



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**“Papel de la tirosinasa de *Rhizobium etli* en su eficiencia
simbiótica y resistencia a estrés”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A
SILVIA PIÑERO FERNÁNDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:
DR. GUILLERMO GOSSET LAGARDA**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

Director de Tesis:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda Instituto de Biotecnología, UNAM

Miembros del Comité Tutorial:

Dr. Federico Sanchez Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Guadalupe Espín Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. David Romero Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dr. Guillermo Gosset Instituto de Biotecnología, UNAM

Miembros del Comité Tutorial Ampliado:

Dr. Federico Sánchez Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Guadalupe Espín Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. David Romero Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dr. José Luis Puente Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Mario Soberón Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Miguel Ángel Cevallos Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Miembros del Jurado:

Dr. Mario Soberón Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Guillermo Gosset Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Miguel Ángel Cevallos Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dr. José Luis Puente Instituto de Biotecnología, UNAM

M. en C. Carmen Quinto Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Lorenzo Segovia Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Clarita Olvera Instituto de Biotecnología, UNAM

Becas otorgadas por:

CONACYT y DGEP-UNAM

AGRADECIMIENTOS

A Cei:

Por ser mi fuerza y mi inspiración (cosas bonitas =>).

A mi Mamá:

Gracias por estar aquí, por ser mi amiga, por ser mi porra, por ser tú, no se que haría sin ti.

A mi papá:

Por darme alas.

A Car:

Porque no creo que sepas cuanto te quiero y admiro.

A Janeth:

Porque si hubiera podido escoger una hermana seguramente serías tú.

A Juan Pa:

Para cuando aprendas a leer.

A Mami-grande:

Cuando sea grande quiero ser como tú.

A mis Amigos de Cuernavaca: Alejandro, Alina, Claudia, Gabriel, Geo, Jimena, Montse, Nancy, Susana, Tere y Verde.

A mis Amigos de Xalapa: Lissy, Irene, Ibiza, y Arturo

A Mechita y Silvia

A Todos mis compañeros de Laboratorio, viejos y nuevos, Mil gracias...

INDICE

RESUMEN	...1
ABSTRACT	...2
INTRODUCCIÓN	...3
• Descripción General	...3
• Mecanismos de nodulación e infección	...5
• Fijación de nitrógeno	...9
• El punto de vista de la planta	...11
• El punto de vista de <i>Rhizobium</i>	...13
• En busca de mecanismos de protección alternativos: las tirosinasas y la melanina	...15
JUSTIFICACIÓN	...18
OBJETIVOS	...19
• Objetivo general	...19
• Objetivos particulares	...19
MATERIALES Y METODOS	...20
• Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	...20
• Técnicas moleculares	...20
• Construcción de una cepa de <i>R. etli</i> MelA ⁻	...20
• Complementación del fenotipo MelA ⁻ de la cepa SP2	...21
• Cinéticas de formación de nódulos	...22
• Ensayos de competencia	...22
• Fijación de nitrógeno	...22
• Ensayo de sensibilidad a H ₂ O ₂	...23
• Ensayo de sensibilidad a ácidos fenólicos	...23
• Análisis de datos	...24
• Tabla de cepas y vectores	...25

RESULTADOS Y DISCUSION	...26
• Verificación del fenotipo de la cepas construidas	...26
• Comparación de las cinéticas de nodulación de las cepas generadas	...27
• Ensayos de competencia en nodulación	...32
• Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno	...34
• Ensayo de sensibilidad a H ₂ O ₂	...37
• Ensayo de sensibilidad a ácidos fenólicos	...38
CONCLUSIONES	...42
PERSPECTIVAS	...43
BIBLIOGRAFÍA	...

RESUMEN

Las tirosinasas (EC 1.14.18.1) son enzimas de la familia de las monofenol-oxidasas, capaces de sintetizar el compuesto oscuro conocido como melanina a partir de sustratos fenólicos principalmente L-tirosina y DOPA. En *Rhizobium etli* el gene codificante para la tirosinasa se localiza en el plásmido simbiótico (p42d) y es regulado por el sistema RpoN-NifA, de la misma manera que la mayoría de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, lo que sugiere que esta enzima tiene un papel en la simbiosis de *R. etli* con la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*). En el presente trabajo se analizaron los fenotipos simbióticos de las siguientes cepas: una cepa resistente a estreptomicina derivada de CFN42 (CE3), una cepa mutante en el gene *melA* (SP2) y la cepa isogénica complementada (SP66). Se demostró que la mutación en el gene *melA* reduce la tasa de formación de nódulos y disminuye el número total de nódulos en un 27% cuando se compara con la cepa CE3. La capacidad de fijación de nitrógeno de la cepa mutante no se ve afectada. Además se llevaron a cabo ensayos *in vitro* donde se evaluó la resistencia de las cepas CE3, SP2 y SP66 contra H₂O₂; la mutante en *melA* fue consistentemente más sensible a peróxido. En otra serie de experimentos, la cepa W3110 de *Escherichia coli* transformada con un plásmido partir del cual se expresa el gene *melA* de *R. etli* mostró una mayor resistencia a los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanilínico y siríngico que son compuestos fenólicos encontrados frecuentemente en el suelo. Nuestros resultados muestran por primera vez una función específica para la tirosinasa de *R. etli*: esta enzima es necesaria durante las fases iniciales de la simbiosis, aparentemente debido a su capacidad de otorgar resistencia contra diferentes tipos de estrés relacionados con la simbiosis como lo es la presencia en el medio de especies reactivas de oxígeno y compuestos fenólicos generados como parte de las respuestas defensivas de la planta.

ABSTRACT

Tyrosinase (EC 1.1418.1) is a monophenol-oxidase responsible for the synthesis of the black pigment known as melanin using phenolic compounds as substrates, mainly L-tyrosine and DOPA. In *Rhizobium etli* CFN42 the genetic location of *melA* in the symbiotic plasmid (p42d) and its RpoN-NifA dependent regulation, shared with nodulation and nitrogen fixation genes, suggests its involvement in the symbiosis between *R. etli* and bean (*Phaseolus vulgaris*). In this work, we analyzed the symbiotic phenotype of a streptomycin-resistant derivative of CFN42 (CE3), a *melA* mutant (SP2) and a complemented strain (SP66), demonstrating that *melA* inactivation reduced nodule formation rate and diminished total nodule number by 27% when compared to CE3 strain. Nitrogen fixation capacity of the mutant strain was not affected. Also, *in vitro* assays were performed where the resistance of CE3, SP2 and SP66 strains to H₂O₂ was evaluated; *melA* mutant strain was consistently less resistant to peroxide. In another series of experiments, *E. coli* W3110 strain expressing *R. etli melA* displayed enhanced resistance to *p*-hydroxybenzoic, vanillic and syringic acids, which are phenolic compounds frequently found in soil. Our results are the first to demonstrate a specific role for tyrosinase in *R. etli*: this enzyme is required during early symbiosis, apparently, providing resistance against different types of symbiosis-related stress, like the presence of reactive oxygen species and phenolic compounds in the environment generated as part of the plant defensive responses.

INTRODUCCIÓN

Descripción general.

Los procariontes poseen capacidades adaptativas sorprendentes, algunas de estas habilidades se presentan exclusivamente en este grupo y le permiten colonizar nichos inalcanzables para otros organismos. La habilidad de fijar nitrógeno atmosférico es una capacidad exclusivamente bacteriana que se ha descrito en géneros con estilos de vida muy diversos: organismos de vida libre como *Azotobacter*, *Klebsiella* y *Rhodobacter*, bacterias que se asocian de manera fortuita con otros organismos como *Azospirillum* y finalmente fijadores de nitrógeno que se asocian íntimamente con plantas como las bacterias pertenecientes al grupo denominado comúnmente como Rhizobia.

Las Rhizobiaceas son bacterias Gram negativas que normalmente se encuentran en el suelo. Dentro de esta familia se encuentran organismos capaces de establecer relaciones simbióticas con leguminosas. Este tipo de simbiosis se caracteriza por la formación de nódulos en las raíces de las plantas que son colonizados por bacterias que al diferenciarse en un tipo celular denominado bacteroide, proveen a la planta con nitrógeno fijado en forma de amonio a cambio de fuentes de carbono que lo sustenten.

Dentro de la familia de las Rhizobiaceas se encuentran muchos géneros con relaciones taxonómicas muy complejas y sujetas a discusión hasta el momento⁵. Algunos estudios basados en hibridación de ácidos nucleicos y análisis de ARN 16S ribosomal han demostrado la existencia de una marcada diversidad genética entre las bacterias pertenecientes a esta familia, lo que se refleja en la gran diferencia en el grado de especificidad de la asociación con leguminosas de las diferentes especies referidas generalmente como Rhizobia⁶⁰.

El establecimiento exitoso de una asociación simbiótica Rhizobia-leguminosa es una compleja sucesión de eventos que comienza con el intercambio de señales moleculares que disparan diversas respuestas en los organismos involucrados. La formación de los nódulos en la raíz de la planta, el establecimiento de la infección y el comienzo y desarrollo del proceso de fijación

de nitrógeno son etapas que han sido objeto de estudios exhaustivos. Del mismo modo lo ha sido la descripción de la respuesta de la planta a la infección con *Rhizobium*, ya que el hecho de que las leguminosas reconozcan a su simbionte inicialmente como un invasor⁶⁵, ha dado pie a analizar las estrategias de evasión y resistencia de la bacteria y la posible evolución de este proceso beneficioso a partir de mecanismos patogénicos de infección.

A pesar de todo el conocimiento acumulado en los últimos años, en muchos casos se desconocen los mecanismos de asociación fina entre las diferentes Rhizobiaceas y sus hospederos vegetales ya que estas son muy variadas y dependen del tipo de leguminosa involucrada²⁷.

A continuación se presenta una descripción de las etapas de la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa, algunas estrategias defensivas comunes a interacciones con patógenos y con simbiontes que presentan las leguminosas y el tipo de mecanismos protectores que hasta el momento se han descrito en *Rhizobium*.

- Mecanismos de infección y nodulación

El proceso simbiótico leguminosa- *Rhizobium* que culmina en la fijación de nitrógeno por parte de la bacteria dentro de los nódulos de origen vegetal se inicia mediante una compleja red de señales moleculares. Esta secuencia de eventos se desencadena debido a la respuesta de *Rhizobium* a compuestos del grupo de los flavonoides secretados por la planta. Cada leguminosa excreta un conjunto determinado de estos compuestos que, entre otras señales, son responsables del reconocimiento de la bacteria hacia un tipo o un grupo particular de plantas susceptibles a la infección (figura 1), por ejemplo; los compuestos daidzeína y genisteína son isoflavonoides producidos por la planta de soya (*Glycine max*) que inducen la transcripción de los genes de nodulación de *Bradyrhizobium japonicum* pero inhiben la expresión de estos mismos genes en *Sinorhizobium meliloti*²⁷.

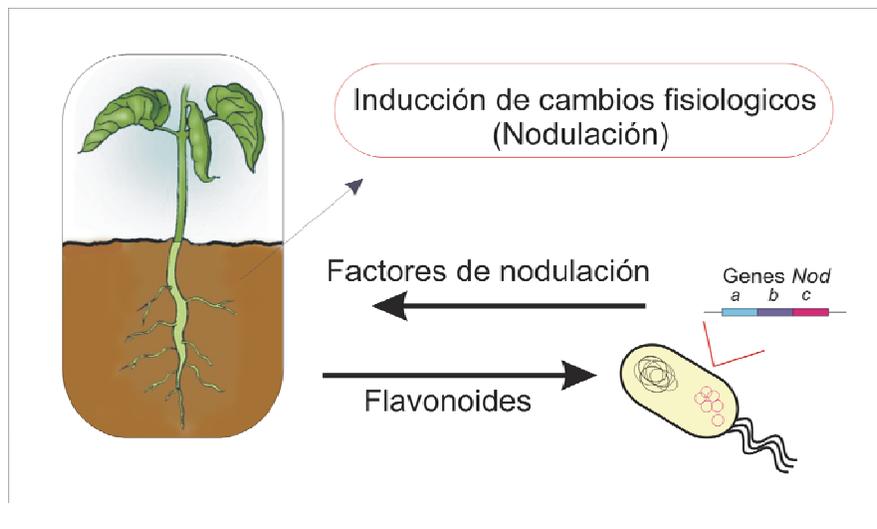


Figura 1. Señales moleculares involucradas en el establecimiento de la simbiosis

Todos los flavonoides están formados por un par de anillos de benceno unidos por medio de un anillo de pirano heterocíclico. Las sustituciones específicas en esta estructura general dan origen a los flavonoles, las flavonas, las

flavanonas, y a los isoflavonoides³⁵. Es importante señalar que la misma vía de síntesis de los compuestos de la familia de los flavonoides –utilizados en casos particulares por *Rhizobium* como una señal positiva- es responsable de la síntesis de las fitoalexinas, que son compuestos de bajo peso molecular con propiedades antimicrobianas utilizados por las plantas como defensa contra patógenos³⁵. Este hecho tiene implicaciones que sugieren una relación entre las interacciones simbióticas y las interacciones establecidas por la planta con organismos nocivos a los que se ve expuesta.

Los flavonoides excretados por la planta además de ser los inductores de la quimiotaxis, son los responsables de la inducción de los genes de nodulación en *Rhizobium* (figura 1). Un regulador transcripcional de la familia de LysR llamado NodD interactúa con los flavonoides y sufre un cambio conformacional que le permite unirse a elementos de regulación llamados “cajas *nod*” que se encuentran en los promotores de los genes involucrados en la síntesis de factores de nodulación²¹ (Factores Nod), que son señales moleculares de *Rhizobium* que inducen una gran variedad de respuestas en la planta. Los factores Nod son lipooligosacáridos de entre 4 y 5 residuos de *N*-acetil-glucosamina unidos por enlaces β -1,4, en los que el grupo *N*-acetil del extremo no reductor es reemplazado por un acilo cuya estructura es específica en cada especie. Se ha demostrado que al menos en parte la especificidad de asociación entre especies de *Rhizobium* y sus hospederos esta dada por la presencia de sulfatos, acetatos, grupos carbamil o algunos azúcares en diferentes posiciones del esqueleto de sus factores de nodulación⁴⁷, por ejemplo, los factores de nodulación sintetizados por *R. etli* no son sulfatados y poseen una fucosa modificada en su extremo reductor⁶³.

Existen dos tipos de genes involucrados en la síntesis de factores de nodulación: los llamados comunes (*nodABC*) que son genes presentes en todas las especies capaces de nodular, y los genes de nodulación específicos que codifican para enzimas encargadas de hacer modificaciones características en la estructura de los factores de nodulación de cada especie. Los genes comunes se encuentran normalmente en un operón, aunque existen excepciones como es el

caso de *Rhizobium etli* donde el gene *nodA* se encuentra separado aproximadamente 20 kb de los genes *nodBC*.

Una de las principales características que distingue a las leguminosas de otros vegetales es su capacidad de respuesta a los factores de nodulación sintetizados por *Rhizobium*. Se ha demostrado que existen cinasas con dominios tipo LysM que actúan como receptores de estos compuestos de origen bacteriano⁵². Se cree que la variedad de los grupos de genes que codifican para este tipo de enzimas en leguminosas es responsable de la complejidad y selectividad de la percepción de los factores Nod^{45,52}.

Debido al efecto inductor de los factores de nodulación de *Rhizobium*, la planta presenta una serie de cambios fisiológicos (figura 1) que incluyen: 1) el establecimiento de un flujo de iones a través de la membrana plasmática que se asocia a una depolarización de la misma; 2) incrementos periódicos de intensidad regular en los niveles de calcio; 3) deformación de los pelos radiculares y 4) inicio de la división de células corticales de la raíz que eventualmente darán origen al meristemo del nódulo¹⁵. Al deformarse los pelos radiculares las bacterias quedan atrapadas entre dos segmentos de pared celular y como respuesta a las señales bacterianas, la planta deposita material similar a la pared celular para formar una estructura en forma de tubo por la que las bacterias entran y proliferan, estas estructuras son llamadas hilos de infección y son las encargadas de guiar a la bacteria hasta las células vegetales en división que forman el primordio del nódulo, en las cuales las bacterias son internalizadas por un proceso similar a la endocitosis¹⁰. Dentro del citoplasma, las bacterias (llamadas a partir de este momento bacteroides)(figura 2), son rodeadas por una membrana de origen vegetal, conocida como membrana peribacteroidal que será la mediadora del intercambio de señales y nutrientes entre ambos simbiosomas¹⁰. Al conjunto de bacteroide y membrana peribacteroidal se le denomina simbiosoma.

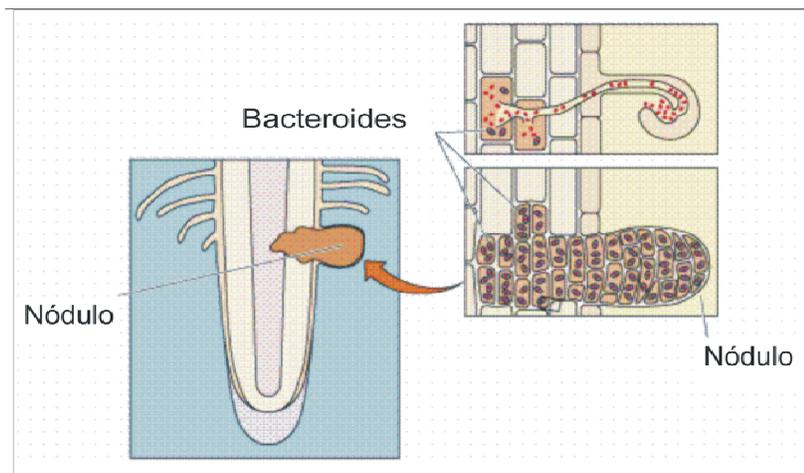


Figura 2. Proceso de infección

En leguminosas se han descrito dos tipos de nódulos: los indeterminados, que se caracterizan por mantener un meristemo apical activo lo que les da una forma alargada, en ellos se diferencian zonas que contienen bacteroides en diferentes etapas de desarrollo; y los nódulos determinados, en los que las células infectadas se localizan preferencialmente en una zona de tejido central, en los cuales los bacteroides presentan etapas de desarrollo más o menos coordinadas¹⁰. Existen otras diferencias entre ambos tipos de nódulo entre ellas destaca el número de bacteroides contenidos en una membrana peribacteroidal, mientras que en los simbiosomas de los nódulos indeterminados se encuentra sólo un bacteroide, en los nódulos determinados se observan varios bacteroides dentro de una misma membrana como resultado de la división de los bacteroides o debido a la fusión de dos o más simbiosomas¹⁰.

- Fijación de nitrógeno

Para completar su diferenciación a bacteroide, *Rhizobium* debe llevar a cabo una compleja serie de cambios, tanto morfológicos como fisiológicos para adaptarse a los requerimientos y retos de la vida dentro de los nódulos en las raíces de las leguminosas. De manera importante, se requiere la síntesis de enzimas encargadas de adecuar el metabolismo de la bacteria, así como también, es indispensable la síntesis de la maquinaria de fijación de nitrógeno, que permitirá el establecimiento de una relación exitosa con su hospedero vegetal.

El complejo de la nitrogenasa está formado por 2 componentes: el Componente I, que consta de dos subunidades (α y β), codificadas en los genes *nifD* y *nifK*; y el componente II, codificado por *nifH*¹⁹. En *R. etli* estos genes se encuentran formando el operón *nifHDK* que se encuentra duplicado, además de contar con una copia extra del gene *nifH*⁵¹.

Debido a los altos requerimientos energéticos que representa el proceso de fijación de nitrógeno y a que la nitrogenasa es altamente sensible al oxígeno, la regulación de la expresión de los genes que codifican para esta enzima debe ser sumamente fina y coordinada con la de genes involucrados en procesos metabólicos como la asimilación de fuentes de carbono específicas y la respiración³⁶, la transcripción de estos genes responde principalmente a la concentración de oxígeno presente en el medio. En *R. etli*, FixL es la proteína encargada de evaluar el nivel de oxígeno, esta cinasa de membrana está asociada al menos con tres activadores transcripcionales FixJ, FnrN³⁶ y NifA, este último se encarga, junto con el factor transcripcional σ^{54} (RpoN), de la transcripción de los genes del aparato de fijación de nitrógeno (*nifHDK*)¹⁹.

La vida útil de un nódulo concluye cuando se inicia el deterioro y eventual senescencia tanto de la célula vegetal como de la bacteriana. La decadencia del simbiosoma se desencadena, al menos en parte, debido a una acumulación de especies de oxígeno reactivo en el citoplasma, que eventualmente deteriora la membrana peribacteroidal y ocasiona deficiencias en el transporte y comunicación entre los bacteroides y su entorno celular. Una causa demostrada de esta acumulación oxidativa es la generación de especies reactivas debido a la

oxidación de la leg-hemoglobina presente en el citoplasma de las células nodulares²⁶.

Mucho se ha debatido sobre la capacidad de las bacterias de repoblar la rizósfera después de la senescencia de los nódulos. Se ha demostrado que la diferenciación de los bacteroides en nódulos de tipo indeterminado y determinado difieren: en el primer caso la diferenciación es irreversible, mientras que los bacteroides en nódulos de tipo determinado sufren una diferenciación reversible y por ello son cultivables⁴¹, sin embargo, debe mencionarse que en estudios de microscopía se ha observado que en nódulos determinados, como los desarrollados en plantas infectadas por *R. etli*, durante la senescencia los bacteroides se degradan casi simultáneamente que las células que los contienen¹⁰. Así, aunque ésta cuestión no se encuentra resuelta, la posibilidad de que una población bacteriana sea capaz de volver a la rizósfera da sentido al beneficio de sobrevivencia a largo plazo que la interacción con la planta ofrece a *Rhizobium*.

- El punto de vista de la planta

Durante la simbiosis con *Rhizobium*, el hospedero vegetal no se comporta como un receptor pasivo, si no que mediante diversos mecanismos, la mayoría desconocidos hasta el momento, es capaz de regular el proceso de infección de acuerdo a sus necesidades y al grado de compatibilidad con la bacteria en cuestión⁶⁵.

La planta desencadena una serie de respuestas comunes cuando se enfrenta, ya sea al ataque de un patógeno o la infección por un potencial simbiote. En las células vegetales atacadas por un patógeno se desencadena una serie de respuestas caracterizadas, de manera común, como respuesta hipersensible (HP)⁴⁸. Esta se determina entre otras reacciones por una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO), la acumulación de proteínas asociadas a la patogénesis, alteraciones en la pared celular, cambios en los flujos iónicos¹⁵ y síntesis de compuestos con actividades antimicrobianas como las fitoalexinas. Cuando el invasor es incapaz de evitar ser reconocido por la planta, estas reacciones se suman a otras más drásticas con el fin de detener la infección, las células involucradas sufren una muerte programada que se caracteriza histológicamente por la acumulación de compuestos fenólicos y se detiene así el avance del patógeno^{1,65}.

Los efectos de los factores de nodulación sintetizados por *Rhizobium* no solo incluyen beneficios para la bacteria si no que también son capaces de elicitar en la planta respuestas defensivas complejas que se asemejan a las etapas iniciales de la respuesta hipersensible⁵⁹. *Rhizobium* tiene medios que permiten mantener estas respuestas no solo a raya, si no a veces trabajando a su favor, sin embargo, durante cualquier etapa de la interacción este sutil balance se puede perder y terminar en la muerte del simbiote y de la célula o las células con las que interactúa¹.

Una de las primeras respuestas que se observan en las plantas después de ser infectada por un patógeno o por *Rhizobium* es la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno. Entre los compuestos más abundantes en ésta respuesta es el anión superóxido (O_2^-), éste compuesto se descompone rápidamente de

manera espontánea o debido a la acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) que lo convierte rápidamente en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El anión superóxido y el peróxido de hidrógeno no son en si especies tan reactivas, y existen pocas evidencias de que sean los responsables del ataque directo a las bacterias invasoras, no obstante, se sabe que el peróxido es capaz de reaccionar con metales por medio de la llamada reacción de Fenton y dar origen al sumamente nocivo ión hidroxilo³⁹. Además de su papel como primera línea de defensa, el peróxido juega un papel muy importante en la amplificación de la señal que deriva en la inducción de otros mecanismos defensivos como la vía de síntesis de las fitoalexinas³⁹. De manera asombrosa y un tanto paradójica, esta vía desemboca también en la síntesis de los flavonoides que funcionan como señal positiva para *Rhizobium*¹. El H_2O_2 participa también en la alteración de la pared celular en células vegetales infectadas, durante la infección con patógenos estas modificaciones están dirigidas al aislamiento físico del agresor¹, mientras que durante la simbiosis con *Rhizobium* las modificaciones de la pared celular mediadas por peróxido son indispensables para la formación del hilo de infección^{4,20}.

Otro escenario adverso para *Rhizobium* se deriva de la regulación por parte de la planta del número de nódulos formados en la raíz.; sólo una pequeña proporción de los hilos de infección formados son exitosos y la proporción hilos abortivos se incrementa a la par que aumenta el número de nódulos funcionales en la raíz⁶⁵. El fracaso de los hilos de infección se ha ligado a la respuesta hipersensible de la planta que se caracteriza por la acumulación de muchos compuestos defensivos, entre ellos compuestos fenólicos que tóxicos para la bacteria.

Así, la presión defensiva que la planta ejerce sobre *Rhizobium* es tanto nociva como necesaria para una simbiosis exitosa, por lo que estrategias para eludirla y sobrellevarla se hacen indispensables

- El punto de vista de *Rhizobium*

Para lograr una interacción exitosa con las leguminosas, las bacterias del género *Rhizobium* deben ser capaces de contender con los mecanismos de defensa de la planta. Se sabe que ciertos polisacáridos de superficie están involucrados en la supresión o retraso de dichas respuestas: se ha demostrado que cepas mutantes de *S. meliloti* incapaces de sintetizar exopolisacáridos (EPS) forman nódulos anormales, y que la proporción de hilos de infección abortivos que producen es significativamente alta²⁰.

Aunque el retraso o la supresión temporal de las defensas vegetales proveen a la bacteria de una ventaja, dichas respuestas se activan con el fin de que la planta tenga el control directo de la infección. Para lidiar con los retos específicos que implican las respuestas defensivas de la planta, *Rhizobium* produce una serie de compuestos y enzimas protectoras que le ayudan a sobrevivir para lograr el establecimiento de una simbiosis exitosa. Entre este tipo de mecanismos de protección se encuentra la síntesis de enzimas antioxidantes que permiten a la bacteria sobrellevar una de las primeras respuestas vegetales, la oxidativa.

Entre las enzimas que hasta el momento han demostrado ser importantes en la resistencia a estrés oxidativo durante la simbiosis se encuentran las superóxido dismutasas (SOD), que convierten el ión superóxido en peróxido de hidrógeno⁵⁸. La enzima codificada por el gene *sodA* ha demostrado ser indispensable durante el proceso simbiótico, ya que las cepas de *S. meliloti* SodA⁻ no sólo están afectadas en su capacidad fijadora de nitrógeno, sino que también desarrollan infecciones anormales, lo que demuestra que su actividad no sólo se requiere para proteger a la nitrogenasa si no que actúa también en fases iniciales de la simbiosis protegiendo al simbiote contra el superóxido producido como respuesta defensiva de la planta⁵⁸. En *S. meliloti* se han caracterizado también tres enzimas de la familia de las catalasas, capaces de descomponer el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular. KatA y KatC son enzimas monofuncionales que se encuentran activas principalmente en las fases exponencial y estacionaria de crecimiento respectivamente, mientras que KatB es

una enzima bifuncional que se expresa de manera constitutiva. Se ha observado que durante la simbiosis, KatC y KatB están presentes principalmente en hilos de infección y KatA se encuentra solamente en bacteroides a pesar de que su expresión se induce en presencia de H_2O_2 ^{25 31}. Las mutantes sencillas en los genes codificantes para las enzimas anteriormente mencionadas no presentan un fenotipo simbiótico, sin embargo las mutantes *katA/katC* y *katB/katC* presentan una disminución en su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno, demostrando la redundancia de sus funciones y su importancia³¹

En *R. etli* se ha demostrado que la enzima KatG es responsable de toda la actividad de catalasa y peroxidasa en la célula. A pesar de que la expresión de ésta enzima está regulada por OxyR y de que es inducida por la presencia de peróxido en el medio, las mutantes en el gene *katG* presentan un fenotipo simbiótico indistinguible del de la cepa silvestre⁶⁴. Al realizar un análisis proteómico, se observaron 57 proteínas que se expresan exclusivamente en la mutante KatG⁻, poniendo en evidencia la existencia de mecanismos alternos de protección oxidativa durante la simbiosis⁶⁴; una de las proteínas que se expresa en la cepa mutante, resultó ser una enzima de la familia de las peroxirredoxinas codificada en el gene *prxS*¹⁴, La regulación de la expresión de este gene está a cargo del sistema RpoN y de las proteínas reguladoras NifA y NtrC, de manera que presenta una alta expresión en condiciones de microaerobiosis y de simbiosis; a pesar de eso, la mutación en *prxS* no afecta las capacidades simbióticas de *R. etli*, a menos que se combine con una mutación en el gene *katG*. Las cepas mutantes *katG/prxS* disminuyen su capacidad de fijar nitrógeno en más de un 40% comparado con la cepa silvestre, éste fenotipo no es consecuencia de una nodulación alterada y refleja una redundancia funcional de KatG y PrxS¹⁴. Hasta el momento no se han encontrado mutaciones en genes que codifiquen para enzimas antioxidantes que sean capaces de abolir o disminuir de manera importante la nodulación en esta especie de *Rhizobium*.

Como hemos visto, existen sistemas alternos y a veces redundantes en la protección de *Rhizobium* contra estrés oxidativo dentro de la planta, es muy probable que debido al sutil equilibrio de la interacción entre los protagonistas de

la simbiosis, la protección contra otros tipos de estrés asociados con la misma como lo es la acumulación de compuestos fenólicos, esté dada por varios componentes y no se deba exclusivamente a la acción de un sistema.

- En busca de sistemas de protección alternativos: Las tirosinasas y la melanina

En *R. etli* los sistemas de protección oxidativa que se han descrito son redundantes y no se ha encontrado una proteína involucrada en este tipo de protección que sea totalmente indispensable durante la relación simbiótica de esta bacteria con la planta de frijol; este hecho da cabida a la suposición de la existencia de sistemas alternativos capaces de sustentar en cierta medida la nodulación y/o la fijación de nitrógeno en las cepas mutantes caracterizadas hasta el momento. En un escenario de este tipo la existencia de elementos capaces de proveer protección contra otros tipos de estrés asociado a las diferentes etapas de la simbiosis es deseable y posible.

Las tirosinasas (EC 1.14.18.1) son monofenol oxidasas capaces de catalizar la incorporación de oxígeno en sustratos fenólicos por medio de una reacción de dos pasos: en el primero, los monofenoles se hidroxilan (actividad de monofenol oxidasa), posteriormente, los *ortho*-difenoles resultantes se oxidan para formar *ortho*-quinonas (actividad de catecolasa)⁵⁷. Estas últimas, son especies altamente reactivas que sufren oxidaciones y polimerizaciones espontáneas que culminan en la formación del pigmento de color oscuro conocido como melanina (figura 3).

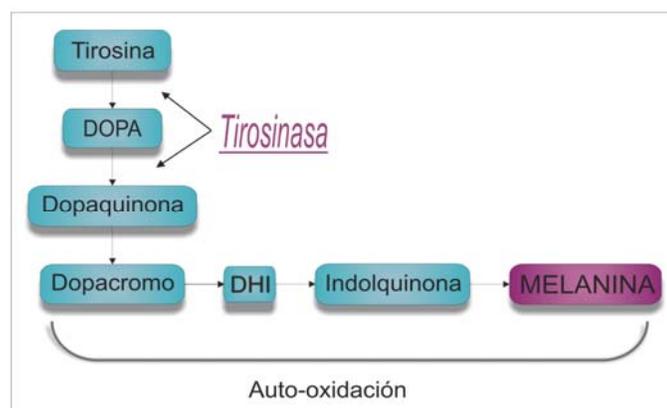


Figura 3. Síntesis de melanina

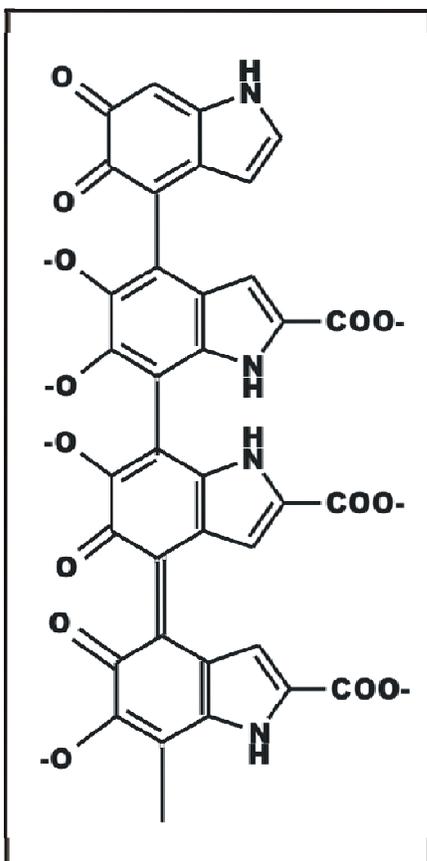


Figura 4. Estructura simplificada de la melanina

A pesar de que las melaninas son compuestos complejos con una estructura variable y no totalmente definida a la fecha, de manera general son polímeros indólicos de alto peso molecular (figura 4) que en algunas ocasiones son capaces de asociar productos pre-indólicos, iones inorgánicos, agentes reductores o macromoléculas biológicas en su estructura^{54,57}. Existen básicamente dos tipos de melanina: las eumelaninas y las faeomelaninas, las primeras son de un color que va del café al negro, mientras que las últimas varían de un tono rojizo al café, ambas se forman por la combinación de reacciones enzimáticas catalizadas por la tirosinasa y reacciones espontáneas⁵⁷.

La melanina participa en un amplio espectro de funciones biológicas como son la termorregulación, la quimio-protección, el camuflaje, la exhibición durante el cortejo sexual en algunas especies, además es capaz de proteger a algunas especies contra los efectos tóxicos de compuestos fenólicos en el medio^{24,34}. Sin embargo, la función más extendida y considerada como clásica para este compuesto es la de otorgar protección contra los efectos dañinos de la radiación UV. Este tipo de protección se debe, además de la barrera física que implica la capacidad de absorber de la melanina en el espectro de luz ultravioleta, a la capacidad del pigmento de proteger a las biomoléculas de los efectos nocivos de las especies reactivas de oxígeno generadas debido a esta radiación⁵⁴.

Se ha demostrado que la capacidad de la melanina de funcionar como antioxidante⁷ es importante como determinante de virulencia de organismos patogénicos que deben lidiar con las respuestas oxidativas de sus hospederos eucariontes. En este caso se encuentran ciertos tipos de hongos, como

Cryptococcus neoformans, *Wangiella dematitidis* y *Aspergillus fumigatus*, en los que las variantes albinas presentan una menor infectividad y son hasta 10 o 12 veces más susceptibles a las especies reactivas de oxígeno que las cepas melanogénicas^{13,28,30}. Incluso se ha demostrado que la actividad de tirosinasa se regula de manera alterna a la superóxido dismutasa como en el caso de *C. neoformans*²⁹.

La producción de melanina se ha caracterizado en algunas especies bacterianas, entre las que se encuentran *Rhizobium leguminosarum* bv *viceae*, *trifolii* y *phaseoli*, *Sinorhizobium meliloti* y *Rhizobium fredii*, en todos los casos, el gene *melA* se encuentra codificado en plásmidos^{11,40}. En *R. etli*, *melA* está presente en el plásmido simbiótico (p42d) y codifica para la única tirosinasa del género *Rhizobium* caracterizada hasta el momento⁸. Este gene es regulado por el sistema RpoN-NifA, al igual que muchos genes involucrados en nodulación y fijación de nitrógeno. Esta localización genética y el tipo de regulación que comparte con algunos genes simbióticos sugieren que esta enzima está involucrada de alguna manera en la simbiosis^{12,22,23}. Hasta el momento, ninguna función se ha demostrado para la tirosinasa o su producto dentro de este sistema.

De acuerdo a lo observado en trabajos anteriores^{1,15,38,43,53}, la interacción simbiótica entre las leguminosas y *Rhizobium* activa mecanismos defensivos similares a los que se activan cuando la planta es atacada, ya sea por bacterias, hongos, insectos o al sufrir daño físico¹. Como base para la realización del presente estudio, nosotros proponemos, que al igual que sucede en la interacción de hongos^{13,30} patógenos y sus huéspedes eucariontes, la melanina puede funcionar como un factor si no de virulencia, sí, de efectividad simbiótica, capaz de otorgar resistencia a las cepas melanogénicas contra diferentes tipos de estrés asociado a simbiosis como lo es el aquel provocado por la respuesta oxidativa de la planta, además de la acumulación de compuestos fenólicos en las diferentes fases de la simbiosis debido a la capacidad de la tirosinasa de utilizar diferentes aromáticos como sustrato y de la melanina de actuar como detoxificante de compuestos tóxicos en general, independientemente de su uso como sustrato por parte de la tirosinasa.

JUSTIFICACIÓN

La síntesis de compuestos de la vía de los aromáticos en *Escherichia coli* ha sido el interés central de los estudios realizados en nuestro laboratorio, en años recientes. Para lograr la sobreproducción de compuestos de interés industrial, se han seguido varios enfoques, sobre los que destaca la ingeniería de vías metabólicas. Una de sus herramientas es la integración al metabolismo bacteriano de vías metabólicas nuevas que le permitan a la bacteria sintetizar compuestos que de otra manera le son extraños.

La melanina es un compuesto que ha demostrado tener funciones muy variadas en la naturaleza, algunas de las cuales podría ser aprovechada en aplicaciones industriales. Para ser sintetizar melanina en *E. coli*, sólo se necesita la introducción de la actividad de una enzima: la tirosinasa. Así el primer interés de nuestro laboratorio en la tirosinasa fue crear una cepa productora de melanina. El gene seleccionado para la clonación fue el gene *melA* de *R. etli*. La melanina es un producto muy versátil, por lo que la pregunta giraba en torno a cuales podrían ser las aplicaciones novedosas a proponer, y así surgió la idea de acercarnos a la función que cumple este compuesto y la enzima responsable de su síntesis en el organismo original del que fue obtenido el gene a clonar.

Se sabía que el gene que codifica para esta enzima se encuentra en el plásmido simbiótico de *R. etli*, y que su regulación es compartida con genes indispensables para el proceso simbólico, así, conociendo de igual manera que durante la simbiosis la bacteria enfrenta un número considerable de situaciones de estrés, decidimos averiguar si en efecto la tirosinasa y/o la melanina juegan un papel simbiótico, y si es así, contra qué tipos de estrés protege a la bacteria.

De esta manera, un interés aplicado da origen a preguntas de naturaleza básica que a la larga podrían desarrollarse en nuevos proyectos con metas aplicadas concretas.

OBJETIVOS

- Objetivo general

Establecer si la actividad de la enzima tirosinasa otorga una ventaja a *Rhizobium etli* durante su simbiosis con la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris*).

- Objetivos particulares

- Interrumpir el gene *melA* en la cepa silvestre CE3 con el fin de construir una cepa mutante incapaz de producir melanina así como una cepa en la que se complemente el fenotipo Mel⁻.
- Analizar el fenotipo simbiótico de las cepas construidas y compararlo con el de la cepa silvestre (nodulación, competencia y fijación de nitrógeno).
- Realizar ensayos de resistencia al estrés generado por compuestos tóxicos asociados a la simbiosis en cepas Mel⁺ y Mel⁻.

MATERIALES Y MÉTODOS

- Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.

En la tabla 1, se listan de manera detallada las cepas y plásmidos que se utilizaron para la realización de éste trabajo.

Las cepas de *Escherichia coli* se crecieron a 37°C en medio Luria-Bertani (LB), mientras que las cepas de *R. etli* se crecieron a 30°C en medio de peptona- extracto de levadura (PY)⁴⁴ o en medio mínimo¹⁷. Los antibióticos listados a continuación se adicionaron en las siguientes concentraciones: ácido nalidíxico 20 µg/ml, espectinomicina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y gentamicina 15 µg/ml para *E. coli* y 30 µg/ml para *R. etli*.

- Técnicas moleculares

Las manipulaciones de ADN se realizaron según los protocolos previamente descritos⁵⁶. Los fragmentos de ADN y los plásmidos se purificaron utilizando kits de GibcoBRL (GibcoBRL, UK) y se visualizaron utilizando electroforesis en geles de agarosa. Los patrones de megaplásmidos de las cepas de *R. etli* se analizaron mediante la técnica de Eckhardt¹⁶

- Construcción de una cepa de *R. etli* MelA⁻.

La cepa de *R. etli* SP2, es una derivada de la cepa CE3, en la que se reemplazó por medio de una doble recombinación el gene intacto en el plásmido simbiótico por una versión del mismo interrumpida por un cassette de resistencia a espectinomicina. El gene *melA* (1834 pb) fue amplificado por medio de una reacción de PCR, utilizando como templado ADN total de la cepa CE3, para tal propósito, se diseñaron oligonucleótidos (5melA, 5'-CCG AAC GTC CAT GGC GTG GCT GGT CGG C-3'; 3melA, 5'-CCG GAG CCC GGG TGT TAG GCG GAC AC-3') que alinean en las secuencias que flanquean el gene. Con la intención de facilitar futuros pasos de clonación se incluyeron sitios de restricción: *Nco*I para el oligo 5melA y *Xma*I en el oligo 3melA. La reacción de PCR se realizó utilizando la enzima Vent (Biolabs, New England) en un

termociclador de bloques (Robocycler 9Gradient 96, Stratagene), el protocolo utilizado consistió en un paso inicial de desnaturalización (95°C por 3 min), seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, alineamiento de primers a 57°C por 1 min y elongación a 68°C por 3 minutos, además de un paso final de extensión a 68°C por 10 minutos.

El producto de PCR se clonó en el vector pCR II-TOPO (Invitrogen), se digirió con la enzima de restricción *BstE*I (posición 939 dentro del gene), se polimerizó en los extremos utilizando la polimerasa T4 (Biolabs, New England) y se ligó al fragmento de 2.0 kb del plásmido pHP45Ω que codifica para el gene *aadA*⁺, capaz de conferir resistencia al antibiótico espectinomicina. El gene *melA* interrumpido se clonó posteriormente como un fragmento *Spe*I –*Xho*I en el plásmido pJQ200-SK, el plásmido resultante (pJMelint) se transformó en la cepa S17-1 de *Escherichia coli* y se conjugó en la cepa CE3 de *R. etli*. Las clonas se reconocieron como dobles recombinantes por ser resistentes al ácido nalidíxico y a la espectinomicina y sensibles a la gentamicina y a la sacarosa. La capacidad de las cepas de producir melanina se probó en medio PY sólido suplementado con L-tirosina (0.4g/l) y CuSO₄ (40 µg/ml)(PYT), la caracterización genotípica se llevo a cabo por PCR.

- Complementación del fenotipo *MelA*⁻ de la cepa SP2 de *R. etli*

La complementación del fenotipo *MelA*⁻ en la cepa mutante SP2 se logró al clonar el gene *melA* en el plásmido de expresión pBBR1MCS5. El fragmento de ADN que comprende al gene *melA* y su promotor se obtuvo por PCR utilizando los primers pMel_5 (5'-CCC ATC GAT TTT GAA TTT GAG AGC-3') y Comp_3 (5'-CCG GAA TTC TTA GGC GGA CAC TAT-3'). El protocolo de reacción utilizado fue descrito anteriormente. El vector y el producto de PCR se digirieron con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Cla*I y se ligaron. El plásmido resultante pBB*melA* se transfirió a la cepa SP2 de *R. etli* por medio de una conjugación biparental utilizando a la cepa S17-1 como cepa donadora. El fenotipo de la cepa resultante (SP66) como productora de melanina se verificó en medio sólido PYT.

- Cinéticas de formación de nódulos

Semillas estériles de *Phaseolus vulgaris* cv Negro Jamada se germinaron e inocularon con una concentración de 10^7 células/planta de las cepas CE3, SP2 o SP66. Los cultivos se realizaron en matraces de 250 ml con 200 ml de solución Fahraeus¹⁸- agar (0.8%), en cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 12 h a 28°C por 23 días. Los nódulos desarrollados en cada planta se contaron diariamente. Los resultados que se muestran son promedio del número de nódulos de 12 plantas inoculadas en dos experimentos independientes.

- Ensayos de competencia

Las raíces de *P. vulgaris* se inocularon con una mezcla de las cepas SP2 y SP66 o con cada cepa por separado en los controles (10^7 células/planta). El inóculo se creció durante la noche en medio PY y posteriormente se diluyó en agua estéril para alcanzar las densidades ópticas adecuadas. Las plantas se crecieron en solución Farhaeus-agar en cuarto de cultivo con un fotoperiodo de 12 h a 28°C por 15 días. La ocupación de los nódulos se determinó macerando los nódulos previamente estériles en placas de medio PY sin selección, a partir de dichas placas se obtuvieron colonias aisladas que se sembraron en medio selectivo que incluía ácido nalidíxico para la cepa CE3, y ácido nalidíxico/espectinomícina para la cepa SP2. El experimento se llevó a cabo por duplicado empleando 10 plantas para cada ensayo de competencia y 5 para cada control.

- Fijación de nitrógeno

Utilizamos semillas esterilizadas superficialmente con hipoclorito de sodio que posteriormente germinamos por 3 días para luego transferirlas a contenedores plásticos llenos de vermiculita estéril. Las plantas se inocularon con una concentración de 10^7 células de la cepa bacteriana en cuestión (crecida en medio PY); y se mantuvieron en invernadero, regando con una solución nutritiva libre de nitrógeno³⁶ Las actividades de actividad de nitrogenasa se calcularon incubando los sistemas radiculares 1 h a temperatura ambiente en

viales de cristal con una concentración final de acetileno de 10% en la fase gaseosa. La producción de etileno se cuantificó utilizando un cromatógrafo de gases (Varian 3300- integrador Varian 4290). Se realizó un perfil de plásmidos de las bacterias recuperadas de los nódulos de plantas inoculadas con cada cepa. Se realizaron dos experimentos independientes utilizando 8 plantas en cada uno de ellos.

- Ensayo de sensibilidad a H₂O₂

Se determinó la densidad óptica de cultivos crecidos durante toda la noche de cada cepa fue determinada, se inocularon volúmenes apropiados de cada una ellas en en 3 ml de medio PY- agar (0.8%) para obtener una concentración aproximada de 10⁵ células/ml (50°C). Cada tubo inoculado de PY-agar suave se plateó inmediatamente en medio sólido. Después de solidificado el medio, se colocaron en su superficie discos de papel filtro (0.5 cm de diámetro) saturados con 20 µl de un solución de H₂O₂ al 3% (Sigma). Se determinó el tamaño de las zonas de inhibición ocasionadas por el peróxido después de una incubación a 30°C por 48 h. Se platearon 14 réplicas para cada cepa en dos experimentos independientes.

- Ensayo de sensibilidad a ácidos fenólicos

La cepa de *E. coli* W3110/pTrc*meIA*⁸, fue construida por Natividad Cabrera en el laboratorio el doctor Guillermo Gosset. Esta cepa y su cepa control W3110/pTrc99A se inocularon a una densidad inicial de 0.5 OD₆₀₀ en matraces con 50 ml de medio LB líquido suplementado con concentraciones variables de los ácidos *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, siríngico y vanilínico (0-18 g/l), CuSO₄ en una concentración final de 40 µg/ml, ampicilina 100 µg/ ml y 0.1 mM de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.

El cultivo se incubó a 30°C y 250 rpm de agitación y el crecimiento de las cepas se monitoreó espectrofotométricamente a 600 nm. Las densidades ópticas que se obtuvieron se compararon con las de controles sin la adición de compuestos fenólicos.

- Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron utilizando las herramientas estadísticas y de graficación de los programas Excell y Sigma Plot.

Tabla 1. Cepas y vectores utilizados en este presente estudio

CEPA O PLÁSMIDO	GENOTIPO O CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	FUENTE
Cepas		
<i>E. coli</i>		
XLI-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 hsdR17 supE44 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q lacZΔM15 Tn10(Tc^R)</i>] <i>thi</i>	Bullock <i>et al.</i> 1987 ⁶
S17.1	F- <i>pro-82 thi-1 endA1 hsdR17 supE44</i> <i>recA13</i> , integrado a cromosoma RP-4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7)	Simon <i>et al.</i> 1983 ⁶²
W3110/pTrc99A	W3310 portando el vector pTrc99A	Cabrera <i>et al.</i> 2006 ⁸
W3110/pTrcmelA	W3310 expresando el gene <i>melA</i> de <i>R.etli</i> clonado en el plásmido pTrc99A.	Cabrera <i>et al.</i> 2006 ⁸
<i>R. etli</i>		
CE3	Cepa silvestre Str ^R Nal ^R	Noel <i>et al.</i> 1984 ⁴⁴
SP2	Derivada de CE3 <i>melA</i> ::ΩSpt	Este estudio
SP66	Derivada de CE3 <i>melA</i> ::ΩSpt/ pBBmelA	Este estudio
Plásmidos		
pJQ200 SK+	Gm ^R <i>sacB</i> , vector suicida	Quandt <i>et al.</i> 1993 ⁵⁰
pHP45Ω	Ap ^R Spt ^R	Prentki <i>et al.</i> 1984 ⁴⁹
pCR II-TOPO	Km ^R <i>ccdB</i>	Invitrogen
pBBR1MCS5	Gm ^R , vector de expresión	Kovach <i>et al.</i> 1995 ³³
pBBmelA	pBBR1MCS5 conteniendo el gene <i>melA</i>	Este estudio
pTOPOmelA	pCR II-TOPO conteniendo el gene <i>melA</i>	Este estudio
pMelint2	pCR II-TOPO conteniendo <i>melA</i> ::ΩSpt	Este estudio
pJMelint	pJQ200 SK+ conteniendo <i>melA</i> ::ΩSpt	Este estudio

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- Verificación del fenotipo de las cepas construidas

La capacidad de producir melanina de las cepas SP2 y SP66 se evaluó en medio rico PY adicionado con L- tirosina, que es el sustrato de la tirosinasa y cobre, su cofactor. El uso de este tipo de medio de cultivo para la producción de melanina se ha usado anteriormente ¹¹, aunque la concentración de L- tirosina utilizada en este trabajo es mayor, lo que ocasiona que la aparición de melanina ocurra en un tiempo más corto. La melanina se produce preferentemente a 30°C tanto en las cepas de *R. etli* como en la cepa de *E. coli* productora de melanina. El tiempo en el que las cepas comienzan a ponerse oscuras por si solas es de aproximadamente 12 días y de 2 horas en las cepas crecidas que son tratadas con SDS, debido al efecto de este detergente en la disposición del sitio activo de la enzima y a que la lisis de las células logra poner en contacto directo a la enzima con su sustrato³.

En la figura 5 se muestra a la cepa silvestre productora de melanina (CE3), a la cepa mutante en el gene *melA* incapaz de producir melanina (SP2) y a la cepa en la que se complementa el fenotipo Mel⁻ (SP66) que expresa el gene *melA* bajo su propio promotor en un plásmido de expresión (ρ BB*melA*). Esta última recuperó la capacidad de generar melanina.

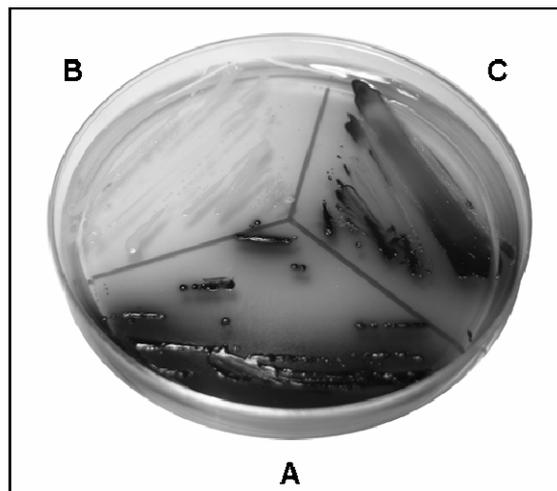


Figura 5. Producción de melanina de las cepas: A) CE3 B) SP2 y C) SP66

Los resultados obtenidos indican que el fenotipo observado es congruente al esperado por las modificaciones genéticas efectuadas en cada cepa.

- Comparación de las cinéticas de nodulación de las cepas generadas

Con el fin de observar la progresión de la nodulación causada por las cepas CE3, SP2 y SP66 de *R. etli*, se realizaron ensayos en cuarto de cultivo que consistieron en la inoculación de plántulas de frijol sembradas en matraces con medio Fahraeus- agar. Gracias a éste tipo de metodología utilizada por primera vez por Fahraeus en 1957¹⁸, es posible observar las raíces de la planta a través de las paredes de los matraces de vidrio y contar los nódulos que se desarrollan en ellas, en la figura 6, se muestra un ejemplo de éste tipo de sistemas.



Figura 6. Ejemplo de cultivo en matraces

Las cinéticas de nodulación de cada cepa se obtuvieron determinando diariamente el número de nódulos producidos por planta en un periodo de 23 días. Los nódulos fueron visibles y aptos para ser contados a partir del día 9 post- inoculación. Desde ese momento se observó que las plantas inoculadas con la cepa parental CE3 produjeron un mayor número de nódulos (10 en promedio) que aquellas plantas inoculadas con la cepa SP2 que produjeron

únicamente un promedio de 1.5 nódulos en el mismo periodo de tiempo (figura 7, panel A). Al día 15 post-inoculación la diferencia entre el número de nódulos desarrollados por la cepa Mel^+ y la cepa Mel^- fue fácilmente apreciable, tal y como se ilustra en el panel B de la figura 7. En ese punto de la cinética los números promedio de nódulos por planta fueron de 46.5 (± 4.7) para la cepa CE3 y 25.3 (± 3.8) para la cepa SP2. El promedio del número final de nódulos después de 23 días fue de 61.5 para la cepa SP2, lo que representa una disminución del 27.4% en relación con el número de nódulos alcanzados por la cepa CE3 (84.7 nódulos por planta en promedio); los valores de nodulación de la cepa complementada fueron similares a los de la cepa parental.

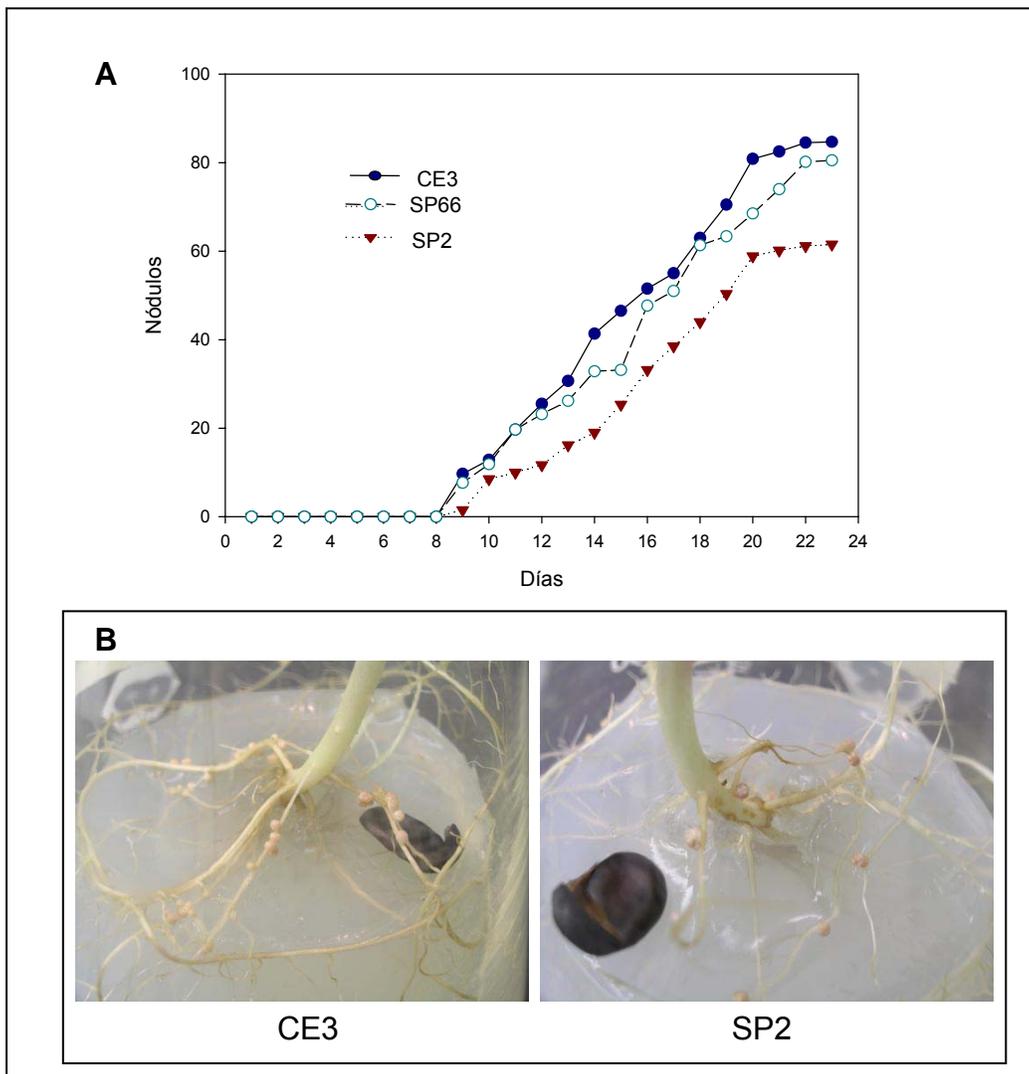


Figura 7. Análisis de la nodulación de las diferentes cepas A) cinéticas de nodulación B) ejemplo de la apariencia de las raíces de plantas inoculadas con la cepa parental y_{28} mutante a los 15 días post-inoculación.

En el ensayo descrito anteriormente se utilizaron 12 plantas en dos ensayos independientes, en la figura 8 se presentan las curvas de los valores obtenidos en los conteos diarios mostrando sus desviaciones estándar. Se llevaron a cabo pruebas t-Student pareadas para cada punto de las comparaciones entre cepas. En el caso de la comparación entre las cepas CE3 y SP2 todos los puntos mostraron ser significativamente diferentes ($p < 0.05$) entre ambas cepas, mientras que en la comparación de las cepas CE3 y la cepa complementada SP66 de manera general la diferencia entre los puntos no es significativa (figura 8).

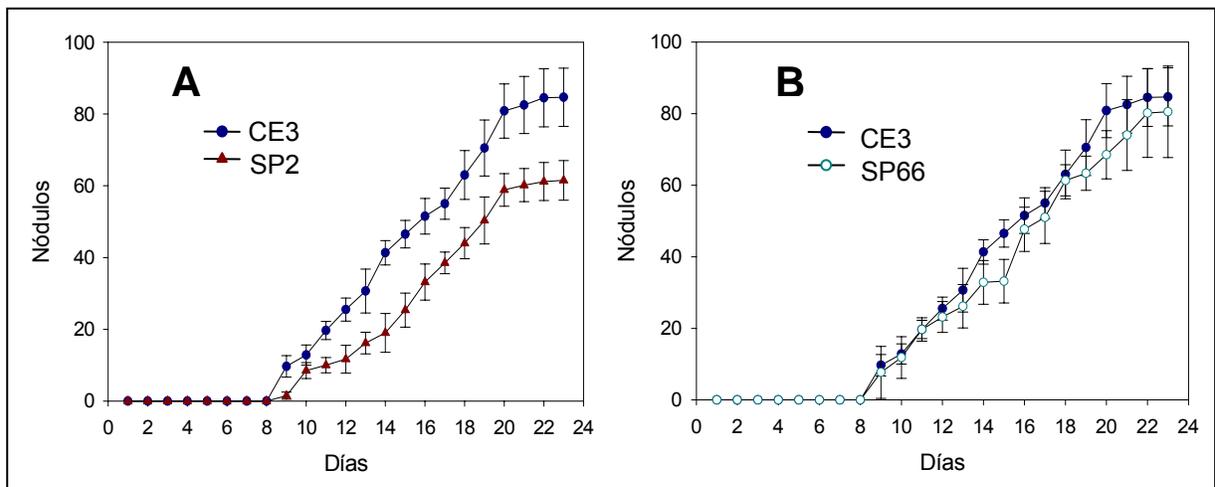


Figura 8. Cinéticas de nodulación mostrando desviaciones estándar entre las cepas: parental y mutante (A) y entre las cepas parental y de complementación (B)

Ajustando las curvas obtenidas del conteo diario de nódulos a una línea recta, se calculó la tasa específica de formación de nódulos para cada cepa. Como puede observarse en la tabla 2 la cepa CE3 tiene una tasa de 0.22 nódulos formados por día, mientras que la tasa que presenta la cepa mutante SP2 es de 0.16 nódulos por día. Es importante subrayar que el número de nódulos formados por ésta cepa y los que se obtienen con la cepa parental nunca llegan a igualarse. Su número final se estabiliza antes que el número de nódulos en la cepa silvestre. La tasa de nodulación de la cepa SP66 es muy similar a la observada en la cepa parental (tabla 2).

Tabla 2. Valores de nodulación

CEPA	No. de nódulos ¹			μ^2
	9	15	23	
CE3	10 \pm 3	46.5 \pm 3.8	84.7 \pm 8.1	0.22
SP2	1.5 \pm 1	25.3 \pm 4.7	61.5 \pm 5.5	0.16
SP66	7.6 \pm 7.3	33.2 \pm 6.1	80.5 \pm 12.8	0.21

¹ Número de nódulos en puntos seleccionados de la cinética (días)

² Tasa de aparición de nódulos en d⁻¹

Este tipo de experimento no permite tiempos de observación más prolongados, debido a que la capacidad de soportar crecimiento de la solución nutritiva y el agar se agota después de aproximadamente 20 días. Por esta razón no fue posible observar si la cepa SP2 podría eventualmente acumular el mismo número de nódulos que la cepa parental. De cualquier manera, los resultados muestran claramente una tasa de formación de nódulos menor durante el periodo de éste experimento. En los puntos que se resaltan en la tabla 2 se puede observar una disminución en la diferencia relativa del número de nódulos de las cepas CE3 y SP2 a través del paso de los días, así al día 9 tenemos que el número de nódulos de la cepa SP2 presenta una disminución del 85% con respecto al de la cepa CE3, al día 15 ésta diferencia disminuye a un 45.6%, llegando a un 27.4% al día 23, la marcada diferencia en el primer punto de medición podría deberse al error que deriva del conteo de un número tan pequeño de nódulos, sin embargo, podría ser una indicación de que la carencia de una tirosinasa activa afecta una etapa de nodulación temprana y merece ser tomado en cuenta en futuros trabajos.

A pesar de que no se esperaba que la inactivación del gene *melA* pudiera causar una disminución en la capacidad de crecimiento de *R. etli*, se evaluó la posibilidad de que un defecto en crecimiento fuera el responsable del retraso en la formación de nódulos de la cepa SP2. Por ello se determinó la capacidad de crecimiento de la cepa SP2 y la cepa parental CE3 en medio rico (PY) y medio

mínimo (MM)¹⁷ (figura 9), Como se puede observar, ambas cepas tienen velocidades de crecimiento indistinguibles, ya que a 600 nm ambas alcanzan una densidad óptica alrededor de 1.8. La densidad óptica de los cultivos crecidos en medio mínimo después de 24 h fue de alrededor de 0.7.

En conjunto, estos resultados demuestran que las cepas carentes de una tirosinasa funcional tienen un efecto negativo durante la cinética de nodulación, a pesar del cual, las cepas mutantes son capaces de establecer una simbiosis efectiva, lo cual es consistente con la idea de la existencia de mecanismos protectores que funcionan de manera simultánea durante las diferentes fases de la simbiosis, de manera que la eliminación de uno de ellos no abate las capacidades simbióticas de la bacteria. Este defecto se corrige en la cepa de complementación y no es consecuencia de diferencias en la capacidad de crecimiento entre las cepas probadas.

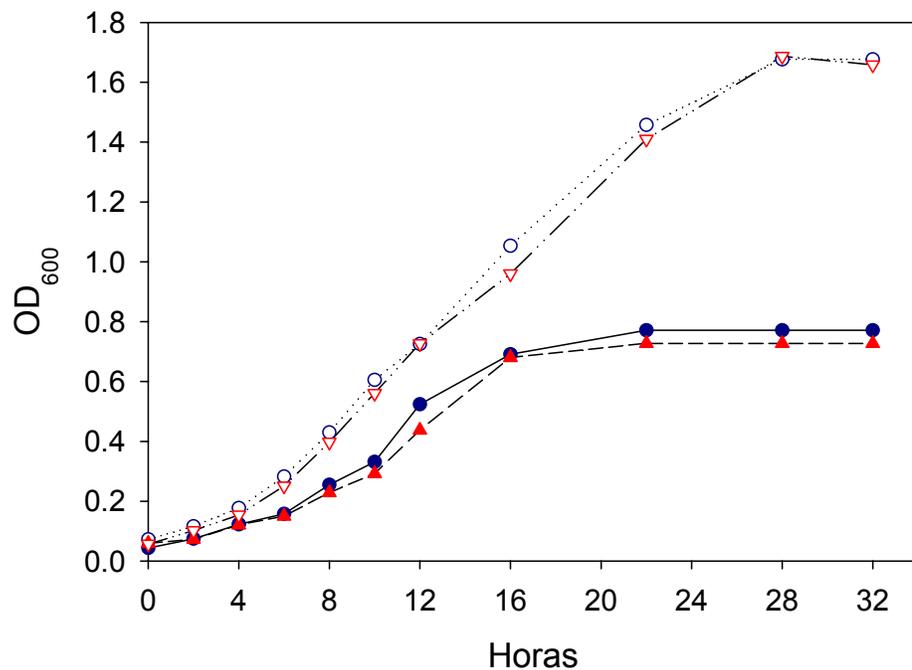


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de en medio rico (símbolos abiertos) y medio mínimo (símbolos cerrados) de las cepas CE3 (círculos) y SP2 (triángulos)

- Ensayos de competencia en nodulación

Para determinar si la presencia de una tirosinasa activa otorga una ventaja competitiva durante la nodulación, se inocularon las cepas CE3 y SP2 en la misma proporción (10^7 células/planta), ya sea de manera simultánea o individualmente en plántulas de 3 días de *P. vulgaris*. Después de 15 días, se colectaron los nódulos, se maceraron y se platearon en medio PY. Se seleccionaron colonias aisladas y se picaron en placas del mismo medio adicionado con los antibióticos correspondientes para seleccionar e identificar a las cepas CE3 y SP2. La proporción de ocupación de nódulos se calculó, y se encontró lo siguiente: 45% de los nódulos estaban ocupados por la cepa parental, 27% por la cepa SP2 y 28% estaban co-ocupados por ambas cepas (tabla 3). En ensayos en maceta utilizando aislados naturales de *S. meliloti* Mel⁺ y Mel⁻, Castro *et al.* (2000) encontraron que el 80% de los nódulos era ocupado por la cepa Mel⁺, mientras que sólo un 10% eran ocupados exclusivamente por la cepa Mel⁻, estos resultados muestran la misma tendencia que los observados en nuestro trabajo, sin embargo, nosotros encontramos una proporción relativamente menor de nódulos ocupados por la cepa parental (Mel⁺), estas aparentes discrepancias podrían reflejar diferentes requerimientos de tirosinasa entre ambas especies, aunque no es posible realizar comparaciones directas entre ambos trabajos, ya que además de que los resultados parecen estar ampliamente influenciados por las condiciones en que se crecen las plantas, en nuestro trabajo se usaron cepas isogénicas a diferencia de trabajos previamente reportados, donde se utilizan aislados naturales. Comparando los resultados de co-ocupación de nódulos, nosotros notamos una proporción mayor (28%) a la que se observó utilizando cepas de *S. meliloti*, donde la co-ocupación es de un 10% en todas las condiciones probadas⁹. La naturaleza extracelular de la melanina podría explicar, al menos en parte, la co-ocupación relativamente alta encontrada, si pensamos, por ejemplo, que la melanina producida por la cepa CE3 podría otorgar protección a la cepa SP2 cuando ambas cepas comparten el mismo nódulo.

Los resultados obtenidos en este experimento evidencian que la actividad de la tirosinasa y por lo tanto la capacidad de producción de la melanina otorgan cierta ventaja simbiótica a la cepa silvestre en fases tempranas de la interacción con la planta. Esta protección podría actuar en las etapas iniciales de la interacción como por ejemplo en la fase de adherencia de *R. etli* a la raíz. Sin embargo, debido al tipo de regulación del gene por concentraciones de oxígeno bajas, parecería que el papel de la enzima se desempeña principalmente dentro del hilo de infección o en etapas posteriores.

Tabla 3. Porcentaje de ocupación de nódulos en ensayos de competencia

CEPA	Colonias (800)	Nódulos (100)
CE3	63.25%	45%
SP2	36.75%	27%
Co-ocupación	ND	28%

- Determinación de la capacidad de fijación de nitrógeno

El proceso simbiótico entre *R. etli* y la planta de frijol es sumamente complejo, y un sistema de protección contra un tipo de estrés determinado puede ser útil en diferentes fases de la interacción o durante todo el proceso. Como ocurre en el caso de la enzima superóxido dismutasa de *S. meliloti* que es necesaria tanto para el desarrollo de procesos de infección como en la fijación de nitrógeno⁵⁸.

Sabemos por reportes previos que dado el tipo de regulación de la tirosinasa de *R. etli*, su expresión es posible desde el comienzo de la infección^{22,42} y hasta la senescencia del nódulo. Nuestros resultados demuestran que una tirosinasa activa es necesaria para alcanzar cinéticas de nodulación normales, por ello decidimos analizar si la capacidad de fijar nitrógeno en sí se afecta negativamente debido al fenotipo *MelA⁻* de la cepa SP2. Para evaluar lo anterior se esterilizaron y se sembraron semillas de *P. vulgaris* en recipientes plásticos con vermiculita estéril. Las plantas se inocularon independientemente con las cepas CE3, SP2 o SP66. Después de 32 días las raíces se recuperaron y se determinó la actividad de reducción de acetileno (fijación de nitrógeno)(figura 10). Los perfiles de megaplásmidos de las cepas recuperadas son indistinguibles.



Figura 10. Ejemplo de cultivos en vermiculita estéril para ensayos en invernadero

Las actividades de reducción de acetileno mostradas en la tabla 4 representan un promedio de dos experimentos independientes utilizando 8 plantas inoculadas con cada cepa. Las pequeñas variaciones que se pueden observar entre la capacidad de fijar nitrógeno de las raíces de las plantas inoculadas con las cepas CE3 y SP2 no son significativas debido a el aumento en la variación entre plantas al igual que carecen de significancia los valores de la cepa (SP66) que muestran un valor ligeramente mayor de actividad de reducción de acetileno total y una disminución en el peso seco de los nódulos que da como resultado un aparente aumento en su capacidad de reducción de acetileno específica. La variación encontrada entre los valores de las plantas utilizadas en éste experimento se refleja en la tabla 4 como valores de desviación estándar.

Tabla 4. Valores de ensayos de fijación de nitrógeno

CEPA	ARA ¹	Peso seco nódulos ²	ARA específica ³	Peso seco follaje
CE3	4.34 (0.59)	229.82 (68.8)	18.88 (5.92)	1.23 (0.29)
SP2	4.14 (0.54)	229.90 (49.9)	18.01 (5.34)	1.06 (0.29)
SP66	5.37 (0.21)	181.08 (14.88)	29.65 (12.17)	1.00 (0.30)

¹Actividad de Reducción de Acetileno (μM de etileno por planta por hora), ² mg.nódulos/planta, ³ Actividad de Reducción de Acetileno específica (μM de etileno por gramo de nódulos por planta por hora), ⁴ gramos por planta.

Estos resultados no son completamente inesperados, ya que cepas de *Rhizobium leguminosarum* bv *phaseoli* Mel⁻ Fix⁺ habían sido aisladas previamente ², demostrando que el fenotipo Mel⁺ no es un requerimiento para la fijación de nitrógeno, sin embargo, hasta donde sabemos el presente trabajo es el primero en que cepas isogénicas MelA⁻ y MelA⁺ se han comparado. Dado que el ensayo previamente descrito se concentra en la capacidad de fijación de

nitrógeno de los sistemas en un solo tiempo (32 días), cabría la duda y la posibilidad de analizar en un futuro trabajo, de si al realizar una cinética en donde se mida la actividad de reducción de acetileno de raíces a través del tiempo se observa una diferencia en las capacidades de fijación de nitrógeno de las raíces de las plantas inoculadas con las cepas empleadas.

Estos resultados nos llevan a concluir que la presencia de una tirosinasa activa no es indispensable para el proceso de fijación de nitrógeno, al menos en los tiempos evaluados. El complejo enzimático de la nitrogenasa es sumamente sensible a oxígeno y su protección se orquesta a muchos niveles, desde la expresión de proteínas transportadoras de oxígeno, el uso de elementos respiratorios con una afinidad elevada hasta la producción de enzimas antioxidantes como KatG y PrxS. Es válido asumir que la tirosinasa juega solamente un papel menor y que otras enzimas y mecanismos son suficientes para proteger a *R. etli* contra el estrés oxidativo que se genera durante esta fase particular de la simbiosis, al menos en las condiciones experimentales utilizadas. En *S. meliloti* se sabe que enzima KatA se expresa abundantemente en bacteroides por lo que es probable que actúe protegiendo a la nitrogenasa³¹ de la misma manera que SodA que es indispensable para una eficiente fijación de nitrógeno⁵⁸. En *R. etli* las cepas con mutaciones dobles en *katG/prxS* presentan una disminución importante en su capacidad de fijar nitrógeno¹⁴, sin embargo no son totalmente indispensables por lo que es de suponer que algún otro sistema o enzima particular proteja a la bacteria en este estadio, por lo observado en este estudio no podemos sugerir una intervención de la enzima tirosinasa.

- Ensayos de sensibilidad a H₂O₂

La capacidad del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) de interactuar con la melanina se conoce desde hace muchos años, de tal manera que la oxidación degradativa que ésta sufre, sobre todo en presencia de luz, se ha descrito y se utiliza como uno de los criterios principales para caracterizar a un pigmento oscuro como melanina³². Recientemente se ha demostrado que no sólo el producto de la tirosinasa interactúa con el peróxido, si no que la enzima en sí es capaz de actuar como catalasa convirtiendo al peróxido de hidrógeno en oxígeno y agua durante la conversión de la forma inactiva (*met*) de la enzima en su forma catalítica (*oxy*). Además la tirosinasa posee actividad de peroxidasa que le permite utilizar H₂O₂ para oxidar sustratos fenólicos^{37,66}. A pesar de estos antecedentes no existen estudios sobre el posible papel de las tirosinasas o de la melanina sobre la resistencia a estrés oxidativo durante la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa.

Con el fin de analizar el efecto de la falta de una tirosinasa funcional en la cepa SP2 en relación con su resistencia a peróxido, se utilizaron discos de papel filtro saturados con una solución de peróxido de hidrógeno al 3 %. Los discos se colocaron en el centro de cajas petri previamente inoculadas homogéneamente con una concentración de 10⁵ células/ml de las cepas CE3, SP2 y SP66. Las cajas se incubaron a 30°C por 48 h y posteriormente se midieron las zonas de inhibición. Como se muestra en la figura 11, las zonas de inhibición de la cepa SP2 fueron consistente y significativamente mayores. ($p < 0.05$ en una prueba t de Student pareada) que las zonas de inhibición formadas en las cajas inoculadas con la cepa parental sugiriendo que la cepa MelA⁻ es más susceptible a los efectos negativos de este compuesto. Proponemos que durante la respuesta oxidativa de la planta, momento en que es muy plausible que *R. etli* se encuentre dentro del lumen de los hilos de infección, la actividad de tirosinasa relacionada con la formación de la melanina, aumenta la resistencia bacteriana contra H₂O₂, en concierto con otros sistemas, ya que la cepa mutante en la tirosinasa se afecta sólo ligeramente y forma nódulos normales. Los halos de inhibición formados por la cepa SP66 no son significativamente diferentes

($p=0.79$) de los formados por la cepa parental, mostrando que la carencia de la tirosinasa en SP2 es responsable de este fenotipo sensible.

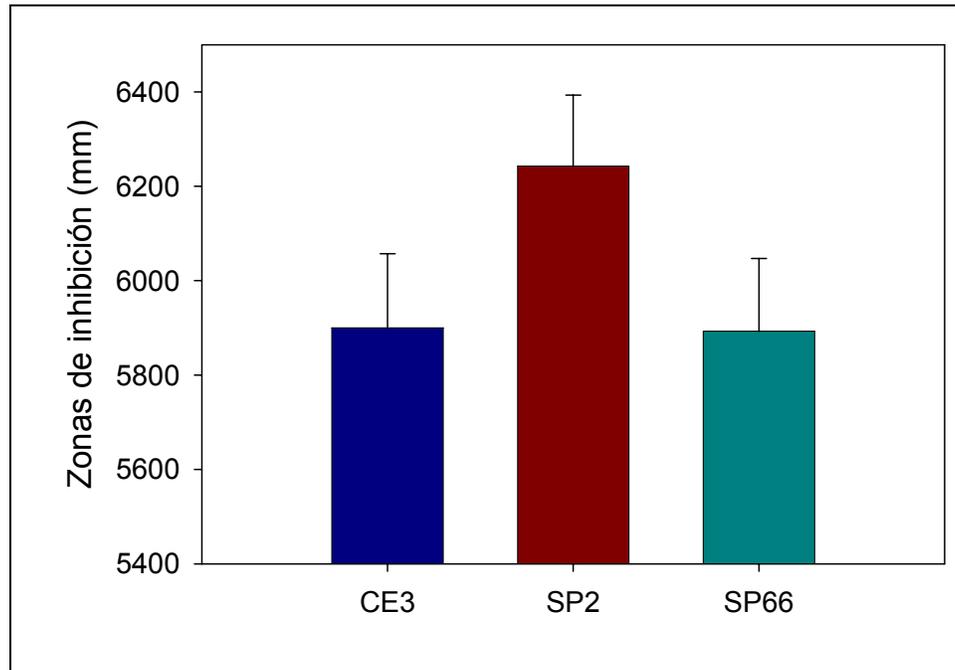


Figura 11. Diámetro de las zonas de inhibición provocadas por discos saturados de H₂O₂ en cultivos en placa de las cepas CE3, SP2 y SP66

- Ensayo de sensibilidad a ácidos fenólicos

Las bacterias del género *Rhizobium* deben enfrentarse a la presencia de compuestos fenólicos que se acumulan dentro de las células vegetales como parte de la respuesta defensiva de la planta a la infección⁶⁵, así como a compuestos fenólicos que se encuentran en el suelo como producto de la descomposición de tejidos vegetales. Con la intención de acercarnos al papel de la tirosinasa en la protección de las células bacterianas contra este tipo de estrés, se probó la resistencia de cepas Mel⁺ y Mel⁻ contra los ácidos: *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, vanilínico y siríngico que son ácidos de carácter fenólico que se encuentran de manera natural en el suelo⁶¹.

Las cepas de *R. etli* probadas resultaron ser resistentes a altas concentraciones de los ácidos fenólicos probados, probablemente debido a la expresión de enzimas de la vía del protocatecuato, que permite a algunas especies del grupo de *Rhizobium* utilizar compuestos fenólicos como fuente de carbono⁴⁶. Para profundizar, se decidió estudiar la capacidad de la tirosinasa de *R. etli* de proteger a organismos más susceptibles como *E. coli* contra el estrés provocado por la presencia de compuestos fenólicos tóxicos en el medio. Se llevaron a cabo cultivos en matraces con medio rico y diferentes concentraciones de los ácidos anteriormente mencionados.

Una cepa de *E. coli* (W3110) que porta el plásmido pTrc99A sin inserto, demostró ser sumamente sensible a todos los ácidos utilizados, ya que, después de 24 horas se observó un decremento en el crecimiento (expresado como densidad óptica a 600 nm) de los cultivos suplementados con concentraciones de 2 a 18 g/l de los ácidos en cuestión, comparado con el crecimiento observado en cultivos control carentes de cualquier compuesto tóxico (figura 12).

En contraste, la cepa W3110 que expresa el gene *melA* de *R. etli* presente en el plásmido pTrc*melA*⁸ mostró un aumento en su resistencia al ser retada con los ácidos *p*-hidroxibenzoico, siríngico y vanilínico al comparar su crecimiento con el de su cepa control W3110/pTrc99A. La disminución en la susceptibilidad de la cepa W3110/pTrc*melA* varía de acuerdo al compuesto ensayado: por ejemplo, que la cepa control no crece en presencia de 8 g/l de ácido *p*-hidroxibenzoico, la cepa que expresa el gene *melA* es capaz de crecer a niveles similares a los alcanzados en los cultivos control carentes de compuesto tóxico a las mismas concentraciones. Este tipo de efecto se observa en cultivos suplementados con ácido siríngico hasta concentraciones mayores a 16 g/l. Cuando se enfrenta a las cepas a diferentes concentraciones de ácido vanilínico observamos que el crecimiento a las 24 horas de cultivo decrece en ambas, pero en diferentes proporciones, mientras que en una concentración de 6 g/l del ácido el crecimiento de la cepa Mel⁺ se mantiene aproximadamente al nivel de su control sin compuesto tóxico, la cepa Mel⁻ ha decrecido su nivel de crecimiento a aproximadamente la mitad del de su control correspondiente. El efecto protector

de la expresión de la tirosinasa no es observable en los cultivos con ácido ferúlico, ya que el decremento en el crecimiento de ambas cepas de acuerdo al aumento de concentración del ácido es indistinguible (figura 12).

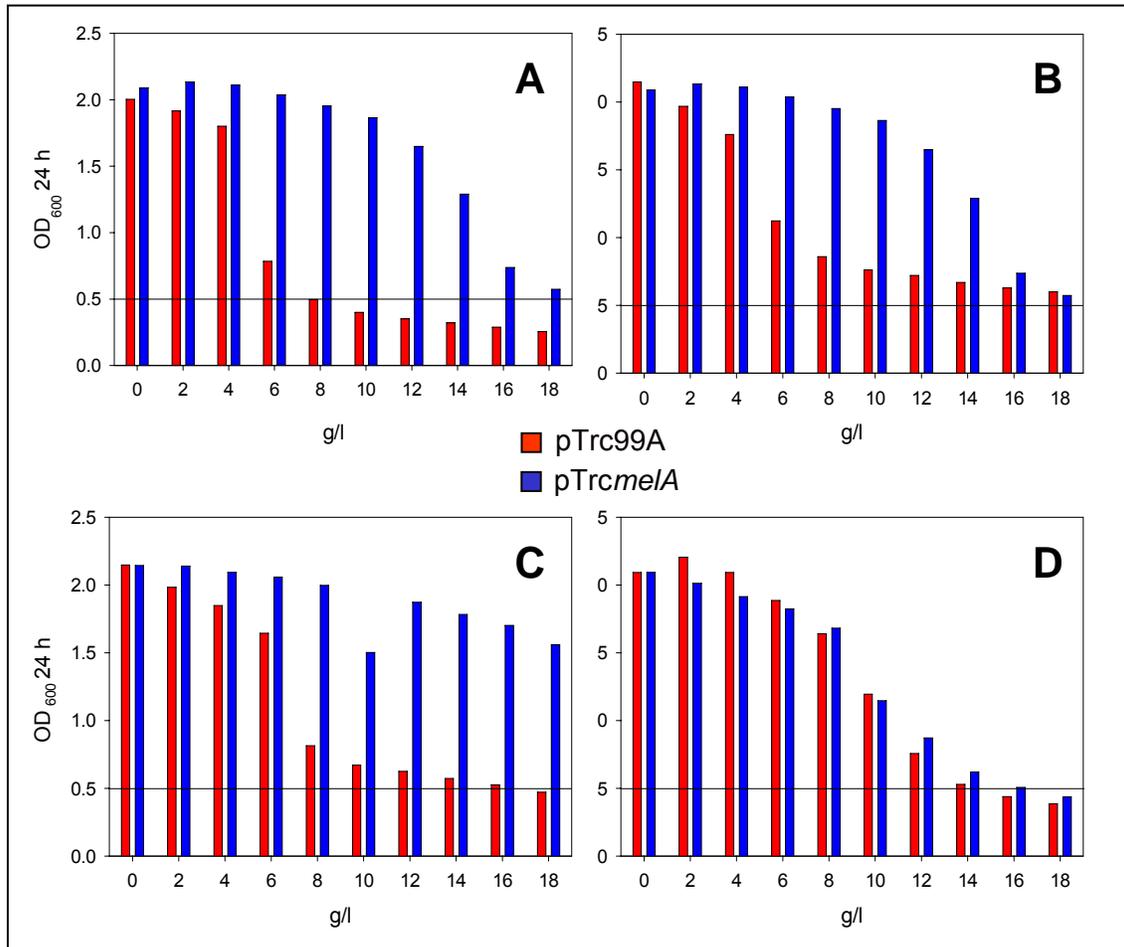


Figura 12. OD₆₀₀ a las 24 horas de cultivo de cepas de *E. coli* MelA⁺ y MelA⁻ suplementadas con concentraciones variables de los ácidos: *p*-hidroxibenzoico (A), Siringico (B), Vanilínico (C) y Ferúlico (D)

Se ha reportado el efecto detoxificador que tienen las enzimas de la familia de las polifenol-oxidasas sobre compuestos fenólicos^{24,34}. Las lacasas y las tirosinasas son capaces de convertir compuestos fenólicos de bajo molecular en productos de polimerización menos tóxicos. En nuestro trabajo, demostramos que este efecto no depende del uso directo de los fenólicos en cuestión como sustratos de la enzima (al menos en los compuesto utilizados), ya que, los ácidos *p*-hidroxibenzoico, vanilínico, siríngico y ferúlico no son sustratos de la tirosinasa de *R. etli*, que al parecer es menos promiscua que otras tirosinasas y oxida un rango restringido de compuestos⁸. El medio de cultivo que utilizamos en nuestros ensayos contiene L-tirosina, un sustrato de la tirosinasa MelA, así, nuestras observaciones pueden ser explicada considerando que las *orto*-quinonas derivadas de la L-tirosina que se forman en fases iniciales de la melanogénesis, son moléculas reactivas, deficientes en electrones que reaccionan rápidamente con otras moléculas, como los ácidos ensayados, que pueden ser incorporados a la estructura de la melanina⁵⁵.

Nuestros resultados demuestran que la tirosinasa es capaz de ofrecer protección contra compuestos fenólicos tóxicos presentes en el suelo, y posiblemente contra aquellos generados como parte de las respuestas defensivas de la planta. Se espera que este mecanismo esté presente en otras plantas cuyo estilo de vida incluye una asociación directa con plantas. La secuencia homóloga más parecida a la tirosinasa de *R. etli* (36% de identidad/ 52% similitud), es la tirosinasa de *R. solanacearum*, que es una bacteria patógena de las plantas de la familia de las solanaceas. En este organismo, se ha demostrado que la mutación del gene *melA* causa sensibilidad a altas concentraciones de L- tirosina, lo que nos habla de un papel protector contra compuestos aromáticos²⁴.

CONCLUSIONES

A pesar de que el tipo de regulación que presenta la tirosinasa de *R. etli* permite que sea expresada potencialmente en todas las etapas de la simbiosis, en nuestro estudio se detectó que su carencia tiene efectos obvios sólo en algunas fases del proceso simbiótico.

La cepa de *R. etli* carente de tirosinasa forma un menor número de nódulos en comparación con los nódulos que se forman en plantas inoculadas con la cepa parental. El fenotipo de nodulación silvestre se restituye en la cepa de complementación lo que nos habla de que la falta de la tirosinasa es la causa exclusiva del fenotipo afectado y por lo tanto esta enzima es un factor en la eficiencia del proceso de nodulación en esta especie de *Rhizobium*. Esta afirmación se respalda por el hecho de que no solamente se afecta el número de nódulos formados si no que al inocular plantas de manera simultánea con las cepas CE3 y SP2, ésta última ocupa una menor proporción del total de nódulos analizados en los ensayos de competencia.

A diferencia de lo encontrado en los experimentos de nodulación, no existen diferencias significativas en la capacidad de fijación de nitrógeno en las tres cepas, de manera que la tirosinasa no parece estar actuando durante éste proceso o juega un papel menor.

La hipótesis de que el papel de la tirosinasa de *R. etli* durante su simbiosis con la planta de frijol está relacionado con la capacidad de la bacteria de resistir ciertos tipos de estrés asociados se apoya por el aumento en la susceptibilidad de la cepa SP2 a peróxido y en el incremento de su resistencia a algunos ácidos fenólicos que se observa en los cultivos de la cepa de *E. coli* que expresa el gene *meIA*.

PERSPECTIVAS

El estudio del efecto de la mutación del gene *melA* de *R. etli* en su eficiencia simbiótica y en su resistencia a tipos de estrés relacionados a simbiosis, a la vez de dar luz sobre la función de la tirosinasa en éste tipo de organismos, abre una serie de cuestionamientos interesantes, por ejemplo: existen en la naturaleza especies de *Rhizobium* que presentan cepas melanogénicas y albinas, de manera que sería interesante analizar si existen diferencias en el requerimiento de la tirosinasa en diferentes especies.

En el presente trabajo se restringió el campo de acción de la tirosinasa a fases tempranas de la simbiosis, específicamente al proceso de nodulación. Es interesante, y quizá un siguiente paso lógico, el averiguar si en fases tan tempranas como la infección hay diferencias en eficiencia entre la cepa silvestre y la cepa *MelA⁻*, que se reflejen por ejemplo, en una mayor proporción de eventos abortivos en los hilos de infección de la cepa carente de tirosinasa, producto de su incrementada sensibilidad a las defensas vegetales.

A pesar de que la fijación de nitrógeno no se afectó por la mutación en *melA*, no descartamos la posibilidad de que el diseño experimental no haya permitido apreciar diferencias sutiles entre ambas cepas, así una perspectiva a este trabajo sería el realizar ensayos en los que se analice la capacidad de fijar nitrógeno de las cepas en forma de una cinética que permita apreciar la evolución del proceso a través del tiempo.

Ya que se ha demostrado que en la resistencia a peróxido está involucrada la actividad de las enzimas KatG y PrxS, sería interesante evaluar a las mutantes *katG* y *prxS* y una cepa triple mutante *katG/prxS/melA* en las condiciones planteadas en este trabajo.

En el laboratorio del Dr Guillermo Gosset se cuenta ahora con las cepas y el interés de realizar trabajos que den luz sobre diferentes aspectos de la enzima tirosinasa de *R. etli* y sus aplicaciones potenciales, de manera que el estudio de esta enzima se ha consolidado como una línea de investigación dentro del mencionado laboratorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Baron, C. and P. C. Zambryski.** 1995. The plant response in pathogenesis, symbiosis, and wounding: variations on a common theme? *Annu. Rev. Genet.* **29**:107-129.
2. **Borthakur, D., J. W. Lamb, and A. W. Johnston.** 1987. Identification of two classes of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. *Mol. Gen. Genet.* **207**:155-160.
3. **Borthakur, D., J. W. Lamb, and A. W. Johnston.** 1987. Identification of two classes of *Rhizobium phaseoli* genes required for melanin synthesis, one of which is required for nitrogen fixation and activates the transcription of the other. *Mol. Gen. Genet.* **207**:155-160.
4. **Brewin, N. J.** 2004. Plant cell wall remodelling in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Critical Reviews in Plant Sciences.*
5. **Broughton, W. J.** 2003. Roses by other names: taxonomy of the Rhizobiaceae. *J. Bacteriol.* **185**:2975-2979.
6. **Bullock, N. J., J. M. Fernandez, and J. M. Short.** 1987. XL1-Blue: A high efficiency transforming *recA* *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *Biotechniques* **5**:376-379.
7. **Bustamante, J., L. Bredeston, G. Malanga, and J. Mordoh.** 1993. Role of melanin as a scavenger of active oxygen species. *Pigment Cell Res.* **6**:348-353.
8. **Cabrera-Valladares, N., A. Martínez, S. Piñero, V. H. Lagunas-Muñoz, R. Tinoco, R. de Anda, R. Vázquez-Duhalt, F. Bolívar, and G. Gosset.** 2006. Expression of the *melA* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology* **38**:772-779.
9. **Castro, S., I. Carrera, and G. Martínez-Drets.** 2000. Methods to evaluate nodulation competitiveness between *Sinorhizobium meliloti* strains using melanin production as a marker. *J. Microbiol. Methods* **41**:173-177.
10. **Cermola, M., E. Fedorova, R. Tate, A. Riccio, R. Favre, and E. J. Patriarca.** 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli*-*Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:733-741.

11. **Cubo, M. T., A. M. Buendia-Claveria, J. E. Beringer, and J. E. Ruiz-Sainz.** 1988. Melanin Production by Rhizobium Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:1812-1817.
12. **Cubo, T., F. Romero, J. M. Vinardell, and J. E. Ruiz-Sainz.** 1997. Expression of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli melA* gene in other Rhizobia does not require the presence of the *nifA* gene. *Australian journal of plant physiology* **24**:195-203.
13. **de Cassia, R. G. and S. R. Pombeiro-Sponchiado.** 2005. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol. Pharm. Bull.* **28**:1129-1131.
14. **Dombrecht, B., C. Heusdens, S. Beullens, C. Verreth, E. Mulkers, P. Proost, J. Vanderleyden, and J. Michiels.** 2005. Defence of *Rhizobium etli* bacteroids against oxidative stress involves a complexly regulated atypical 2-Cys peroxiredoxin. *Mol. Microbiol.* **55**:1207-1221.
15. **Downie, J. A. and S. A. Walker.** 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**:483-489.
16. **Eckhardt, T.** 1978. A rapid method for the identification of plasmid deoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**:584-588.
17. **Encarnacion, S., M. Dunn, K. Willms, and J. Mora.** 1995. Fermentative and aerobic metabolism in *Rhizobium etli*. *J. Bacteriol.* **177**:3058-3066.
18. **Fahraeus, G.** 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass technique. *Journal of General Microbiology* **16**:374-381.
19. **Fischer, H. M.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**:352-386.
20. **Gage, D. J. and W. Margolin.** 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Current opinion in microbiology* **3**:613-617.
21. **Halverson, L. J. and G. Stacey.** 1986. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* **50**:193-225.
22. **Hawkins, F. K. and A. W. Johnston.** 1988. Transcription of a *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* gene needed for melanin synthesis is activated by *nifA* of *Rhizobium* and *Klebsiella pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* **2**:331-337.
23. **Hawkins, F. K. L., C. Kennedy, and W. B. Johnston.** 1991. A *Rhizobium leguminosarum* gene required for symbiotic nitrogen fixation, melanin

synthesis and normal growth on certain growth media. *Journal of General Microbiology* **137**:1721-1728.

24. **Hernandez-Romero, D., F. Solano, and A. Sanchez-Amat.** 2005. Polyphenol oxidase activity expression in *Ralstonia solanacearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:6808-6815.
25. **Herouart, D., S. Sigaud, S. Moreau, P. Frendo, D. Touati, and A. Puppo.** 1996. Cloning and characterization of the *katA* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J. Bacteriol.* **178**:6802-6809.
26. **Herrada, G., A. Puppo, S. Moreau, D. A. Day, and J. Rigaud.** 1993. How is leghemoglobin involved in peribacteroid membrane degradation during nodule senescence? *FEBS Lett.* **326**:33-38.
27. **Hirsch, A. M., M. R. Lum, and J. A. Downie.** 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special? *Plant Physiol* **127**:1484-1492.
28. **Jacobson, E. S., E. Hove, and H. S. Emery.** 1995. Antioxidant function of melanin in black fungi. *Infect. Immun.* **63**:4944-4945.
29. **Jacobson, E. S., N. D. Jenkins, and J. M. Todd.** 1994. Relationship between superoxide dismutase and melanin in a pathogenic fungus. *Infect. Immun.* **62**:4085-4086.
30. **Jahn, B., A. Koch, A. Schmidt, G. Wanner, H. Gehringer, S. Bhakdi, and A. A. Brakhage.** 1997. Isolation and characterization of a pigmentless-conidium mutant of *Aspergillus fumigatus* with altered conidial surface and reduced virulence. *Infect. Immun.* **65**:5110-5117.
31. **Jamet, A., S. Sigaud, S. G. Van de, A. Puppo, and D. Herouart.** 2003. Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis and their crucial role during the infection process. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**:217-225.
32. **Korytowski, W. and T. Sarna.** 1990. Bleaching of melanin pigments. Role of copper ions and hydrogen peroxide in autooxidation and photooxidation of synthetic dopa-melanin. *J. Biol. Chem.* **265**:12410-12416.
33. **Kovach, M. E., P. H. Elzer, D. S. Hill, G. T. Robertson, M. A. Farris, R. M. Roop, and K. M. Peterson.** 1995. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**:175-176.
34. **Larsson, S., P. Cassland, and L. J. Jonsson.** 2001. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic

fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:1163-1170.

35. **Long, S. R.** 2001. Genes and signals in the rhizobium-legume symbiosis. *Plant Physiol* **125**:69-72.
36. **Lopez, O., C. Morera, J. Miranda-Rios, L. Girard, D. Romero, and M. Soberon.** 2001. Regulation of gene expression in response to oxygen in *Rhizobium etli*: role of FnrN in fixNOQP expression and in symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **183**:6999-7006.
37. **Mastore, M., L. Kohler, and A. J. Nappi.** 2005. Production and utilization of hydrogen peroxide associated with melanogenesis and tyrosinase-mediated oxidations of DOPA and dopamine. *FEBS J.* **272**:2407-2415.
38. **Matamoros, M. A., D. A. Dalton, J. Ramos, M. R. Clemente, M. C. Rubio, and M. Becana.** 2003. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol* **133**:499-509.
39. **Mehdy, M. C.** 1994. Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens. *Plant Physiol* **105**:467-472.
40. **Mercado-Blanco, J., F. Garcia, M. Fernandez-Lopez, and J. Olivares.** 1993. Melanin production by *Rhizobium meliloti* GR4 is linked to nonsymbiotic plasmid pRmeGR4b: cloning, sequencing, and expression of the tyrosinase gene mepA. *J. Bacteriol.* **175**:5403-5410.
41. **Mergaert, P., T. Uchiumi, B. Alunni, G. Evanno, A. Cheron, O. Catrice, A. E. Mausset, F. Barloy-Hubler, F. Galibert, A. Kondorosi, and E. Kondorosi.** 2006. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**:5230-5235.
42. **Michiels, J., S. T. Van, I. D'hooghe, B. Dombrecht, T. Benhassine, W. P. de, and J. Vanderleyden.** 1998. The *Rhizobium etli* rpoN locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of rpoN, ptsN, and ptsA mutants. *J. Bacteriol.* **180**:1729-1740.
43. **Mithofer, A.** 2002. Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends Plant Sci.* **7**:440-444.
44. **Noel, K. D., A. Sanchez, L. Fernandez, J. Leemans, and M. A. Cevallos.** 1984. *Rhizobium phaseoli* symbiotic mutants with transposon Tn5 insertions. *J. Bacteriol.* **158**:148-155.
45. **Oldroyd, G. E. and J. A. Downie.** 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**:566-576.

46. **Parke, D.** 1996. Conservation of PcaQ, a transcriptional activator of *pca* genes for catabolism of phenolic compounds, in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium* species. *J. Bacteriol.* **178**:3671-3675.
47. **Perret, X., C. Staehelin, and W. J. Broughton.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**:180-201.
48. **Pontier, D., C. Balague, and D. Roby.** 1998. The hypersensitive response. A programmed cell death associated with plant resistance. *C. R. Acad. Sci. III* **321**:721-734.
49. **Prentki, P. and H. M. Krisch.** 1984. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**:303-313.
50. **Quandt, J. and M. F. Hynes.** 1993. Versatile suicide vectors which allow direct selection for gene replacement in gram-negative bacteria. *Gene* **127**:15-21.
51. **Quinto, C., L. De, V, M. Flores, J. Leemans, M. A. Cevallos, M. A. Pardo, R. Azpiroz, G. M. De Lourdes, E. Calva, and R. Palacios.** 1985. Nitrogenase reductase: A functional multigene family in *Rhizobium phaseoli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **82**:1170-1174.
52. **Radutoiu, S., L. H. Madsen, E. B. Madsen, H. H. Felle, Y. Umehara, M. Gronlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, and J. Stougaard.** 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature* **425**:585-592.
53. **Ramu, S. K., H. M. Peng, and D. R. Cook.** 2002. Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **15**:522-528.
54. **Riley, P. A.** 1997. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**:1235-1239.
55. **Rozanowska, M., T. Sarna, E. J. Land, and T. G. Truscott.** 1999. Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radic. Biol. Med.* **26**:518-525.
56. **Sambroock, J., E. Fritsch, and T. Maniatis.** 2000. Molecular cloning a laboratory manual. Cold spring harbor laboratory.
57. **Sanchez-Ferrer, A., J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Canovas, and F. Garcia-Carmona.** 1995. Tyrosinase: a comprehensive review of its mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* **1247**:1-11.

58. **Santos, R., D. Herouart, A. Puppo, and D. Touati.** 2000. Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in rhizobium-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* **38**:750-759.
59. **Santos, R., D. Herouart, S. Sigaud, D. Touati, and A. Puppo.** 2001. Oxidative burst in alfalfa-Sinorhizobium meliloti symbiotic interaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**:86-89.
60. **Sawada, H., L. D. Kuykendall, and J. M. Young.** 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**:155-179.
61. **Sene, M., C. Gallet, and T. Dore.** 2001. Phenolic compounds in a Sahelian sorghum (*Sorghum bicolor*) genotype (CE145-66) and associated soils. *J. Chem. Ecol.* **27**:81-92.
62. **Simon, R., U. Priefer, and A. Pühler.** 1983. A broad host range mobilization system for invivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**:784-791.
63. **van, R. P. and J. Vanderleyden.** 1995. The Rhizobium-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**:124-142.
64. **Vargas, M. C., S. Encarnacion, A. Davalos, A. Reyes-Perez, Y. Mora, S. A. Garcia-de los, S. Brom, and J. Mora.** 2003. Only one catalase, katG, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology* **149**:1165-1176.
65. **Vasse, J., F. de Billy, and G. Truchet.** 1993. Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The plant journal* **4**:555-566.
66. **Yamazaki, S., C. Morioka, and S. Itoh.** 2004. Kinetic evaluation of catalase and peroxygenase activities of tyrosinase. *Biochemistry* **43**:11546-11553.