exhibe su actividad GTPasa y permite la degradación de los complejos His-Zn, liberando al metal y dejando que pueda ser utilizado

por las demás enzimas del metabolismo celular. Por esto, en este microorganismo, *zigA* es fundamental para su sobrevivencia en condiciones de baja disponibilidad de zinc. En *E. coli* y *Salmonella entérica* existen análogos a ZigA que también son requeridas para el crecimiento de la bacteria en estas condiciones de inanición de Zn ^{[132], [133], [91]}. Actualmente, se desconoce la función de ZigA en los microorganismos rizosféricos, pero podemos hipotetizar respecto a que su función en *B. japonicum* sería similar que en *A. baumannii* ^[88] y *B. subtilis* ^[131]: dejar disponible al metal cuando se encuentra en bajas concentraciones para que pueda ser utilizado por las enzimas que así lo requieran. Todo lo expuesto anteriormente, y en conjunto con nuestros resultados, indican que la mutación en el gen *zigA* de E109 genera que la enzima se encuentre activa gran cantidad de tiempo, manteniendo al metal en las concentraciones necesarias para la sobrevivencia del microorganismo cuando se encuentra frente a estrés por glifosato. Esto sería llevado a cabo por medio del catabolismo de la histidina, coincidiendo además con los resultados obtenidos por Newman ^[89] los cuales demuestran una expresión diferencial al alza de genes relacionados al metabolismo de proteínas y aminoácidos frente a la aplicación de glifosato en rizobios.

Bajo este contexto y teniendo en cuenta la acción bacteriostática del glifosato sobre los microorganismos, esto se condice con las intenciones de diversos grupos de establecer al catabolismo de la histidina y a la acción de ZigA como candidatos para el desarrollo de antimicrobianos ^[88]. La mutación en el gen *zigA* del clon GR3 estaría impidiendo la muerte de las células bacterianas al mantener al alza la actividad de la proteína, permitiendo la movilización y la utilización de zinc por parte de las enzimas y vías metabólicas que así lo requieran, evitando que la aplicación del herbicida afecte la supervivencia de la cepa derivada de E109. Queda pendiente para un futuro determinar cuál es la vía específica en el que esta acción se lleva a cabo.

Las bacterias que han sufrido la acción del glifosato y otros herbicidas pueden sufrir estrés osmótico, oxidativo y ácido inducido para las altas concentraciones de estos compuestos ^{[134], [135], [136], [137]}. Por lo tanto, la generación de osmoprotectores bajo estas condiciones de vida son de gran utilidad para el microorganismo ya que pueden funcionar

como osmoreguladores y estabilizadores de la estructura proteica y de los mecanismos de desintoxicación celular además de mantener un volumen celular apropiado y proteger las macromoléculas intracelulares [137], [138]. Estas moléculas pueden acumularse en concentraciones milimolares en microorganismos estresados ya sea a través de la absorción desde el medio ambiente o por síntesis de novo [69]. Esta acumulación se genera en respuesta a la pérdida de la osmorregulación y otros efectos de los factores de estrés que pueden generar la muerte de la célula [139]. En cepas del género *Bradyrhizobium* se ha determinado que para superar las condiciones de estrés se sintetizan diversos osmoprotectores para mejorar la competitividad de la colonización de raíces [69], y en otros rizobios la presencia de compuestos relacionados a la betaína juegan un rol principal en la regulación del estrés [140]. Se ha reportado una expresión diferencial al alza del homólogo de *betA* en diversos microorganismos del suelo luego de la exposición a glifosato [89], [134] y también en *S. entérica* se vio un aumento de la expresión de genes responsables de la síntesis de osmoprotectores luego de la aplicación del herbicida en cuestión [91]. BetA es una de las enzimas encargadas de generar el protector glicin betaína [141], [30] mediante la oxidación de colina. La betaína es un osmoprotector que contribuye al ajuste de la turgencia celular frente al estrés y la expresión de los genes responsables de su producción se encuentran regulados, en mayor medida, por las condiciones de crecimiento de los microorganismos [141]. En cianobacterias se ha determinado que la acumulación de osmoprotectores durante condiciones de estrés generadas por diversos herbicidas podría ser útil en la degradación del compuesto y para hacer frente a las condiciones adversas del ambiente [135], [137]. Por lo tanto, con estos resultados y observando la mutación que presenta el mutante GR4 en el gen *betA*, podemos conjeturar que esta proteína se encontraría con su actividad al alza generándose tolerancia al herbicida probablemente por la producción y acumulación del osmoprotector en cuestión o por la degradación del glifosato. Considerando los trabajos previos que describen la función de ZigA y BetA y nuestros resultados, podríamos suponer que las mutaciones encontradas modifican el metabolismo del glifosato y la respuesta de las células frente al mismo.

Las mutantes tolerantes a glifosato que se obtuvieron presentan mutaciones en diversos genes, pero ninguna de ellas en el gen *aroA* que codifica para la enzima EPSP sintasa. Cabe destacar que hasta la fecha diversos estudios han demostrado que gran variedad de bacterias y otros organismos se vuelven resistentes al glifosato al acumular mutaciones en el gen de la EPSP sintasa, al regular al alza la expresión del mismo debido a una mutación del promotor o a su amplificación selectiva ^[48], contrastando con los resultados que hemos obtenido. En *Bacillus subtilis* se ha determinado que la enzima EPSP sintasa no permite cambios que incrementen la tolerancia a glifosato ^[86] porque cualquier modificación en su secuencia aminoacídica podría perjudicar la supervivencia de la bacteria ya que se trata de una enzima esencial para la misma. En esta cepa, todas las mutaciones que se han conseguido por presión de selección han sido en genes relacionados al transporte del herbicida al interior celular ^[86] inactivando, por ejemplo, el gen que codifica para los simportadores de glutamato y aspartato. En *E. coli* la estrategia para evitar la acción del glifosato, es totalmente la opuesta ^[86], ya que presenta gran número de cambios en el gen de la EPSP sintasa. Esta diferencia en las tácticas para evitar el efecto bacteriostático del glifosato podrían estar relacionadas con que los genes bacterianos que resultan esenciales para la supervivencia de las células se encuentran más conservados que los genes no esenciales y permiten una cantidad muy baja de mutaciones en sus secuencias ^[142]. Por lo tanto, el gen de la EPSP sintasa en *B. japonicum* y *B. subtilis* probablemente sea un gen esencial y es por este motivo que no permite la acumulación de mutaciones. Además, se ha demostrado que las bacterias entéricas, como *E. coli*, contienen múltiples transportadores de glutamato lo cuales probablemente también transporten glifosato. Esta información permite inferir entonces que las enterobacterias inactivan la EPSP sintasa porque es muy baja la probabilidad de que se inactive más de un gen en el crecimiento bajo la presión de selección de un compuesto determinado ^{[86], [143]}. Al contrario, *B. japonicum* y *B. subtilis* contarían únicamente con un transportador de este aminoácido, con lo cual sería más factible inactivarlo. Con estas bases, nos queda como investigación a futuro determinar si nuestra cepa parental E109 presenta uno o más transportadores de glutamato, además de determinar cuán esencial es el gen de EPSP sintasa para su supervivencia. Por otro lado, se ha

detectado que diversas poblaciones bacterianas pueden acumular mutaciones beneficiosas espontáneamente por la presencia del herbicida en su hábitat natural, proporcionando a las células una ventaja de crecimiento selectivo, demostrando que la selección de la técnica de obtención de mutantes tolerantes es acertada ^[144]. La variedad de mecanismos de tolerancia a glifosato demuestra la habilidad de las bacterias de adaptarse a sustancias antropogénicas mediante la alteración de su genoma.

Los resultados obtenidos para la cepa tolerante a glifosato GR5 demuestran que es capaz de tener una velocidad de crecimiento más alta que el resto de las mutantes y la cepa parental E109 y también una actividad citrato sintasa significativamente mayor. Estos resultados se condicen con los publicados para *Rhizobium tropici*, ya que demuestran que la presencia de la enzima citrato sintasa le confirió una mayor habilidad de nodulación al microorganismo, respecto a la cepa control sin la enzima ^[145]. Además, la cepa con la enzima activa mostró una velocidad de crecimiento mayor.

La fijación biológica de nitrógeno se lleva a cabo en condiciones de baja concentración de oxígeno, ya que el complejo nitrogenasa es sensible al mismo. Además, es una reacción que consume gran cantidad de energía en forma de ATP y, por lo tanto, la mutación S90A podría verse involucrada en un sistema de protección respiratoria de la nitrogenasa, motivo por el cual la mutante GR5 presenta una mayor actividad citrato sintasa pero también muestra una gran capacidad de fijación de nitrógeno. Se ha descrito que *Azotobacter vinelandii* posee una mayor capacidad para fijar nitrógeno que otros diazotrofos ya que puede realizarlo en presencia de altas concentraciones de oxígeno, protegiendo a la nitrogenasa de la inactivación por diversos mecanismos. Una de las maneras es, justamente, manteniendo tasas de respiración lo suficientemente altas como para mantener el oxígeno en concentraciones no inhibitorias ^[146]. En esta bacteria la cadena respiratoria se ramifica en dos caminos desde el grupo de quinonas y la oxidación de NADH está mediada por dos NADH:quinona oxidoreductasas distintas. Una de ellas resulta esencial para la protección respiratoria y es dominante en las células diazotróficas o en aquellas que se encuentran en altas concentraciones de oxígeno ^{[146], [147]}. La presencia de una segunda enzima NADH oxidasa es una característica común en las bacterias ^[147] y lleva

a cabo la oxidación de NADH sin translocar protones a través de la membrana, desvinculando así el consumo de oxígeno de la generación de ATP ^[148]. De esta forma, se genera la cantidad de energía necesaria para llevar a cabo la reducción del nitrógeno molecular y el ATP que no es utilizado, se utiliza para el crecimiento de las células obteniéndose una acumulación de biomasa bacteriana ^[148]. Las características del clon GR5 sienta un precedente a tener en cuenta para futuras selecciones de rizobios con tolerancia a estrés y a su vez, una elevada capacidad de fijación biológica de nitrógeno.

Diversos estudios demostraron que luego de sufrir estrés por glifosato, los microorganismos del suelo mostraron que varios genes relacionados a la respiración tuvieron una expresión significativamente más alta ^[89], además de tener una actividad respiratoria mayor ^{[149], [150]}. Pero estos estudios también concluyen que la acción del glifosato sobre la respiración microbiana depende de diversos factores, entre ellos el pH del suelo, su composición orgánica y la concentración de herbicida que se aplicó, entre otras ^{[150], [149], [151]}. Por lo tanto, es esperable que la mutante GR5 pueda mantener estas características de velocidad de crecimiento y respiración aumentadas cuando se la someta a estrés por presencia de glifosato.

Respecto a las emisiones de óxido nitroso, los resultados emitidos por la cepa complementada con el cósmido pYC7 coinciden con los obtenidos por Akiyama y colaboradores ^{[64], [152]} al evaluar las emisiones de óxido nitroso en sistemas de inoculación utilizando cepas mutantes y cepas autóctonas *nosZ* positivas (*nosZ*⁺). En este caso, las cepas mutantes fueron sobreexpresantes de la enzima *nosZ* las cuales fueron obtenidas mediante una técnica de corrección deficiente ^[64]. Queda en claro entonces que la utilización de inoculantes conformados por cepas que expresen la enzima óxido nitroso reductasa es una opción viable para mitigar la emisión del gas. Respecto a la cepa GR5, que mostró una disminución significativa de las emisiones de N₂O respecto a la cepa E109 en los ensayos de microcosmos, no se han encontrado trabajos en los cuales se perciba una situación similar. Podemos suponer que, al tener una elevada respiración aeróbica, la respiración anaeróbica se encuentra disminuida por este motivo por lo cual la generación y emisión de N₂O es menor. Pero a su vez se debe tener en cuenta que la actividad nitrogenasa también se

encuentra regulada por la presencia de nitrato, y que el proceso de desnitrificación cumple una función protectora del sistema de fijación de nitrógeno en los rizobios ^[153]. Se ha reportado en diversas ocasiones que la presencia de nitrato en el nódulo generó una disminución de la eficiencia de la fijación de nitrógeno ^{[153], [154], [155]} con lo cual se sugiere que ambos procesos que son antagónicos en el ciclo del nitrógeno, tienen funciones complementarias ^[153]. Por lo tanto, si la baja emisión de N₂O se debiera a una inhibición de la desnitrificación, como sucede en algunas cepas de *S. meliloti* ^[156], resulta de gran relevancia determinar la relación entre la mutación S90A en NifH de la mutante GR5, los cambios metabólicos en la célula y su tolerancia al glifosato, quedando pendientes para ser realizados en trabajos futuros.

Respecto a los resultados observados respecto a la conservación de la zona del genoma donde se encuentra la mutación S90A del clon GR5, y su posible relación con la fosforilación de este residuo en *Z. mobilis*, se ha descrito que el complejo nitrogenasa se encuentra regulado por diversos mecanismos, por ejemplo, es inhibida tanto por altas concentraciones de oxígeno como por la de nitratos ^[153]. También es regulada por el factor NifA, un regulador que controla la expresión de varios genes relacionados con la fijación del nitrógeno ^{[157], [158]}. Por otro lado, se ha descrito que para adaptarse a diferentes condiciones de estrés, los rizobios han desarrollado diversas estrategias entre las cuales se encuentran las modificaciones postraduccionales de proteínas, involucradas en diversas vías de transducción de señales ^[159]. Estas modificaciones postraduccionales afectan la estructura, actividad, carga superficial y estabilidad de las proteínas lo cual influye en la interacción con otras moléculas ^[160]. Para evitar la fijación improductiva de nitrógeno, por ejemplo, en algunas bacterias fijadoras de nitrógeno el complejo enzimático se inactiva de forma reversible mediante la ribosilación de ADP de una de las proteínas que lo conforman ^[161]. Por otro lado, la fosforilación es una de las modificaciones más identificadas, principalmente en residuos de serina, tirosina y treonina. La mayoría de ellas se observan en enzimas implicadas en procesos metabólicos, la interacción con las leguminosas y la fijación de nitrógeno, entre otros ^{[93], [162]}. A pesar de esto, la función regulatoria de la fosforilación de proteínas en bacterias aún se mantiene sin dilucidar y queda por determinar

el posible rol del sitio S90A en la modulación del metabolismo de *B. japonicum*. Con nuestros resultados y los comentados anteriormente, podemos inferir que la mutación observada en el gen *nifH* de la cepa mutante GR5 tiene una gran influencia en los procesos de fijación de nitrógeno y desnitrificación, lo cual conlleva a un aumento del nitrógeno total y de la productividad de las plantas inoculadas, mientras se observa un descenso de la generación de óxido nitroso por parte de las mismas. Además, la cepa GR5 reuniría los aspectos positivos de dos de las cepas de *Bradyrhizobium* que ensayaron Obando y colaboradores ^[63]: la buena productividad de *B. japonicum* E109 y la baja emisión de N₂O de *B. diazoefficiens* USDA110. En términos biotecnológicos, la cepa mutante GR5 no modificada genéticamente se podría aplicar para aumentar la producción, la seguridad ambiental y la calidad nutricional de las variedades de soja convencionales y tolerantes al glifosato.

Desde el comienzo de la ingeniería genética, se han probado métodos eficientes y confiables para diseñar diferentes características en una amplia gama de inoculantes. Sin embargo, hay cada vez más datos sobre los riesgos ecológicos y para la salud de la liberación masiva de microbios genéticamente modificados (GMM) en los agroecosistemas ^[26], lo cual limita los beneficios potenciales de los microorganismos modificados genéticamente en la agricultura. Esta limitación afecta incluso a países con un marco regulatorio amigable para estudiar y comercializar GMM (como EE. UU. y Argentina), que normalmente exportan granos y semillas peletizadas a otros países donde existe un consenso sobre los graves riesgos de liberación de GMM. Por lo tanto, la comprensión y la ingeniería de interacciones benéficas entre las plantas y los microorganismos, mediante la producción y el uso de mutantes espontáneos, como las cepas glxA y GR descritas en este trabajo, podría ser una estrategia atractiva para mejorar los inoculantes disponibles en todo el mundo.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos con las mutantes espontáneas tolerantes a peróxido de hidrógeno nos demuestran que GlxA es probablemente un regulador transcripcional de los genes catalasa (*catA*) y fosfatohidrolasa (*yfbR*) y que estos tres genes se encuentran conformando un *cluster* de detoxificación frente a compuestos oxidativos. Las mutaciones observadas en el gen *glxA* revierten la inhibición de la expresión de estos genes, con lo cual se ve incrementadas la actividad de ambas enzimas. Además, hemos podido demostrar que estas mutaciones en el *cluster* incrementan la colonización de raíces de soja por parte de *B. japonicum*, benefician la formación de nódulos y contribuyen al proceso de fijación biológica de nitrógeno. Es decir, la mutación del gen *glxA* es un rasgo importante para el rendimiento de la producción de soja y el *cluster* sería un factor muy importante de la simbiosis. Estas mutaciones podrían mejorar la competitividad del inoculante respecto a los rizobios nativos del suelo, lo cuales normalmente presentan una alta capacidad de colonización, pero una baja eficiencia al fijar nitrógeno. Por otra parte, pudimos determinar que el *cluster* BjAC no fue heredado por transferencia vertical y que surgió en un ancestro de la especie *B. japonicum* de manera posterior a su divergencia del linaje de *B. diazoefficiens*. Por lo tanto, su adquisición podría explicar la eficiencia de colonización diferencial entre el inoculante E109 y la cepa modelo USDA110. Esperamos, además, que estas mutaciones en GlxA le confieran a *B. japonicum* E109 tolerancia a otros factores de estrés abiótico, como sequía y salinidad, que afectan a grandes proporciones de territorio utilizado para la agricultura, tanto en nuestro país como en el mundo.

Respecto a los resultados de tolerancia a glifosato, pudimos identificar distintos genes implicados en la tolerancia a este herbicida en rizobios los cuales estarían relacionados con la incorporación y degradación del compuesto. Sorprendentemente, ninguna de las mutantes espontáneas obtenidas mostró mutaciones en el gen *aroA* que es el encargado de codificar la EPSP sintasa, la enzima blanco del glifosato. Estas distintas mutaciones le proveen al rizobio tolerancia al herbicida tanto en condiciones in vitro como in planta.

La mutación S90A presente en la subunidad NifH del complejo nitrogenasa, en la cepa mutante GR5, generaría tolerancia al glifosato de forma indirecta mediante el incremento de la respiración aeróbica e inhibiendo el efecto bacteriostático que ejerce el herbicida sobre las células. Además, la mutación en *nifH* incrementaría el contenido de nitrógeno total en hojas y reduciría la emisión de óxido nitroso por parte de *B. japonicum*, lo cual delata una excelente capacidad de llevar a cabo la fijación biológica de nitrógeno y una huella ambiental menor respecto a la emisión de gases de efecto invernadero.

Nuestros resultados demuestran que sería muy promisorio generar rizobios mejorados en su capacidad de colonización de raíces de soja, con una mejor tolerancia al herbicida glifosato y que, además, mejoren la calidad ambiental y nutricional del cultivo de soja, sin utilizar procedimientos de ingeniería genética. Destacamos también que la comprensión y la ingeniería de las interacciones benéficas entre las plantas y los microorganismos, mediante la producción y el uso de mutantes espontáneos como las cepas glxA y GR, podría ser una estrategia atractiva para mejorar los inoculantes disponibles actualmente. La generación de mutantes por ingeniería genética podría ser una estrategia efectiva para mejorar la performance de los rizobios, pero ésta implica más tiempo de trabajo, costos mayores y gran habilidad técnica. Además, estas cepas GMM deben ser aceptadas por las instituciones públicas de acuerdo a las reglamentaciones de cada país, conjuntamente de la aceptación por parte de los agricultores y las comunidades.

Es de público conocimiento que la producción de los cultivos debe aumentar en gran porcentaje en los años venideros para poder satisfacer la demanda mundial de alimentos. Por lo tanto, es muy probable que se requiera aumentar también los aportes de nitrógeno y otros nutrientes, con la posible consecuencia de generar un aumento del N₂O por parte de la agricultura. Es por esto que consideramos que nuestras cepas obtenidas de forma espontánea, especialmente glxA y GR5, podrían colaborar con las futuras necesidades alimenticias y ecológicas de la población ya que son tolerantes a factores de estrés cada vez más comunes en los suelos, además de promover el crecimiento vegetal de una manera notable y ser amigables con el medio ambiente.

Como perspectivas a futuro planteamos determinar la capacidad de colonización y de fijación biológica de nitrógeno de las mutantes obtenidas en condiciones de campo, además de someterlas a diversos tipos de estrés en estas condiciones, incluida la aplicación del herbicida glifosato. También pretendemos determinar la cantidad de proteína en semillas de soja cosechadas de estos ensayos en condiciones de campo. Asimismo, nos restaría transferir las mutaciones evaluadas en *Bradyrhizobium japonicum* E109 a otras cepas de rizobios utilizadas como inoculantes en diversos cultivos y lugares del mundo, a través de la colaboración con diferentes grupos de trabajo, además de intentar dilucidar las vías implicadas en la tolerancia a herbicida en nuestras mutantes espontáneas.

REFERENCIAS

1. Noodén, L.D. and J.J. Guiamét, *Regulation of assimilation and senescence by the fruit in monocarpic plants*. *Physiologia Plantarum*, 1989. **77**(2): p. 267-274.
2. INOUE, J., S. SHANMUGASUNDARAM, and T. MASUYAMA, *Effects of temperature and daylength on the flowering of some photo-insensitive soybean varieties*. *Japanese Journal of Tropical Agriculture*, 1979. **22**(4): p. 167-171.
3. Hanway, J. and H. Thompson, *How a soybean plant develops*. 1967.
4. Meade, B., et al., *Corn and soybean production costs and export competitiveness in Argentina, Brazil, and the United States*. USDA Economic Information Bulletin, 2016. **154**.
5. Sinclair, T. and C. De Wit, *Comparative analysis of photosynthate and nitrogen requirements in the production of seeds by various crops*. *Science*, 1975. **189**: p. 565-567.
6. Graham, P.H. and C.P. Vance, *Legumes: importance and constraints to greater use*. *Plant Physiol*, 2003. **131**(3): p. 872-7.
7. Oldroyd, G.E., et al., *The rules of engagement in the legume-rhizobial symbiosis*. *Annu Rev Genet*, 2011. **45**: p. 119-44.
8. Olivares, J., E.J. Bedmar, and J. Sanjuán, *Biological nitrogen fixation in the context of global change*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2013. **26**(5): p. 486-94.
9. Venkateshwaran, M., *Exploring the Feasibility of Transferring Nitrogen Fixation to Cereal Crops*. 2014. p. 403-410.
10. Jensen, E.S., et al., *Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review*. *Agronomy for Sustainable Development*, 2012. **32**(2): p. 329-364.
11. Pan, H. and D. Wang, *Nodule cysteine-rich peptides maintain a working balance during nitrogen-fixing symbiosis*. *Nat Plants*, 2017. **3**(5): p. 17048.
12. Lopes, A.R., et al., *Relationships among bulk soil physicochemical, biochemical, and microbiological parameters in an organic alfalfa-rice rotation system*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015. **22**(15): p. 11690-9.
13. Leggett, M., et al., *Soybean Response to Inoculation with *Bradyrhizobium japonicum* in the United States and Argentina*. *Agronomy Journal*, 2017. **109**(3): p. 1031-1038.
14. Bender, S.F., C. Wagg, and M.G. van der Heijden, *An underground revolution: biodiversity and soil ecological engineering for agricultural sustainability*. *Trends in ecology & evolution*, 2016. **31**(6): p. 440-452.
15. Vitousek, P.M., et al., *Biological nitrogen fixation: rates, patterns and ecological controls in terrestrial ecosystems*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2013. **368**(1621): p. 20130119.
16. Oldroyd, G.E. and J.A. Downie, *Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes*. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2008. **59**: p. 519-546.
17. Oldroyd, G.E. and J.A. Downie, *Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes*. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2004. **5**(7): p. 566-576.
18. Murray, J.D., *Invasion by invitation: rhizobial infection in legumes*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011. **24**(6): p. 631-639.
19. Fournier, J., et al., *Mechanism of infection thread elongation in root hairs of *Medicago truncatula* and dynamic interplay with associated rhizobial colonization*. *Plant physiology*, 2008. **148**(4): p. 1985-1995.
20. Sprent, J.I., *Legume nodulation: a global perspective*. 2009.

21. S Hunt, a. and D.B. Layzell, *Gas Exchange of Legume Nodules and the Regulation of Nitrogenase Activity*. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 1993. **44**(1): p. 483-511.
22. Kim, J. and D.C. Rees, *Nitrogenase and biological nitrogen fixation*. Biochemistry, 1994. **33**(2): p. 389-397.
23. Einsle, O. and D.C. Rees, *Structural enzymology of nitrogenase enzymes*. Chemical reviews, 2020. **120**(12): p. 4969-5004.
24. Zehr, J.P. and P.J. Turner, *Nitrogen fixation: Nitrogenase genes and gene expression*, in *Methods in Microbiology*. 2001, Academic Press. p. 271-286.
25. Santos, M.S., M.A. Nogueira, and M. Hungria, *Microbial inoculants: reviewing the past, discussing the present and previewing an outstanding future for the use of beneficial bacteria in agriculture*. AMB Express, 2019. **9**(1): p. 205.
26. Brambilla, S., et al., *Synthetic multi-antibiotic resistant plasmids in plant-associated bacteria from agricultural soils*. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2020. **22**: p. 113-116.
27. Jozefkowicz, C., et al., *Microevolution Rather than Large Genome Divergence Determines the Effectiveness of Legume-Rhizobia Symbiotic Interaction Under Field Conditions*. J Mol Evol, 2017. **85**(3-4): p. 79-83.
28. Siqueira, A.F., et al., *Comparative genomics of Bradyrhizobium japonicum CPAC 15 and Bradyrhizobium diazoefficiens CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean*. BMC Genomics, 2014. **15**: p. 420.
29. Torres, D., et al., *Genome Sequence of Bradyrhizobium japonicum E109, One of the Most Agronomically Used Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Argentina*. Genome Announc, 2015. **3**(1).
30. Jozefkowicz, C., et al., *Stable symbiotic nitrogen fixation under water-deficit field conditions by a stress-tolerant alfalfa microsymbiont and its complete genome sequence*. Journal of Biotechnology, 2017. **263**: p. 52-54.
31. Mendes, I.C., M. Hungria, and M.A.T. Vargas, *Establishment of Bradyrhizobium japonicum and B. elkanii strains in a Brazilian Cerrado oxisol*. Biology and Fertility of Soils, 2004. **40**(1): p. 28-35.
32. Silva Batista, J.S., et al., *Variability in Bradyrhizobium japonicum and B. elkanii Seven Years after Introduction of both the Exotic Microsymbiont and the Soybean Host in a Cerrados Soil*. Microbial Ecology, 2007. **53**(2): p. 270-284.
33. Barros-Carvalho, G.A., et al., *Brazilian-adapted soybean Bradyrhizobium strains uncover IS elements with potential impact on biological nitrogen fixation*. FEMS Microbiol Lett, 2019. **366**(11).
34. Giller, K.E., D. Herridge, and J.I. Sprent, *The legume-rhizobia symbiosis and assessing the need to inoculate*. 2016, Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). p. 15-24.
35. Kaneko, T., et al., *Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium Bradyrhizobium japonicum USDA110*. DNA Res, 2002. **9**(6): p. 189-97.
36. Kaneko, T., et al., *Complete Genome Sequence of the Soybean Symbiont Bradyrhizobium japonicum Strain USDA6T*. Genes, 2011. **2**(4): p. 763-787.
37. Siqueira, A.F., et al., *Comparative genomics of Bradyrhizobium japonicum CPAC 15 and Bradyrhizobium diazoefficiens CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean*. BMC Genomics, 2014. **15**(1): p. 420.
38. Kaneko, T., et al., *Complete Genomic Sequence of Nitrogen-fixing Symbiotic Bacterium Bradyrhizobium japonicum USDA110*. DNA Research, 2002. **9**(6): p. 189-197.

39. Soto, M.J., J. Sanjuán, and J. Olivares, *Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons*. Microbiology (Reading), 2006. **152**(Pt 11): p. 3167-3174.
40. Tang, G., et al., *Sinorhizobium meliloti Glutathione Reductase Is Required for both Redox Homeostasis and Symbiosis*. Appl Environ Microbiol, 2018. **84**(3).
41. Hu, A., et al., *Rhizobium leguminosarum Glutathione Peroxidase Is Essential for Oxidative Stress Resistance and Efficient Nodulation*. Front Microbiol, 2021. **12**: p. 627562.
42. Jeon, J.M., et al., *Whole-genome expression profiling of Bradyrhizobium japonicum in response to hydrogen peroxide*. Mol Plant Microbe Interact, 2011. **24**(12): p. 1472-81.
43. Donati, A.J., et al., *Genome-wide transcriptional and physiological responses of Bradyrhizobium japonicum to paraquat-mediated oxidative stress*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(11): p. 3633-43.
44. Stępkowski, T., et al., *Phylogeny and Phylogeography of Rhizobial Symbionts Nodulating Legumes of the Tribe Genisteeae*. Genes (Basel), 2018. **9**(3).
45. Stritzler, M., et al., *Plant growth-promoting bacterium Pseudomonas fluorescens FR1 secretes a novel type of extracellular polyhydroxybutyrate polymerase involved in abiotic stress response in plants*. Biotechnology Letters, 2018. **40**(9): p. 1419-1423.
46. Heap, I. and S.O. Duke, *Overview of glyphosate-resistant weeds worldwide*. Pest Manag Sci, 2018. **74**(5): p. 1040-1049.
47. Fan, L., et al., *Glyphosate effects on symbiotic nitrogen fixation in glyphosate-resistant soybean*. Applied Soil Ecology, 2017. **121**: p. 11-19.
48. Hertel, R., et al., *Molecular mechanisms underlying glyphosate resistance in bacteria*. Environmental Microbiology, 2021. **23**(6): p. 2891-2905.
49. Studnik, H., et al., *Amino polyphosphonates—chemical features and practical uses, environmental durability and biodegradation*. New biotechnology, 2015. **32**(1): p. 1-6.
50. Kononova, S. and M. Nesmeyanova, *Phosphonates and their degradation by microorganisms*. Biochemistry (Moscow), 2002. **67**(2): p. 184-195.
51. Balthazor, T.M. and L.E. Hallas, *Glyphosate-degrading microorganisms from industrial activated sludge*. Applied and Environmental Microbiology, 1986. **51**(2): p. 432-434.
52. Lerbs, W., M. Stock, and B. Parthier, *Physiological aspects of glyphosate degradation in Alcaligenes spec. strain GL*. Archives of microbiology, 1990. **153**(2): p. 146-150.
53. Peñaloza-Vazquez, A., et al., *Cloning and sequencing of the genes involved in glyphosate utilization by Pseudomonas pseudomallei*. Applied and Environmental Microbiology, 1995. **61**(2): p. 538-543.
54. Pipke, R. and N. Amrhein, *Degradation of the phosphonate herbicide glyphosate by Arthrobacter atrocyaneus ATCC 13752*. Applied and Environmental Microbiology, 1988. **54**(5): p. 1293-1296.
55. Firdous, S., et al., *Identification and analysis of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) gene from glyphosate-resistant Ochrobactrum intermedium Sq20*. Pest Management Science, 2018. **74**(5): p. 1184-1196.
56. Huang, J., Z. Su, and Y. Xu, *The evolution of microbial phosphonate degradative pathways*. Journal of molecular evolution, 2005. **61**(5): p. 682-690.
57. Agarwal, V., et al., *Structural and mechanistic insights into CP bond hydrolysis by phosphonoacetate hydrolase*. Chemistry & biology, 2011. **18**(10): p. 1230-1240.
58. Villarreal-Chiu, J.F., J.P. Quinn, and J.W. McGrath, *The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment*. Frontiers in microbiology, 2012. **3**: p. 19.

59. Rahman, N. and P.J. Forrester, *Ammonium Fertilizer Reduces Nitrous Oxide Emission Compared to Nitrate Fertilizer While Yielding Equally in a Temperate Grassland*. Agriculture, 2021. **11**(11): p. 1141.
60. Mosier, A. and C. Kroeze, *Potential impact on the global atmospheric N₂O budget of the increased nitrogen input required to meet future global food demands*. Chemosphere - Global Change Science, 2000. **2**(3): p. 465-473.
61. Lassaletta, L., et al., *50 year trends in nitrogen use efficiency of world cropping systems: the relationship between yield and nitrogen input to cropland*. Environmental Research Letters, 2014. **9**(10): p. 105011.
62. Brambilla, S., et al., *Spontaneous Mutations in the Nitrate Reductase Gene *napC* Drive the Emergence of Eco-friendly Low-N₂O-Emitting Alfalfa Rhizobia in Regions with Different Climates*. Microb Ecol, 2020. **79**(4): p. 1044-1053.
63. Obando, M., et al., *Evaluation of nitrous oxide emission by soybean inoculated with Bradyrhizobium strains commonly used as inoculants in South America*. Plant and Soil, 2022. **472**: p. 1-18.
64. Akiyama, H., et al., *Mitigation of soil N₂O emission by inoculation with a mixed culture of indigenous Bradyrhizobium diazoefficiens*. Scientific Reports, 2016. **6**(1): p. 32869.
65. Obando, M., et al., *Analysis of the denitrification pathway and greenhouse gases emissions in Bradyrhizobium sp. strains used as biofertilizers in South America*. J Appl Microbiol, 2019. **127**(3): p. 739-749.
66. Ayub, N.D., et al., *A polyhydroxybutyrate-producing Pseudomonas sp. isolated from Antarctic environments with high stress resistance*. Curr Microbiol, 2004. **49**(3): p. 170-4.
67. Kovach, M.E., et al., *Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes*. Gene, 1995. **166**(1): p. 175-6.
68. Hattermann, D.R. and G. Stacey, *Efficient DNA transformation of Bradyrhizobium japonicum by electroporation*. Appl Environ Microbiol, 1990. **56**(4): p. 833-6.
69. Ledermann, R., et al., *A Functional General Stress Response of Bradyrhizobium diazoefficiens Is Required for Early Stages of Host Plant Infection*. Mol Plant Microbe Interact, 2018. **31**(5): p. 537-547.
70. Lee, H.-I., et al., *Effect of soybean coumestrol on Bradyrhizobium japonicum nodulation ability, biofilm formation, and transcriptional profile*. Applied and environmental microbiology, 2012. **78**(8): p. 2896-2903.
71. Ledermann, R., et al., *Stable Fluorescent and Enzymatic Tagging of Bradyrhizobium diazoefficiens to Analyze Host-Plant Infection and Colonization*. Mol Plant Microbe Interact, 2015. **28**(9): p. 959-67.
72. Setten, L., et al., *Engineering Pseudomonas protegens Pf-5 for nitrogen fixation and its application to improve plant growth under nitrogen-deficient conditions*. PLoS One, 2013. **8**(5): p. e63666.
73. Carrera, C.S., J.L. Dardanelli, and D.O. Soldini, *Genotypic and environmental variation in seed nutraceutical and industrial composition of non-transgenic soybean Glycine max genotypes*. Crop and Pasture Science, 2014. **65**(12): p. 1311-1322.
74. Marioli Nobile, C.G., et al., *Climatic Thresholds for Concentrations of Minerals and Heavy Metals in Argentinean Soybean*. Agronomy Journal, 2016. **108**(2): p. 532-539.
75. Setten, L., et al., *Engineering Pseudomonas protegens Pf-5 for Nitrogen Fixation and its Application to Improve Plant Growth under Nitrogen-Deficient Conditions*. PLOS ONE, 2013. **8**(5): p. e63666.

76. Jiménez-Leiva, A., et al., *Expanding the Regulon of the Bradyrhizobium diazoefficiens NnrR Transcription Factor: New Insights Into the Denitrification Pathway*. *Frontiers in Microbiology*, 2019. **10**(1926).
77. Kears, M., et al., *Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data*. *Bioinformatics*, 2012. **28**(12): p. 1647-1649.
78. Liebrecht, K., et al., *Whole-genome resequencing of spontaneous oxidative stress-resistant mutants reveals an antioxidant system of Bradyrhizobium japonicum involved in soybean colonization*. *Microbial Ecology*, 2021. **in press**.
79. Frare, R., et al., *Elimination of GlnKAmrB affects serine biosynthesis and improves growth and stress tolerance of Escherichia coli under nutrient-rich conditions*. *FEMS Microbiology Letters*, 2020. **367**(23).
80. Holloway, P., et al., *Identification and analysis of the dissimilatory nitrous oxide reduction genes, nosRZDFY, of Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol*, 1996. **178**(6): p. 1505-14.
81. Zamocky, M., et al., *Molecular evolution of hydrogen peroxide degrading enzymes*. *Arch Biochem Biophys*, 2012. **525**(2): p. 131-44.
82. Zimmerman, M.D., et al., *Structural insight into the mechanism of substrate specificity and catalytic activity of an HD-domain phosphohydrolase: the 5'-deoxyribonucleotidase YfbR from Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 2008. **378**(1): p. 215-26.
83. Fixen, K.R., et al., *Genome Sequences of Eight Bacterial Species Found in Coculture with the Haptophyte Chrysochromulina tobin*. *Genome Announc*, 2016. **4**(6).
84. Petassi, M.T., S.C. Hsieh, and J.E. Peters, *Guide RNA Categorization Enables Target Site Choice in Tn7-CRISPR-Cas Transposons*. *Cell*, 2020. **183**(7): p. 1757-1771 e18.
85. de Souza, R.S.C., J.S.L. Armanhi, and P. Arruda, *From Microbiome to Traits: Designing Synthetic Microbial Communities for Improved Crop Resiliency*. *Frontiers in Plant Science*, 2020. **11**(1179).
86. Wicke, D., et al., *Identification of the first glyphosate transporter by genomic adaptation*. *Environ Microbiol*, 2019. **21**(4): p. 1287-1305.
87. Lin, C.Y., et al., *Transcriptional repressor HipB regulates the multiple promoters in Escherichia coli*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2013. **23**(6): p. 440-7.
88. Nairn, B.L., et al., *The Response of Acinetobacter baumannii to Zinc Starvation*. *Cell Host Microbe*, 2016. **19**(6): p. 826-36.
89. Newman, M.M., et al., *Changes in rhizosphere bacterial gene expression following glyphosate treatment*. *Sci Total Environ*, 2016. **553**: p. 32-41.
90. Yahfoufi, Z.A., et al., *Glyphosate Induces Metaphase II Oocyte Deterioration and Embryo Damage by Zinc Depletion and Overproduction of Reactive Oxygen Species*. *Toxicology*, 2020. **439**: p. 152466.
91. Pöppe, J., et al., *Minimum Inhibitory Concentration of Glyphosate and a Glyphosate-Containing Herbicide in Salmonella enterica Isolates Originating from Different Time Periods, Hosts, and Serovars*. *Eur J Microbiol Immunol (Bp)*, 2019. **9**(2): p. 35-41.
92. Gonçalves, O.S., M.F. Rodrigues da Silva, and M. P.F., *Glyphosate-induced impact on the functional traits of the Bacillus sp. FC1 isolate*. *Pesqui Agropecu Trop* 2020. **50**: p. e57954.
93. Tatli, M., et al., *Genome Wide Phosphoproteome Analysis of Zymomonas mobilis Under Anaerobic, Aerobic, and N₂-Fixing Conditions*. *Frontiers in Microbiology*, 2019. **10**(1986).
94. Lobritz, M.A., et al., *Antibiotic efficacy is linked to bacterial cellular respiration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. **112**(27): p. 8173-80.

95. Ferramosca, A., et al., *Herbicides glyphosate and glufosinate ammonium negatively affect human sperm mitochondria respiration efficiency*. *Reproductive Toxicology*, 2021. **99**: p. 48-55.
96. Brambilla, S., et al., *Absence of the Nitrous Oxide Reductase Gene Cluster in Commercial Alfalfa Inoculants Is Probably Due to the Extensive Loss of Genes During Rhizobial Domestication*. *Microbial Ecology*, 2018. **76**(2): p. 299-302.
97. Syska, C., et al., *Molecular Weapons Contribute to Intracellular Rhizobia Accommodation Within Legume Host Cell*. *Frontiers in plant science*, 2019. **10**: p. 1496-1496.
98. Panek, H.R. and M.R. O'Brian, *KatG is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology*, 2004. **186**(23): p. 7874-7880.
99. Storz, G. and R. Hengge, *Bacterial stress responses*. 2010: American Society for Microbiology Press.
100. Teramoto, H., M. Inui, and H. Yukawa, *Oxy R acts as a transcriptional repressor of hydrogen peroxide-inducible antioxidant genes in Corynebacterium glutamicum R*. *The FEBS journal*, 2013. **280**(14): p. 3298-3312.
101. Milse, J., et al., *Transcriptional response of Corynebacterium glutamicum ATCC 13032 to hydrogen peroxide stress and characterization of the OxyR regulon*. *Journal of Biotechnology*, 2014. **190**: p. 40-54.
102. Pedre, B., et al., *Structural snapshots of OxyR reveal the peroxidatic mechanism of H₂O₂ sensing*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018. **115**(50): p. E11623-E11632.
103. Kim, J.-S. and R.K. Holmes, *Characterization of OxyR as a negative transcriptional regulator that represses catalase production in Corynebacterium diphtheriae*. *PLoS One*, 2012. **7**(3): p. e31709.
104. Masloboeva, N., et al., *Reactive oxygen species-inducible ECF σ factors of Bradyrhizobium japonicum*. 2012.
105. Meier, D., et al., *Gene regulation by extracytoplasmic function (ECF) σ factors in alpha-rhizobia*, in *Advances in Botanical Research*. 2020, Elsevier. p. 289-321.
106. Orikasa, Y., et al., *Enhancement of the nitrogen fixation efficiency of genetically-engineered Rhizobium with high catalase activity*. *Journal of bioscience and bioengineering*, 2010. **110**(4): p. 397-402.
107. Jans, A., et al., *Canonical and non-canonical EcfG sigma factors control the general stress response in Rhizobium etli*. *Microbiologyopen*, 2013. **2**(6): p. 976-987.
108. Santos, R., et al., *Oxidative burst in alfalfa-Sinorhizobium meliloti symbiotic interaction*. *Mol Plant Microbe Interact*, 2001. **14**(1): p. 86-9.
109. Santos, R., et al., *Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in Rhizobium-legume symbiosis*. *Molecular microbiology*, 2000. **38**(4): p. 750-759.
110. Jamet, A., et al., *Expression of the bacterial catalase genes during Sinorhizobium meliloti-Medicago sativa symbiosis and their crucial role during the infection process*. *Molecular plant-microbe interactions*, 2003. **16**(3): p. 217-225.
111. Fraser, A.R. and S.M. Ridley, *Kinetics for glutamine-synthetase inhibition by phosphinothricin and measurement of other enzyme activities in situ in isolated asparagus cells using a freeze-thaw technique*. *Planta*, 1984. **161**(5): p. 470-474.
112. Xu, J., et al., *The role of L-type amino acid transporters in the uptake of glyphosate across mammalian epithelial tissues*. *Chemosphere*, 2016. **145**: p. 487-494.
113. Slotboom, D.J., W.N. Konings, and J.S. Lolkema, *Structural features of the glutamate transporter family*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1999. **63**(2): p. 293-307.

114. Saier Jr, M.H., *A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters*. Microbiology and molecular biology reviews, 2000. **64**(2): p. 354-411.
115. Botsford, J.L., *Cyclic nucleotides in procaryotes*. Microbiological Reviews, 1981. **45**(4): p. 620-642.
116. Guerinot, M. and B.K. Chelm, *Isolation and expression of the Bradyrhizobium japonicum adenylate cyclase gene (cya) in Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 1984. **159**(3): p. 1068-1071.
117. Alper, M.D. and B.N. Ames, *Transport of antibiotics and metabolite analogs by systems under cyclic AMP control: positive selection of Salmonella typhimurium cya and crp mutants*. Journal of Bacteriology, 1978. **133**(1): p. 149-157.
118. Bianchini, G., et al., *Isolation of adenylate cyclase mutants from Rhizobium meliloti deficient in nodulation*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1993. **9**(2): p. 168-173.
119. Lory, S., et al., *The multi-talented bacterial adenylate cyclases*. International Journal of Medical Microbiology, 2004. **293**(7-8): p. 479-482.
120. Catanese, C.A., D. Emerich, and W. Zahler, *Adenylate cyclase and cyclic AMP phosphodiesterase in Bradyrhizobium japonicum bacteroids*. Journal of bacteriology, 1989. **171**(9): p. 4531-4536.
121. Corbin, D., G. Ditta, and D. Helinski, *Clustering of nitrogen fixation (nif) genes in Rhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology, 1982. **149**(1): p. 221-228.
122. Sakamoto, Y., et al., *Fosmidomycin resistance in adenylate cyclase deficient (cya) mutants of Escherichia coli*. Biosci Biotechnol Biochem, 2003. **67**(9): p. 2030-3.
123. Makarova, K.S., V.A. Ponomarev, and E.V. Koonin, *Two C or not two C: recurrent disruption of Zn-ribbons, gene duplication, lineage-specific gene loss, and horizontal gene transfer in evolution of bacterial ribosomal proteins*. Genome biology, 2001. **2**(9): p. 1-14.
124. Nanamiya, H., et al., *Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the Bacillus subtilis ribosome*. Molecular microbiology, 2004. **52**(1): p. 273-283.
125. Berducci, G., et al., *Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu, Zn superoxide dismutase*. FEBS letters, 2004. **569**(1-3): p. 289-292.
126. Hantke, K., *Bacterial zinc uptake and regulators*. Current opinion in microbiology, 2005. **8**(2): p. 196-202.
127. Patzer, S.I. and K. Hantke, *The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in Escherichia coli*. Molecular microbiology, 1998. **28**(6): p. 1199-1210.
128. Madsen, H.L., H. Christensen, and C. Gottlieb-Petersen, *Stability constants of copper (U), zinc, manganese (II), calcium, and magnesium complexes of N-(phosphonomethyl) glycine (glyphosate)*. Acta Chem. Scand. A, 1978. **32**(1).
129. Caetano, M.S., et al., *Understanding the inactivation process of organophosphorus herbicides: A DFT study of glyphosate metallic complexes with Zn²⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Co³⁺, Fe³⁺, Cr³⁺, and Al³⁺*. International Journal of Quantum Chemistry, 2012. **112**(15): p. 2752-2762.
130. Jayasumana, C., S. Gunatilake, and P. Senanayake, *Glyphosate, hard water and nephrotoxic metals: are they the culprits behind the epidemic of chronic kidney disease of unknown etiology in Sri Lanka?* International journal of environmental research and public health, 2014. **11**(2): p. 2125-2147.
131. Haas, C.E., et al., *A subset of the diverse COG0523 family of putative metal chaperones is linked to zinc homeostasis in all kingdoms of life*. BMC genomics, 2009. **10**(1): p. 1-21.
132. Blaby-Haas, C.E., et al., *YeiR: a metal-binding GTPase from Escherichia coli involved in metal homeostasis[†]*. Metallomics, 2012. **4**(5): p. 488-497.

133. Sydor, A.M., et al., *Metal Binding Properties of Escherichia coli YjiA, a Member of the Metal Homeostasis-Associated COG0523 Family of GTPases*. *Biochemistry*, 2013. **52**(10): p. 1788-1801.
134. Fei, Y.-Y., J.-Y. Gai, and T.-J. Zhao, *Identification of regulated genes conferring resistance to high concentrations of glyphosate in a new strain of Enterobacter*. *FEMS microbiology letters*, 2013. **349**(2): p. 135-143.
135. Kumar, S., K. Habib, and T. Fatma, *Endosulfan induced biochemical changes in nitrogen-fixing cyanobacteria*. *Science of the total environment*, 2008. **403**(1-3): p. 130-138.
136. Fatma, T., M. Khan, and M. Choudhary, *Impact of environmental pollution on cyanobacterial proline content*. *Journal of Applied Phycology*, 2007. **19**(6): p. 625-629.
137. Galhano, V., J. Gomes-Laranjo, and F. Peixoto, *Exposure of the cyanobacterium Nostoc muscorum from Portuguese rice fields to Molinate (Ordram®): Effects on the antioxidant system and fatty acid profile*. *Aquatic toxicology*, 2011. **101**(2): p. 367-376.
138. Karmakar, K., et al., *Legume-rhizobia symbiosis under stress*, in *Plant microbes symbiosis: applied facets*. 2015, Springer. p. 241-258.
139. Dietz, K.-J., *Redox-dependent regulation, redox control and oxidative damage in plant cells subjected to abiotic stress*, in *Plant Stress Tolerance*. 2010, Springer. p. 57-70.
140. Dong, R., et al., *High salt tolerance of a Bradyrhizobium strain and its promotion of the growth of Stylosanthes guianensis*. *International journal of molecular sciences*, 2017. **18**(8): p. 1625.
141. Pocard, J.-A., et al., *Molecular characterization of the bet genes encoding glycine betaine synthesis in Sinorhizobium meliloti 102F34*. *Microbiology*, 1997. **143**(4): p. 1369-1379.
142. Jordan, I.K., et al., *Essential genes are more evolutionarily conserved than are nonessential genes in bacteria*. *Genome research*, 2002. **12**(6): p. 962-968.
143. Schellenberg, G. and C. Furlong, *Resolution of the multiplicity of the glutamate and aspartate transport systems of Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 1977. **252**(24): p. 9055-9064.
144. Gunka, K., et al., *Selection-driven accumulation of suppressor mutants in Bacillus subtilis: the apparent high mutation frequency of the cryptic gudB gene and the rapid clonal expansion of gudB+ suppressors are due to growth under selection*. *PLoS One*, 2013. **8**(6): p. e66120.
145. Pardo, M.A., et al., *Nodulating ability of Rhizobium tropici is conditioned by a plasmid-encoded citrate synthase*. *Mol Microbiol*, 1994. **11**(2): p. 315-21.
146. Poole, R.K. and S. Hill, *Respiratory Protection of Nitrogenase Activity in Azotobacter vinelandii—Roles of the Terminal Oxidases*. *Bioscience Reports*, 1997. **17**(3): p. 303-317.
147. Bertsova, Y.V., A.V. Bogachev, and V.P. Skulachev, *Noncoupled NADH: ubiquinone oxidoreductase of Azotobacter vinelandii is required for diazotrophic growth at high oxygen concentrations*. *Journal of Bacteriology*, 2001. **183**(23): p. 6869-6874.
148. Alleman, A.B., F. Mus, and J.W. Peters, *Metabolic Model of the Nitrogen-Fixing Obligate Aerobe Azotobacter vinelandii Predicts Its Adaptation to Oxygen Concentration and Metal Availability*. *mBio*, 2021. **12**(6): p. e0259321.
149. Zabaloy, M.C., J.L. Garland, and M.A. Gomez, *An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2, 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina*. *Applied soil ecology*, 2008. **40**(1): p. 1-12.
150. Boccolini, M.F., et al., *Bacterial groups in a typical argiudol with application of glyphosate: influence on bacteria of nitrogen*. 2019.
151. Nguyen, D.B., et al., *Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: a meta-analysis*. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016. **92**: p. 50-57.

152. Itakura, M., et al., *Mitigation of nitrous oxide emissions from soils by Bradyrhizobium japonicum inoculation*. Nature Climate Change, 2013. **3**(3): p. 208-212.
153. Luciński, R., W. Polcyn, and L. Ratajczak, *Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium-legumes*. Acta biochimica polonica, 2002. **49**(2): p. 537-546.
154. Chamber-Perez, M.A. and A. Serrano, *CN balance, nitrate and nitrite reductases in Bradyrhizobium sp.(Lupinus) nodules exposed to nitrate, and the relationships to nitrogenase activities*. Journal of plant physiology, 1991. **139**(1): p. 70-75.
155. Serrano, A. and M. Chamber, *Nitrate Reduction in Bradyrhizobium s p.(Lupinus) Strains and its Effects on their Symbiosis with Lupinus luteus*. Journal of plant physiology, 1990. **136**(2): p. 240-246.
156. Brambilla, S., et al., *Spontaneous mutations in the nitrate reductase gene napC drive the emergence of eco-friendly low-N₂O-emitting alfalfa rhizobia in regions with different climates*. Microbial ecology, 2020. **79**(4): p. 1044-1053.
157. Curatti, L., et al., *Genes required for rapid expression of nitrogenase activity in <i>Azotobacter vinelandii</i>*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2005. **102**(18): p. 6291-6296.
158. Heiniger, E.K., et al., *How posttranslational modification of nitrogenase is circumvented in Rhodospseudomonas palustris strains that produce hydrogen gas constitutively*. Applied and environmental microbiology, 2012. **78**(4): p. 1023-1032.
159. Kobir, A., et al., *Protein phosphorylation in bacterial signal transduction*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, 2011. **1810**(10): p. 989-994.
160. Mijakovic, I., C. Grangeasse, and K. Turgay, *Exploring the diversity of protein modifications: special bacterial phosphorylation systems*. FEMS Microbiology Reviews, 2016. **40**(3): p. 398-417.
161. Halbleib, C.M. and P.W. Ludden, *Regulation of Biological Nitrogen Fixation*. The Journal of Nutrition, 2000. **130**(5): p. 1081-1084.
162. Lipa, P. and M. Janczarek, *Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses*. PeerJ, 2020. **8**: p. e8466.