



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**CENTRO DE CIENCIAS GENÓMICAS**

**MECANISMOS DE RESISTENCIA A CONDICIONES DE ESTRÉS  
POR ACIDEZ EN *Rhizobium tropici* CIAT 899.**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**

**M en C. JULIO GUERRERO CASTRO**

**TUTOR**

**DR. CHRISTIAN SOHLENKAMP (CCG)**

**MIEMBROS DE COMITÉ TUTOR**

**DR. LORENZO PATRICK SEGOVIA FORCELLA (IBT)**

**DR. PABLO VINUESA FLEICSHMANN (CCG)**

**CUERNAVACA MORELOS, MEXICO, OCTUBRE DE 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## **Biblioteca central**



El presente trabajo fue realizado en el grupo de interacciones entre pro y eucarionte en el laboratorio de II de Ecología genómica, dentro del programa de doctorado en ciencias biomédicas con sede en Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (CCG/UNAM), bajo la tutoría del Dr. Christian Sohlenkamp.

Durante el desarrollo de este proyecto, recibí apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de becario 220609, así como apoyo de los proyectos PAPIIT/UNAM (IN202413 y IN208116), y UC-MEXUS/CONACyT (CN-12-552). Así mismo agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a los congresos nacionales e internacionales, en donde se presentó este trabajo.

*A mí amada madre*

## Agradecimientos

Trataré de ser sucinto en este apartado. Antes que todo quiero agradecer a cada una de las personas que contribuyeron de alguna u otra manera en mi desarrollo profesional como alumno de doctorado, se que fueron bastantes, sin embargo si no cito a algunas no quiere decir que no los tengo presentes.

Mi primer agradecimiento es con mi familia porque aunque sé que no están presentes siempre están deseando que este bien donde quiera que ande (si, porque luego no sabían ni donde andaba). Mis padres Fernando Guerrero y Herlinda Castro que en paz descansen mi amada madre, a mis hermanos Ángeles, David (que en paz descansen también), Magda y Berna y a mis tíos, primos y sobrinos (que son como las UFCs, "incontables") gracias a todos.

Mi segundo agradecimiento es con Christian Sohlenkamp, por ser un buen jefe bien buena onda, aunque a veces teníamos puntos de vista diferentes siempre la supimos llevar y creo que eso fue bueno porque culminamos este trabajo (si, este trabajo es tan suyo como mío). Gracias por aceptarme en tu grupo e impulsarme cada qué vez que quería "tirar la toalla" (muy común cuando estudias un PhD).

Mi tercer agradecimiento (y de aquí voy a dejar de enumerar porque si no me terminaré la numerología) es a mi comité tutorial: Lorenzo Segovia y Pablo Vinuesa. Ellos se encargaron de evaluarme y criticarme todo mi trabajo y decirme en que estaba mal y que estaba bien y porque no, también en felicitarme (de vez en cuando) durante todo el trayecto. Gracias porque con sus aportaciones pudimos pulir mejor el trabajo.

A Luis Lozano por enseñarme un poco de bioinformática, aunque no fue mucho pero lo que se, es gracias a él. Además de su valioso tiempo que siempre le dedicaba a nuestros análisis.

Quiero agradecer al Dr. Otto Geiger porque a pesar de no pertenecer como tal a su grupo, recibí un gran apoyo de su parte y además por confiar en mí y contratarme en su grupo durante algún tiempo.

Estoy seguro que este párrafo será el más grande, porque quiero expresar mis más sinceras gracias a todo el grupo de Ecología genómica: Dra. Esperanza Martínez, Dra. Isabel López, Dra. Mónica Rosembueth, Dra. Ivonne Toledo, Julio Martínez. A los compañeros lipidólogos, Lourdes Martínez, Ángeles Moreno,

Miguel Ángel Guzmán (las técnicas del laboratorio que siempre organizan todo, "todo"), América Córdoba, Jonathan Padilla, Jessica Cuevas, Jhonatan Olea, Gibrán Orozco, Elva Quiroz, Nancy Montiel, Leslie Rivas, Giovanni (Gyo), Juan García, Antonio Alemán, Maritza Guzmán y también a los que ya no están en el laboratorio pero que formaron parte de esto gracias. Al grupo de los esperanzos: Tonalli García, Diana Montes, Violeta Mattus, Rafael Bustamante, Víctor Higareda, Yessica González, José Luis Aguirre, Lorena Gómez, Marco Antonio Rogel y también a los que ya están buscando un mejor futuro gracias; porque si, todos somos efímeros. También quiero agradecer en este espacio a mis alumnetos: Nathalia, Ricardo Martínez, Alejandro Andrade, Jennyfer Michelle y por último (en este espacio) a doña Araceli, Don Martín, Lucy (que se nos adelantó de este mundo que llamamos vida), Manuel y al nuevo secre Gerardo. Como ven es muy grande este grupo (si no me equívoco, uno de los más grandes del CCG).

A la coordinación de Pablo Vinuesa y Gladys Avilez por su apoyo y paciencia y por qué no, también a la nueva coordinación a cargo de la Dra. Susana Brom.

Al comité revisor de tesis que se me asignó: Dra. Beatriz Eugenia Baca (mi ex-asesora de tesis de maestría), Dr. Luis David Alcaraz (un gran investigador que estuvo desde cuando ingresé al doctorado, evaluación de candidatura y ahora revisor), Dr. Miguel Ángel Ceballos (por escucharme siempre y sus muy buenos aportes, muchas gracias), Dr. Diego González Halphen (gracias por sus buenos comentarios) y al Dr. Christian Sohlenkamp (bis). Gracias a todos por tomarse el tiempo de leer y corregir el presente manuscrito.

A mis amigos que fui encontrando en este camino: Hector Hugo Torres, Andreí, Omar Collazo, Susana Rodríguez (siempre creyeron que estábamos en el mismo lab), Irma Martínez, Alex Lima, Zeús Saldaña, Carmén Contreras, Damien Formey y Marlene, Alex Thromas, a todos los amigos del basket y del volley ball. A Oussama Bellahsen, que aunque apenas llegó ya se convirtió en un gran amigo. A todos mis amigos mazorcones (Leo, Katy, Tania, Anita, Claire, Eudith, Yoab Yael, Paco, Tony, Emma, David Arias, Luis Iván, Omar, Andreí, Pedro, Nino, Luish y Nazario).

A uno de mis mas grandes amigos Haydn Esaú Urbina Marure, gracias por todo tomodachi y a su mamá que se ha convertido en una consejera para mi (Doña Maru).



A todos mis amigos del COBACH 8, de la UACQB de la UAGRO, la maestría en la BUAP y ahora los de la UNAM. Y a todos los amigos de Ayutla Guerrero, el terruño que me vio nacer.

Por último quiero agradecer de manera especial a mí amada madre quien se esforzó cada uno de sus días para tener un hijo profesionalista, a un hijo de bien como decía ella, y aunque no estará presente para ver uno más de mis logros, se que estás conmigo porque su esencia vive en mí, siempre vivirás en mí, porque eres uno de mis mas grandes ejemplos a pesar de todos los obstáculos con que nos encontrábamos. Siempre supiste como solucionar esos problemas y mi admiración hacia ti crecía y crecía porque a pesar de que mi madre carecía de toda educación, salvo de la experiencia, la cual le permitió solucionar asuntos intrincados. Era una gran mujer, una mujer auténtica, sincera, valiente y generosa; en toda la extensión de la palabra, una gran madre y una gran abuela, por eso y más viviré eternamente agradecido contigo querida y amada madre.

#MamaYaComi

## CONTENIDO

Agradecimientos.....	5
Contenido .....	6
Abreviaturas .....	8
Figuras y tablas.....	10
Resumen.....	11
Abstract .....	12
1. Introducción .....	13
1.1 Familia <i>Rhizobiaceae</i> .....	14
1.2 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.....	18
1.2.1 Genoma de CIAT 899.....	19
1.2.2 Cromosoma .....	19
1.2.3 Plásmido A .....	20
1.2.4 Plásmido B .....	20
1.2.5 Plásmido C .....	21
1.3 Estrés por acidez.....	22
1.3.1 Respuesta ATR y XAR .....	22
1.3.2 Sistema de descarboxilación de aminoácidos .....	23
1.3.3 Sistema ureasa.....	27
1.3.4 Bombeo de protones por la ATPasa F <sub>1</sub> -F <sub>0</sub> .....	28
1.3.5 Modificación de la membrana celular .....	28
1.3.6 Protección o reparación de macromoléculas.....	29
1.3.7 ¿Cómo sensan las bacterias una fluctuación en la concentración de protones?.....	30
2. Antecedentes .....	33
3. Objetivos .....	36
3.2 General .....	36
3.3 Específicos.....	36
4. Materiales y métodos .....	37
5.1 Cepas y plásmidos usados en este estudio .....	37

5.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	37
5.3 Mutagénesis por transposón Tn5.....	37
5.4 Aislamiento de ADN genómico.....	38
5.5 Análisis de transconjugantes Tn5 para verificar inserción azarosa del transposón .....	38
5.6 Identificación del sitio de inserción por iPCR o DCS.....	38
5.7 Complementación de dos mutantes sensibles a acidez.....	40
5.8 Aislamiento, purificación e integridad de ARN .....	41
5. Resultados .....	42
6.1 Resultados adicionales .....	68
6.1.1 Mutagénesis por transposón .....	68
6.1.2 Aislamiento, purificación y calidad de ARN.....	69
6.1.3 Complementación de dos mutantes Tn5 sensibles a acidez .....	70
6. Discusión .....	72
7. Conclusión .....	78
8. Perspectivas .....	79
9. Referencia citada .....	80
10. Apéndices .....	93
11.1 Medios de cultivo LB, PY, MM y MAM .....	93
11.2 Southern blot.....	94
11.3 Aislamiento de ADN genómico.....	96
11.4 Purificación de ARN por kit de QIAGEN modificado .....	97

## Abreviaturas

aa-PG	Aminoacil fosfatidil glicerol
Ant	Antiporter
Arg	Arginina
ATP	Adenosín trifosfato
ATR	Respuesta de tolerancia adaptativa
BGN	Bacterias Gram negativas
BGP	Bacterias Gram positivas
CDS	Coding Sequence, región de DNA que es traducida a proteína
CFA	Ácidos grasos con ciclopropano
CIAT	Centro de Investigación de Agricultura Tropical
DCS	Digestión-clonación-secuenciación
DEGs	Genes diferencialmente expresados
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPS	Exopolisacárido
F0	Región hidrofóbica de la ATPasa
F1	Región hidrofílica de la ATPasa
FBN	Fijación biológica del nitrógeno
GABA	Ácido gamma butírico
GC	Guanina-Citocina
Glu	Glutamato
HK	Cinasa histidinica
iPCR	PCR inversa
JG000001	Mutante Tn5 número 1 (cualquier número después de JG indica la posición en la biblioteca de mutantes Tn5)
LPG	Lisil fosfatidil glicerol
LPS	Lipopolisacárido
Lys	Lisina
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MAM	Medio mínimo ácido
MM	Medio mínimo
NH <sub>3</sub>	Amoniacó
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Amonio
OLs	Lípidos de ornitina
Orn	Ornitina
pA	Plásmido A o pRtrCIAT899a
pB	Plásmido B o pRtrCIAT899b (pSym)
pC	Plásmido C o pRtrCIAT899c
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
PLP	Piridoxal-5'-fosfato
RIN	Número de integridad de RNA
RMN	Resonancia magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa
RNA-seq	Secuenciación de RNA
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RR	Regulador de respuesta
rRNA	RNA ribosomal

RT CIAT 899	<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	
TCS	Sistema de dos componentes	
TE	Tris-EDTA(tris(hydroxymethyl)aminomethane-Ethylene amine tetraacetic acid).	di
Tn5	Transposón Tn5	
tRNA	RNA de transferencia	
UFA	Ácidos grasos insaturados	
XAR	Resistencia a acidez extrema	
YM	Yeast medium	
$\sigma^B$	Subunidad sigma alternativa de la RNAP	
$\sigma^S$	Subunidad sigma S o RpoS	

## Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de adhesión y colonización de <i>Rhizobia</i> a raíces de leguminosas.....	16
Figura 2. Relación filogenética de <i>Rhizobium</i> y otros miembros de la familia <i>Rhizobiaceae</i> .....	18
Figura 3. Plásmido simbiótico tropici .....	21
Figura 4. Mecanismos de resistencia a acidez en BGN y BGP.....	25
Figura 5. Sistema de descarboxilación de aminoácidos.....	28
Figura 6. TCS ArsRS de <i>H. pylori</i> .....	33
Figura 7. Biosíntesis de OLS y crecimiento de una mutante en el gen <i>olsC</i> de CIAT 899 .....	36
Figura 8. Estrategia para amplificar secuencias de DNA flanqueantes del Tn5 mediante iPCR. ....	41
Figura 9. Hibridación tipo southern blot de 10 mutantes escogidas al azar .....	71
Figura 10. Calidad e integridad de las muestras de ARN que se secuenciaron....	72

## Índice de tablas

Tabla 1. Especificidad entre <i>Rhizobium</i> -leguminosa.....	17
Tabla 2. Características del genoma de <i>R. tropici</i> CIAT 899.....	20
Tabla 3. Mecanismos de respuesta a estrés por acidez en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas .....	27
Tabla 4. Plásmidos utilizados para la complementación de dos mutantes sensibles a acidez.....	39
Tabla 5. Iniciadores usados para amplificar genes de mutantes JG2646 Y JG9587 .....	42
Tabla 6. Mutantes por transposón no descritas en el artículo y mutantes JG2646 y JG9587 complementadas .....	70

## Resumen

*Rhizobium tropici* CIAT 899 es una  $\alpha$ -proteobacteria que habita en el suelo y en la rizósfera. Es capaz de realizar simbiosis con algunas plantas leguminosas como por ejemplo con frijol común, durante la cual se induce la formación de unas estructuras peculiares llamadas nódulos en las raíces. En estas estructuras se lleva a cabo la fijación biológica del nitrógeno (FBN). *R. tropici* CIAT 899 es un buen modelo para estudiar mecanismos de resistencia a estrés por acidez, ya que es resistente a este y a otros tipos de estrés como lo son la resistencia a temperaturas elevadas, a los metales pesados, a diversos antimicrobianos y algunos pesticidas. Hasta la fecha se conoce relativamente poco sobre los determinantes genéticos/moleculares responsables de a esta respuesta. El objetivo principal de esta investigación es identificar el conjunto de genes involucrados en la respuesta a condiciones de acidez de esta cepa.

Con esta finalidad, se emplearon dos enfoques diferentes: una mutagénesis por transposón y un análisis transcriptómico; 1. Con el propósito de encontrar genes esenciales para la respuesta al estrés por acidez, se hizo un escudriño de un banco de mutantes por transposón derivado de *R. tropici* CIAT 899, para identificar aquellas mutantes que además crecen de manera similar a la cepa silvestre en condiciones de pH neutro, pero que crecen en condiciones de pH ácido. También se analizaron los transcriptomas de bacterias crecidas a pH neutro con bacterias adaptadas a condiciones ácidas y bacterias expuestas a un choque por acidez mediante RNA-Seq usando la tecnología de Illumina HiSeq 2500. Los resultados indican que *R. tropici* CIAT 899 muestra una respuesta multi-variada: en la mutagénesis por transposón se encontraron genes de metabolismo, reguladores transcripcionales, antiporters o reguladores de respuesta, así como genes que previamente se habían reportado como genes de respuesta a acidez. No obstante, el análisis de RNA-seq mostró que en este proceso participan un abanico mas grande de genes, dado que además de los ya mencionados encontramos genes que participan en mecanismos de defensa, de transporte, de transducción de señales, que participan en la biogénesis de la envoltura celular, chaperonas, entre otros. Estos resultados contribuyen a la comprensión de los mecanismos genéticos y

moleculares acerca de la respuesta que presenta esta bacteria para hacer frente al estrés por acidez.

## **ABSTRACT**

*Rhizobium tropici* CIAT 899 is an alpha-proteobacterium that inhabits soil and rhizosphere. It is able to perform a symbiosis with some legume plants such as common bean, during which, peculiar structures called nodules are formed on the roots; in later stages in these structures, biological nitrogen fixation (FBN) is carried out.

This strain is resistant to several kinds of stress. We considered it a good model to study acid stress resistance, but it is also resistant to high temperatures and heavy metals, antimicrobials and some pesticides. To date, little is known about the genetic and molecular determinants that contribute to this response. Therefore, the main objective of this research was to identify the set of genes involved in the response of this symbiont to acidic conditions.

Two different approaches were used, a transposon mutagenesis by Tn5 and transcriptional analysis by RNA-seq: first of all, to find genes essential for the acid stress response, a Tn5 mutant library derived from the wild strain *R. tropici* CIAT 899 was screened for mutants that grow as the wild strain under neutral pH conditions. Second of all, the transcriptome of this strain grown at neutral pH was compared with the transcriptomes of bacteria adapted to acidic conditions and exposed to acid shock by RNA-Seq using Illumina HiSeq 2500 technology. The results indicate that *R. tropici* CIAT 899 shows a complex response by the transposon mutagenesis approach we identified metabolism genes, transcriptional regulators, antiporter or response regulators, as well as genes that had previously been reported as acid-responsive genes. However, by the RNA-seq analysis additionally genes for defense mechanisms, transport, signal transduction, involved in the biogenesis of the cell envelope, chaperones, among others, were identified. These results, contribute to the understanding of genetic and molecular mechanisms about the response of this bacterium to cope with acid stress.



## 1. Introducción

Los ambientes naturales albergan una colección sorprendente de microorganismos. En estas comunidades las bacterias habitan ambientes que pueden ir desde una simple gota de agua, hasta un ambiente más complejo como la rizosfera. Sin embargo, dado que cada ambiente tiene características muy particulares, las bacterias no solo necesitan adaptarse a estos ambientes sino también enfrentar estos entornos desfavorables o estresantes (Browne & Dowds, 2001). Se le llama estrés a aquellas condiciones que amenazan la supervivencia de la célula, los cuales generan cambios adaptativos transitorios, la respuesta específica al estrés, que permiten a la célula sobrevivir. Por ejemplo, podemos citar el estrés por limitación de nutrientes, una variedad de estreses abióticos como temperaturas no óptimas, pH, osmolaridad o estrés oxidativo por especies reactivas de oxígeno (ROS por sus siglas en inglés), metales iónicos tóxicos, y radiación; así como predación por bacteriófagos, bacterias o protozoarios (Rouquette, 1998). Estos cambios ambientales conllevan a la bacteria a desarrollar estrategias para contrarrestar o en su caso adaptarse al ambiente. Una estrategia es inducir una respuesta estrés-específica (por ejemplo ROS) y reparar el daño que ha ocasionado molecularmente (ácidos nucleicos, proteínas o membranas). Sin embargo, muchas condiciones estresantes inducen una respuesta al estrés general compleja, la cual ocasiona que las bacterias resistan a diversos estreses, de tal manera que el daño ocasionado pueda prevenirse antes de ser reparado. Además, este tipo de respuesta general también sirve para que la célula active mecanismos a diversos estreses (Storz & Hengge-Aronis, 2000). La respuesta a estrés general se ha vastamente estudiado en organismos modelo como *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, y por ello sabemos que, una característica común de respuesta al estrés general es usar las subunidades sigma de la RNA polimerasa (RNAP) como reguladores maestros. En el caso de *B. subtilis* (o bacterias Gram positivas, BGP) el regulador maestro es sigma B ( $\sigma^B$ ), una subunidad sigma alternativa de la RNAP controlado por un mecanismo que involucra factores anti y anti-anti sigma. En el caso de bacterias Gram negativas (BGN) como *E. coli*, éstas frecuentemente usan la subunidad sigma S ( $\sigma^S$ , también llamado  $\sigma^{38}$  o RpoS)

como regulador maestro de respuesta a estrés general (Stortz & Hengge-Aronis, 2000).

En nuestro proyecto nos enfocamos en la respuesta a estrés por acidez (generalmente se da cuando el pH baja de 7), la cual ocurre cuando en el ambiente hay un incremento en la concentración de protones. Para hacer frente a este estrés, en diferentes bacterias se han descrito estrategias como bombear protones activamente, reparación o protección de macromoléculas, producción de amonio y reacciones de descarboxilación de aminoácidos específicos que consumen protones. Estas estrategias causan un aumento del pH intracelular o evitan que disminuya el pH citoplasmático, disminuyendo así los efectos perjudiciales de los protones como daño al ADN, daño a la membrana, mal plegamiento de las proteínas o una actividad enzimática disminuida (Lund et al., 2014). Específicamente trabajamos con el modelo *Rhizobium tropici* CIAT 899 (RT CIAT 899), el cual, a diferencia de otros *Rhizobiaceae* es resistente a múltiples estreses (Martínez-Romero et al., 1991) incluido el estrés por acidez (Riccillo et al., 2000; Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al., 2011; Vinuesa et al., 2003). Hasta la fecha, los mecanismos moleculares por los cuales RT CIAT 899 logra sobrevivir o adaptarse (a diferencia de otras bacterias) a un ambiente ácido son muy poco conocidos o no están suficientemente esclarecidos.

### **1.1 Familia *Rhizobiaceae***

La familia *Rhizobiaceae* pertenece al orden *Rhizobiales*, dentro de la clase alfarproteobacteria, en la que se incluyen géneros asociados con el suelo y otros asociados con plantas hospederas.

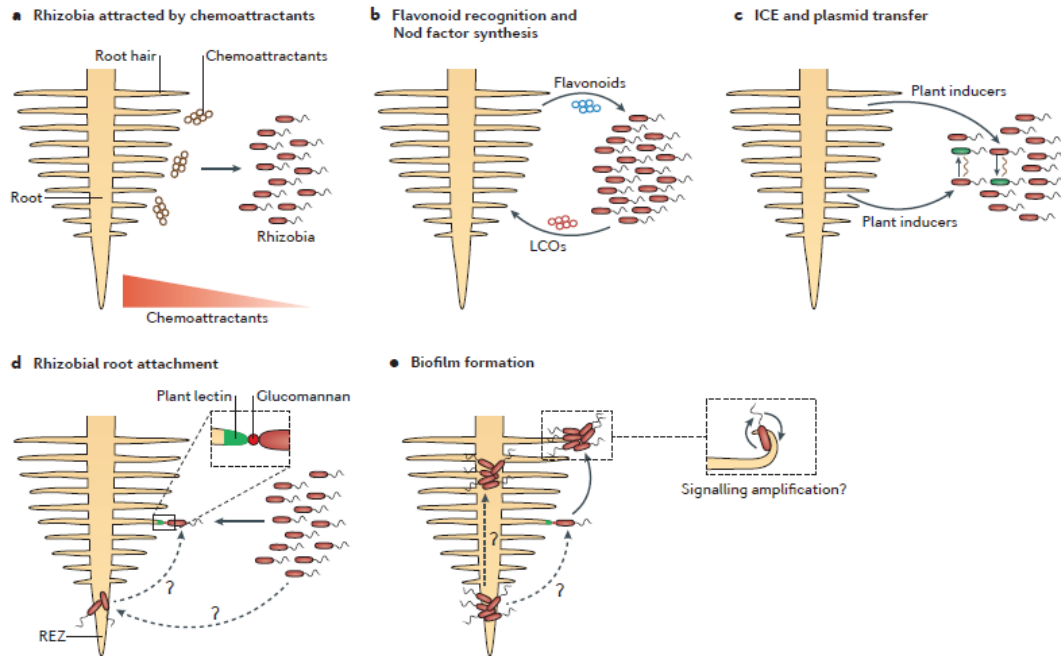
Los miembros de esta familia son predominantemente aeróbicos, presentan plásmidos (algunos muy grandes) en el que albergan genes que participan en la interacción con sus hospederos (Martínez-Romero et al., 1991; Ormeño-Orrillo et al., 2015; Poole, Ramachandran, & Terpolilli, 2018). Además, algunos miembros pueden establecer asociaciones simbióticas con plantas hospederas y realizar procesos como la fijación biológica del nitrógeno (FBN). En contraste, existen bacterias dentro de esta familia que son patógenos de plantas (por ejemplo,

*Agrobacterium tumefaciens*). Anteriormente se incluían 9 géneros dentro de la familia Rhizobiaceae, sin embargo, se hizo una re-clasificación basada en el análisis de la secuencia del gen 16S rRNA donde ahora se incluyen 4 géneros y que son: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* y *Phyllobacterium* (Carrareto-Alves et al., 2014). *Rhizobium* es un género representativo de la familia, dado que engloba una gran número de especies (Carrareto-Alves et al., 2014), algunas de las cuales se pueden observar en la figura 2.

Las rizobia son bacterias que nodulan y fijan nitrógeno, en las raíces de las leguminosas. La formación del nódulo inicia cuando la planta libera quimioatrayentes, principalmente flavonoides. Dichas moléculas inducen a los genes de nodulación (*nod*), responsables de la síntesis de lipoquitooligosacáridos, mejor conocidos como factores Nod, los cuales son detectados por las leguminosas en donde posteriormente se induce la organogénesis (formación del nódulo). Enseguida la bacteria se adhiere a los pelos radiculares los cuales adoptan una forma enrollada para atrapar a la rizobia (figura 1). Posteriormente se inicia lo que se llama hilo de infección, por donde viajarán los rizobia al primordio del nódulo. Una vez dentro de la célula vegetal se diferenciarán a bacteroides, los cuales junto con la membrana de la planta forman el simbiosoma (Poole et al., 2018). Este ambiente es propicio para que la nitrogenasa pueda reducir  $N_2$  a amonio (Gage, 2004; Gibson et al., 2008). Generalmente los nódulos de las leguminosas se clasifican como indeterminados y determinados, con respecto al crecimiento; los nódulos que mantienen el tejido meristemático son indeterminados, mientras que los determinados son aquellos que tienen un meristemo trasciente; el tipo de nódulo va a depender de la planta hospedera (Andrews & Andrews, 2017).

Es sorprendente la especificidad en la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa (tabla 1) y es por esto que es una de las simbiosis mejor estudiadas. El rango de especies de leguminosas que será capaz de nodular un rizobio va a depender de los factores Nod que produzca. Generalmente, el esqueleto de los factores Nod es similar en todos los rizobia (difieren en la longitud o saturación de la cadena de ácido graso), sin embargo las decoraciones que presentan son las que dan la especificidad con las leguminosas, por ejemplo pueden presentar acetilaciones,

glucosilaciones, metilaciones y sulfataciones. La percepción de estos factores en la leguminosa, esta dada por los receptores de factores Nod localizados en la membrana plasmática (figura 1).

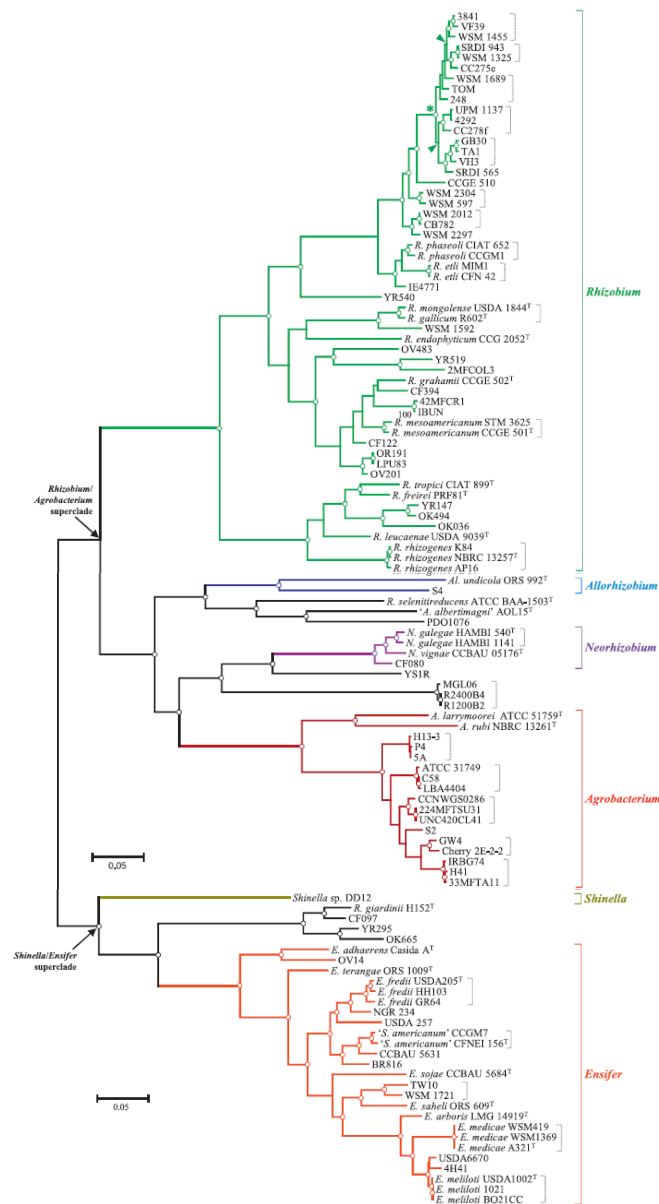


**Figura 1. Mecanismo de adhesión y colonización de Rhizobia a raíces de leguminosas.** En a) se muestra la quimioatracción de rhizobia a través de los exudados radiculares de la planta, b) Inducción por los flavonoides, c) Los inductores de las plantas en los exudados radiculares disparan la transferencia de elementos conjugativos e integrativos (ICE), d) las bacterias se adhieren a la zona de elongación de la raíz (REZ) o a los pelos radiculares (aún hay incertidumbre al respecto) y se produce el enrollamiento (en pelos radiculares) para que se forme el hilo de infección. A pH ácido, el glucomanano polar de rizobia (rojo) se une a las lectinas de la punta del pelo radicular y e) las rizobia forman una biopelícula sobre la superficie de la raíz o sobre los pelos radiculares los cuales involucran proteínas Raps, EPS y fibrillas de celulosa. Tomada de Poole et al., 2018.

**Tabla 1. Especificidad entre *Rhizobium*-leguminosas.** Tomada de Poole et al., 2018.

Rhizobia*	Plant host species	Bacterial class
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>	Alphaproteobacteria
<i>Azorhizobium doebereineriae</i>	<i>Sesbania virgata</i>	Alphaproteobacteria
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i>	Alphaproteobacteria
<i>Bradyrhizobium</i> spp.	<i>Cajanus cajan</i> , <i>Glycine max</i> , <i>Aeschynomene americana</i> , <i>Aeschynomene indica</i> , <i>Aeschynomene rudis</i> , <i>Arachis duranensis</i> and <i>Arachis hypogaea</i>	Alphaproteobacteria
<i>Burkholderia</i> spp.	<i>Mimosa pudica</i>	Betaproteobacteria
<i>Cupriavidus</i> sp. AMP6	<i>Mimosa asperata</i>	Betaproteobacteria
<i>Cupriavidus taiwanensis</i>	<i>Mimosa pudica</i>	Betaproteobacteria
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> and <i>Medicago truncatula</i>	Alphaproteobacteria
<i>Mesorhizobium haukuui</i>	<i>Sesbania sesban</i>	Alphaproteobacteria
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus japonicus</i> and <i>Lotus corniculatus</i>	Alphaproteobacteria
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Alphaproteobacteria
<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Alphaproteobacteria
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Alphaproteobacteria
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i> spp.	Alphaproteobacteria
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Lens culinaris</i> , <i>Vicia cracca</i> , <i>Vicia hirsuta</i> and <i>Vicia faba</i>	Alphaproteobacteria
<i>Rhizobium</i> sp. strain IRBG74	<i>Sesbania cannabina</i> , <i>Sesbania bispinosa</i> , <i>Sesbania cannabina</i> , <i>Sesbania exasperata</i> , <i>Sesbania formosa</i> , <i>Sesbania grandiflora</i> , <i>Sesbania madagascariensis</i> , <i>Sesbania macrantha</i> and <i>Sesbania pachycarpa</i>	Alphaproteobacteria
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Alphaproteobacteria
<i>Sinorhizobium fredii</i> NGR234	112 genera	Alphaproteobacteria
<i>Sinorhizobium fredii</i> USDA257	79 genera	Alphaproteobacteria
<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Medicago sativa</i> and <i>Medicago truncatula</i>	Alphaproteobacteria

Los rhizobia pueden sobrevivir a menudo a condiciones adversas, en el suelo y además competir con la microbiota de la rizósfera antes de establecer una simbiosis. Uno de los rizobios modelo para estudiar algún tipo de estrés es CIAT 899 (Del Cerro et al., 2017; Fernandez-Aunián et al., 2010; Ferreira et al., 2012; Martínez-Romero et al., 1991; Ormeño-Orrillo et al., 2012, 2015; Pérez-Montaño et al., 2016; Riccillo et al., 2000; Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al., 2011; Vinuesa et al., 2003), el cual es mutiresistente a diversas condiciones estresantes en comparación con otras rhizobia que nodulan al frijol común.



**Figura 2. Relación filogenética de la familia Rhizobiaceae.** Se muestran 113 cepas secuenciadas de la familia Rhizobiaceae. El nivel de género se muestra por cada color, abreviaciones de los géneros: R, *Rhizobium*; A, *Agrobacterium*; Al, *Allorhizobium*; S, *Sinorhizobium*; E, *Ensifer*, N, *Neorhizobium*. El árbol se construyó usando un alineamiento concatenado de 384 proteínas conservadas en el cromosoma de todos los genomas que se usaron. Tomada de Ormeño-Orrillo et al., 2015.

## 1.2 *Rhizobium tropici* CIAT 899

*Rhizobium tropici* CIAT 899 (tro' pi. ci. Gr. n. *tropikos*, tropics; N. L. gen. n. *tropici*), es un diazótrofo que se aisló de nódulos de frijol común (*Phaseolus vulgaris*) en el Centro de Investigación de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia. Se relaciona filogenéticamente con la cepa PRF 81, aislada en el estado de Paraná, Brasil. A la CIAT 899 se le considera una bacteria promiscua dado que

pueden nodular a varias especies de leguminosas (Hungria et al., 2000a; Martínez-Romero et al., 1991). Se ha reportado que esta cepa, además de asociarse con leguminosas, también promueve el crecimiento de plantas de maíz (Mónica Rosenblueth & Martínez-Romero, 2004).

Dentro de las características morfológicas de esta cepa: son bacilos que miden de 0.5 a 0.7 por 1.5 a 2  $\mu\text{m}$  de longitud, son peritricos y producen ácido en medio YM, el tiempo de duplicación es de 1.6-2 h a 30° C en medio YM. Crecen en medio mínimo adicionado con lactosa, resistente a ácido nalidixico, son móviles en agar suave y aeróbicos. Las colonias crecen circulares, convexas y semitraslúcidas, usualmente llegan a medir de 2 a 4 mm de diámetro en un periodo de 2 a 4 días. El pH óptimo de crecimiento es de 5 a 7, sin embargo CIAT 899 puede crecer en medios a pH 4, y la temperatura más elevada a la que puede crecer es 42° C; además, es resistente a metales y a varios antibióticos (Martínez-Romero et al., 1991).

### **1.2.1 Genoma de *R. tropici* CIAT 899**

#### **1.2.2 Cromosoma**

CIAT 899 tiene un genoma compuesto por un cromosoma (3,837,060 pb) y 3 plásmidos; el mega plásmido de 2,083,197 pb (pRtrCIAT899c), el segundo plásmido mas grande es el simbiótico (pSym) con 549,467 pb y el mas pequeño de los 3 (pRtrCIAT899a) contiene 216,610 pb, el pSym a diferencia de los otros dos plásmidos es el que tiene un menor contenido de guanina-citocina, otras características generales del genoma se pueden observar en la tabla 2.

El cromosoma codifica genes esenciales, como metabolismo central, procesos celulares y metabolismo de DNA. Ningún gen esencial se encontró en los plásmidos simbiótico y pA, sin embargo, en pC codifica 45% de toda la capacidad de transporte del genoma, 37% de funciones reguladoras y 34% de metabolismo relacionado a energía (Ormeño-Orrillo et al., 2012).

CIAT 899 y PRF81 están filogenéticamente cercanas formando un clado con *R. rhizogenes* K84, debido a esta relación tan cercana comparten un alto número de genes ortólogos (Ribeiro et al., 2009, Moore et al., 1987). Otro hecho que

demuestra la cercana relación filogenética entre estas cepas fue el alto número de genes sinténicos no solo en el cromosoma, sino también en los pSyms.

**Tabla 2. Características del genoma** y número de genes predichos para CIAT 899. Tomada y modificada de Ormeño et al., 2012. pB = plásmido simbiótico.

Característica	Cromosoma	pC	pB*	pA	Genoma
Tamaño (Mb)	3.8	2.08	0.55	0.22	6.69
G + C (%)	59.9	59.4	57.6	58.6	59.5
Número de genes predichos	3734	1905	500	212	6351
CDS	3672	1905	500	212	6289
tRNA	53	-	-	-	53
rRNA	9	-	-	-	9

### 1.2.3 Plásmido A

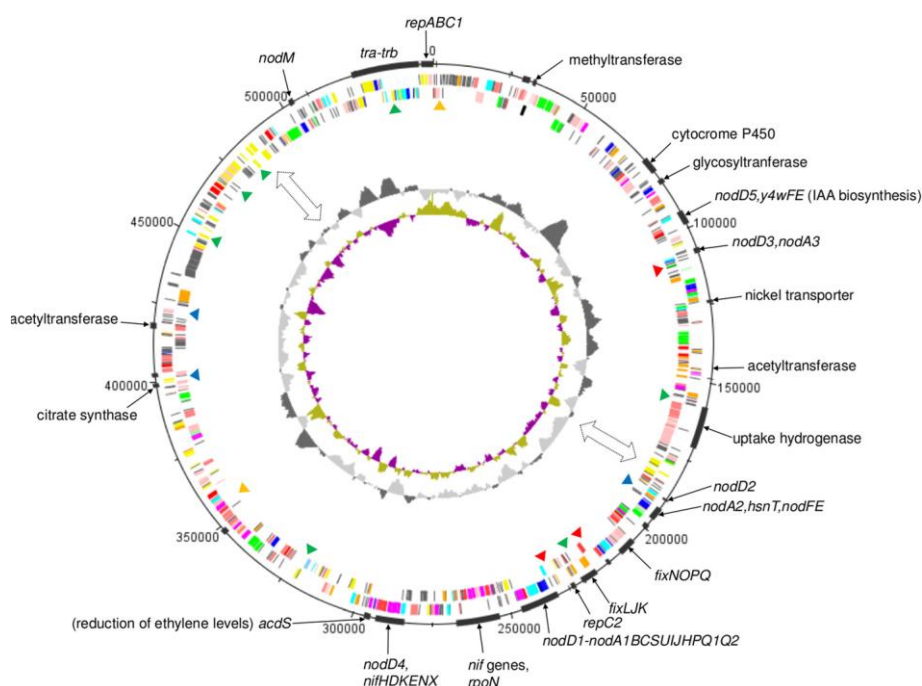
El plásmido A o pRtrCIAT899a es auto-transmisible, alberga genes como *tra/trb*, los cuales están cercanamente relacionados a varios sistemas de conjugación incluyendo los que se encuentran presentes en los plásmidos de *R. etli* CFN42 y *S. fredii* GR64 (p42a y p64a, respectivamente), a diferencia de pRF81b que no posee genes *tra* y por lo tanto ha perdido la capacidad de ser auto transmisible. Anteriormente se había demostrado que en este plásmido se localizan genes *teu*, que codifican un sistema de transporte ABC para la captación de azúcar, el cual se induce por los exudados radiculares de frijol común y *Macroptilium atropurpureum*, los cuales se requieren para la competitividad en la nodulación (Rosenblueth et al., 1998). Además, en este plásmido se encuentran dos copias de genes *cfa*, los cuales son requeridos para sintasas de ciclopropano de ácidos grasos, requeridos para la modificación de fosfolípidos, probablemente para reducir la permeabilidad membranal.

### 1.2.4 Plásmido B

El plásmido B, también llamado plásmido simbiótico (pSym), alberga los genes simbióticos que le dan la capacidad de nodular a mas de una leguminosa, tal y como lo hace *R. leucaena* CFN 299, ya que ambas cepas producen factores Nod similares (Hungria et al., 2000b). El plásmido B se ha designado como “plásmido simbiótico tropici”, ya que tanto CIAT 899, PRF 81 y CFN 299 tienen un alto porcentaje de identidad de secuencia, y por lo tanto todos los genes son 100% idénticos en nucleótidos; además, existe un alto nivel de sintenia entre los



plásmidos de estas 3 cepas, lo cual probablemente indica una reciente diseminación de este plásmido; la única diferencia entre los plásmidos de estas 3 cepas son la presencia o ausencia de secuencias de inserción (figura 2).



**Figura 3. “Plásmido simbiótico tropici”** (pB o pSym). Representación de uno de los 4 replicones de *R. tropici* CIAT 899, este plásmido alberga los genes necesarios para la nodulación y FBN característicos en las rizobia. Los círculos (del mas interno al más externo) indican oblicuidad de GC, contenido de GC, localización de las secuencias de inserción (verde, CIAT 899; azul, PRF 81 anaranjado, CFN 299), genes en reversa y genes delantero y localizaciones de algunos genes (círculo externo en gris). Tomada de (Ormeño-Orrillo et al., 2012).

pSym alberga, además de los genes requeridos para la nodulación, genes de fijación de nitrógeno, así como dos sistemas de replicación (*repABC1* y *repC2*), además de genes que podrían mejorar la capacidad simbiótica de la cepa como *nodM*, una hidrogenasa y genes para la biosíntesis de fitohormonas (figura 2); así mismo posee la mayoría de transposasas presentes en el genoma de CIAT 899 y PRF 81.

### 1.2.5 Plásmido C

Este megaplásmido contiene genes esenciales que generalmente se encuentran en el cromosoma, tales como los genes para la biosíntesis de cobalamina, por lo cual se puede considerar un crómido (Harrison et al., 2010; Ormeño-Orrillo et al.,

2012). Además, tiene genes que codifican para transporte, funciones reguladores o metabolismo.

### **1.3 Estrés por acidez**

¿Porqué las bacterias tienen un arsenal de mecanismos de protección contra el estrés por acidez? Tener mecanismos de defensa contra estrés por acidez, es de vital importancia ya que de esta manera evitan los efectos de las fluctuaciones de pH, ya sea fuera o dentro de un hospedero. Por ejemplo, en la preparación y preservación de alimentos, en el suelo o en la placa dental y/o el tracto gastrointestinal, o en el caso de los patógenos intracelulares dentro de los macrófagos (Lund et al., 2014).

Específicamente en el suelo, las comunidades microbianas viven sobre todo en la rizosfera (Poole et al., 2018), las cuales están influenciadas por la disponibilidad de nutrientes y los exudados radiculares de las plantas (Somers et al., 2004); particularmente cuando las plantas usan amonio como fuente de nitrógeno se liberan iones hidrógeno lo cual reduce el pH de la rizosfera (Hinsinger et al., 2003; Neumann & Martinoia, 2002; Nye, 1981). Entre otros factores que pueden modificar el pH de la rizosfera son la concentración de algunos metales como aluminio o incluso el  $\text{Fe}^{3+}$ , abundante en los suelos tropicales (Foy, 1988; Römheld & Marschner, 1986).

Las bacterias activan mecanismos en respuesta al estrés por acidez. Entre estos mecanismos se encuentra: el bombeo de protones, reparación o protección de macromoléculas, producción de amonio y reacciones de descarboxilación de aminoácidos específicos que consumen protones (Lund et al., 2014) (tabla 2). Cuando de estrés por acidez se trata se pueden diferenciar dos tipos de respuesta, la respuesta de tolerancia a acidez (ATR) o la respuesta de resistencia a acidez extrema dependiente de aminoácidos (XAR); discutidas en detalle a continuación.

#### **1.3.1 Respuesta ATR y XAR**

La respuesta ATR (acid tolerance response) se caracteriza por la inducción de proteínas a pHs medianamente ácidos no letales ( $\geq$  pH 3.0), las cuales van a

proteger a la bacteria a diversos cambios de acidez. Muchos microorganismos que se enfrentan a condiciones medianamente ácidas presentan este tipo de mecanismo; sin embargo, otras bacterias también poseen el mecanismo XAR (Amino acid-dependent extreme acid resistance), el cual permite a células no adaptadas sobrevivir a niveles muy ácidos, generalmente inferiores a pH 2.5 (Audia et al., 2001). Dicho de otra manera, los mecanismos ATR ayudan a mantener la homeostasis, mientras que mecanismos XAR previenen una caída del pH intracelular.

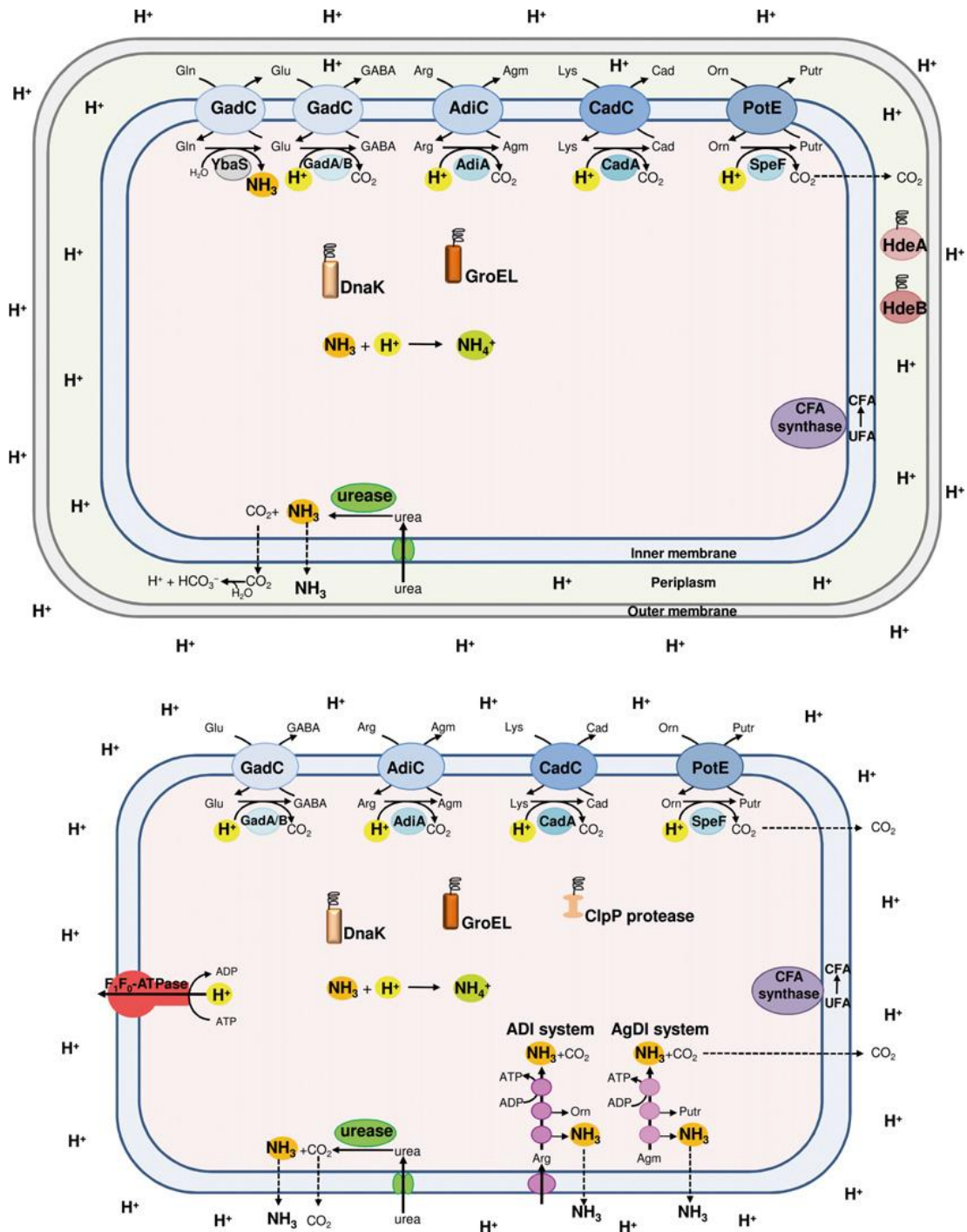
La respuesta ATR en bacterias entéricas como *E. coli* y *S. typhimurium* se ha estudiado en más detalle (Castanie-Cornet et al., 1999; De Biase et al., 1999; Foster & Hall, 1990, 1991; Richard & Foster, 2004), ambas bacterias precultivadas a un pH medianamente ácido resisten más cuando se cultivan a un pH ácido extremo, comparadas con aquellas células precultivadas a pH neutro (tabla 2). Esta misma respuesta la poseen los rhizobia (Draghi et al., 2010; Glenn et al., 1999; Graham et al., 1994), las cuales como se mencionó anteriormente, interactúan con leguminosas; esta interacción conlleva a que en etapas tardías de la simbiosis, la bacteria se enfrente a fluctuaciones de pH ácidos, no obstante, la capacidad para resistir a estas condiciones estresantes, determina su supervivencia dentro del nódulo (Alexandre & Oliveira, 2013).

Entre los mecanismos (tanto ATR como XAR) reportados a la fecha se pueden citar el bombeo de protones por la ATPasa  $F_1-F_0$ , el sistema de descarboxilación de aminoácidos, la formación de una nube protectora de amonio, alta actividad de la ureasa citoplasmática y reparación o protección de macromoléculas, son los mecanismos más comunes reportados en diversas bacterias Gram negativas como Gram positivas (tabla 2 y figura 4). Tales mecanismos se describirán a continuación.

### **1.3.2 Sistema de descarboxilación de aminoácidos**

La base del sistema de descarboxilación de aminoácidos es generar un consumo de protones intracelulares para contrarrestar los efectos del aumento de los mismos. Se han descrito 4 sistemas de descarboxilación de aminoácidos, cada uno de los cuales se conforma por dos componentes: una descarboxilasa

dependiente de piridoxal-5'-fosfato (PLP) que cataliza la descarboxilación de un aminoácido a un producto, más CO<sub>2</sub>; y una proteína antiporter que cataliza el intercambio de sustrato externo por productor interno (Castanie-Cornet et al., 1999; Foster, 2004; Kanjee & Houry, 2013; Lund et al., 2014). Estos sistemas dependientes de aminoácidos están presentes en una gran variedad de bacterias como son *E. coli*, *Shigella flexnerii*, *Listeria monocitogenes*, *Bacillus reuteri*, *Salmonella enterica* var. Typhimurium, *Vibrio cholerae*, *Brucella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Yersinia enterocolitica* (Cotter et al., 2005; Kieboom & Abee, 2006; Lund et al., 2014; Merrell & Camilli, 1999; Occhialini et al., 2012; Park et al., 1996; Su et al., 2011; Waterman & Small, 2003). Tomando en consideración que se han descrito sistemas dependientes de glutamato, arginina, lisina y ornitina (figura 4) (Taylor & Gale, 1945); se describirá de manera sucinta el sistema dependiente de glutamato. Este sistema requiere de las descarboxilasas GadA/GadB y el antiporter de glutamato/GABA (ácido  $\gamma$ -butírico) GadC. En este sistema, el grupo carboxilo del glutamato es reemplazado por un protón proveniente del citoplasma, convirtiéndolo a ácido gama butírico (GABA) y CO<sub>2</sub>. El antiporter GadC exporta el GABA e importa más glutamato al interior de la célula (Fig. 5) (Kanjee & Houry, 2013). La hipótesis de este mecanismo para protección a acidez fue que la remoción de protones intracelulares causa un incremento del pH interno de la célula a niveles que no se dañan los componentes celulares, tal y como lo describe (Foster, 2004), donde se observó que el pH interno de *E. coli* era de 4.2 mientras que el del medio era de 2.5.

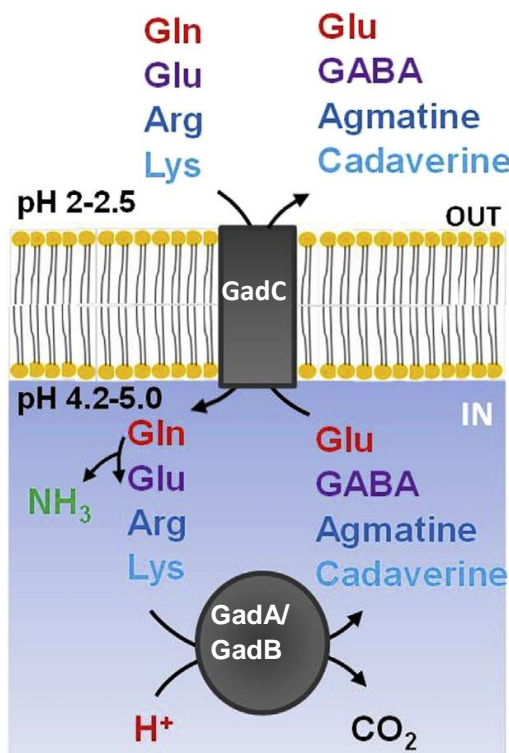


**Figura 4. Mecanismos de resistencia a acidez en bacterias Gram negativas (panel superior) y Gram-positivas (panel inferior).** Se muestran los sistemas de descarboxilación de aminoácidos (azul), el bombeo de protones a través del sistema ATPasa F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> por hidrólisis de ATP (rojo), el sistema ureasa (verde), chaperonas citoplásmicas DnaK y GroEL (anaranjado) y periplásmicas HdeA y HdeB (rojo oscuro) protegen a las proteínas de la degradación, mientras que Clp (café) remueve proteínas defectuosas, la sintasa CFA (morado) modifica ácidos grasos insaturados (UFA) a ácidos grasos con ciclopropano (CFA). Tomada de Lund et al., 2014.

**Tabla 3. Mecanismos de respuesta a estrés por acidez en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas.** XAR: Amino acid-dependent extreme acid resistance, ATR: Acid tolerance response. Tomada de Lund et al., 2014.

	Tipo de mecanismo	F1-F0 ATPasa	Descarboxilasa/ antiporter	Sistema deiminasa/deaminasa	Ureasa	Reparación de proteínas y proteasas	Modificaciones de la membrana celular.
<i>E. coli</i>	XAR/ATR	X	Glu, Lys y Arg.	Adenosin deaminasa y glutaminasa		HdeA, HdeB Hsp31	Chang and Cronan 1999
<i>S. entérica var. Typhimurium</i>	XAR/ATR	X	Arg, Lys y Orn			DnaK	Alvarez Ordoñez 2009
<i>V. cholerae</i>	ATR		Lys				
<i>H. pylori</i>	XAR				X	GroEL GroES	Haque et al 1996
<i>Brucella spp.</i>	XAR/ATR		Glu		X	DnaK, HdeA	
<i>P. mirabilis</i>	ATR		Glu		X		
<i>Y. enterocolitica</i>	ATR		Glu		X		
<i>L. monocytogenes</i>	XAR/ATR	X	Glu	ADI		Clp protease, GrpE	
<i>L. lactis</i>	XAR/ATR	X	Glu	ADI		ClpE, ClpP, GroEL, GroES, DnaK y GrpE.	
<i>Lactobacillus spp.</i>	XAR/ATR	X	Glu, Orn.	ADI-AgDI		ClpE, ClpL, GrpE, GroES, DnaJ	<i>L. casei</i>
<i>B. cereus</i>	ATR		Arg y Lys			DnaK, GroES, Clp protease	
<i>Streptococcus spp.</i>	ATR	X	-----	ADI-AgDI		RecA, AP endonucleasa, Ssb, UvrA, DnaK, RopA, GroEL, ClpL	<i>S. gordonii</i> , <i>S. salivary</i> y <i>S. mutans</i>
<i>Bifidobacterium spp.</i>	ATR	X	Glu				
<i>Clostridium spp.</i>	ATR		Glu			DnaK, GroES, GroEL, hsp90, hsp18, clpC y HtrA	

Estos valores de pH interno (pH 4.2) de la célula, concuerdan con el pH óptimo de funcionamiento de las descarboxilasas, sin embargo, esto dependía de la presencia o no de glutamato en el medio, ya que cuando hay glutamato en el medio las células logran sobrevivir mejor a este pH externo que cuando no lo hay en el medio. Este sistema es inducido en fase estacionaria, aunque también se ha descrito que se mantiene activo durante el crecimiento exponencial (Castanie-Cornet et al., 1999; Castanie-Cornet & Foster, 2001).



**Figura 5. Sistema de descarboxilación de aminoácidos.** Un esquema general de la descarboxilación de aminoácidos, en el caso de GadC, introduce glutamato extracelular y éste es convertido por GadA/GadB a GABA (antiporter), el cual es exportado hacia el periplasma, generando así un consumo de protones en el citoplasma De Biase & Lund., 2015.

### 1.3.3 Sistema ureasa

El sistema ureasa hidroliza la urea generando amoniacó (NH<sub>3</sub>) y carbamato, de la misma manera el NH<sub>3</sub> al combinarse con los protones intracelulares puede generar NH<sub>4</sub>, lo cual ocasiona un consumo de los protones (figura 6). Esta enzima requiere el ión níquel (Ni) como cofactor, consiste de 3 subunidades codificadas en un operon *ureCBA*. Este sistema además del requerimiento de la ureasa requiere de otras proteínas para la biogénesis de la ureasa, el transporte

y metabolismo de la urea y la incorporación de un ión Ni, los cuales se encuentran codificadas en el cluster (*ureDEFG*) (Lund et al., 2014). *H. pylori* es un sorprendente ejemplo que utiliza este sistema para adaptarse a un nicho muy peculiar, el estómago humano (cuyo pH oscila entre 1.5 y 3); este patógeno puede llegar a causar como es bien conocido, gastritis, úlcera péptica, linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT) (Zanotti & Cendron, 2010).

#### **1.3.4 Bombeo de protones por la ATPasa F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>**

La ATPasa es un complejo multi-enzimático localizado en la membrana plasmática, sus funciones principales pueden ser sintetizar ATP, a través de la energía liberada por la disipación del gradiente electroquímico de protones; o bombear protones hacia el espacio extracelular a través de hidrólisis del ATP. Consta de dos regiones, una región hidrofílica y una región hidrofóbica, F<sub>1</sub> y F<sub>0</sub> respectivamente; la región F<sub>1</sub> a su vez está compuesta por las subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , que en conjunto catalizan la hidrólisis del ATP, mientras que la región F<sub>0</sub> consta de las subunidades a, b y c, encargadas de la translocación de protones. En la tabla 2 se pueden observar algunas bacterias que emplean este sistema para regular su pH citoplasmático, el cual opera hidrolizando ATP y expeliendo protones al espacio extracelular, que conlleva a una homeostasis de pH (figura 3) que protege del daño por el aumento en la concentración de protones del medio al que esté expuesta (Liu et al., 2015; Lund et al., 2014).

#### **1.3.5 Modificación de la membrana celular**

Las membranas bacterianas están compuestas de una gran diversidad de lípidos, en su mayoría fosfolípidos o lípidos sin fósforo como en el caso de algunas bacterias, la membrana está alterada con lípidos sin fósforo (como los lípidos de ornitina, esfingolípidos o sulfonolípidos) (López-Lara & Geiger, 2017; Sohlenkamp & Geiger, 2015). Modificar los lípidos de membrana conlleva a una menor fluidez de la misma al paso de protones, por lo tanto, es de esperarse que los lípidos de membrana sufran alguna modificación en respuesta al estrés por acidez (o algún otro tipo de estrés). Un mecanismo que usan algunas bacterias para evitar esto es modificar sus UFAs a través de la adición de un grupo metilo al doble enlace del UFA (Lund et al., 2014) o como en el caso de *Streptococcus*



*mutans* (una bacteria que habita la cavidad oral), también cambia los ácidos grasos saturados de cadena corta por ácidos grasos de cadena larga monoinsaturados (Fozo et al., 2004). En *E. coli*, además de activar sistemas de descarboxilación, aumenta los ácidos grasos, los cuales constituyen los lípidos de membrana que generalmente contiene dos ácidos grasos, los cuales pueden ser saturados, insaturados, poliinsaturados o con ciclopropano para hacer menos permeable a la membrana (Brown et al., 1997). Otra barrera significativa a los protones son los lipopolisacáridos (LPS), los cuales se han correlacionado con resistencia a acidez en *Rhizobium* (Chen et al., 1993a; Chen et al., 1993b), otro caso es el de una mutante en el gen *wbcJ* de *H. pylori*, la cual pierde la capacidad de sintetizar LPS pero además disminuye su viabilidad a pH 3.5 (Booth et al., 2002).

### **1.3.6 Protección o reparación de macromoléculas**

Cuando una concentración elevada de protones ha dañado componentes esenciales como las proteínas o el DNA, se inducen o activan proteínas llamadas chaperonas, cuya función básica es reparar o en su caso proteger del daño por el estrés. Existen chaperonas como DnaK, GroEL (citoplasmáticas), HdeA, HdeB (periplásmicas), el complejo Clp (el cual remueve proteínas dañadas), que se inducen cuando la célula está expuesta a estrés por acidez (Lund et al., 2014). Se ha observado que Dps y RecA pueden sufrir daño o perder su función, la cual es esencial para la célula. En el caso del sistema Dps, además de resistencia a ambientes ácidos, participa uniéndose al DNA, secuestrando hierro o peróxido a través de su ferroxidasa. Por otra parte, RecA juega un papel importante en procesos que requieren reparación y recombinación homóloga del DNA, así como en la respuesta SOS (respuesta astringente) (Liu et al., 2015). Amundsen et al., 2008, demostraron que una mutante en RecA de *H. pylori* es mucho más sensible al daño al DNA y su tasa de recombinación está disminuída, lo cual no le permitía sobrevivir en condiciones de acidez. Otras proteínas que juegan un papel en la respuesta a acidez y que se han reportado inducidas a un bajo pH son UvrA, LuxS, DnaK e IrrE que actúan protegiendo a la célula contra el daño causado por el estrés por acidez (Liu et al., 2015).

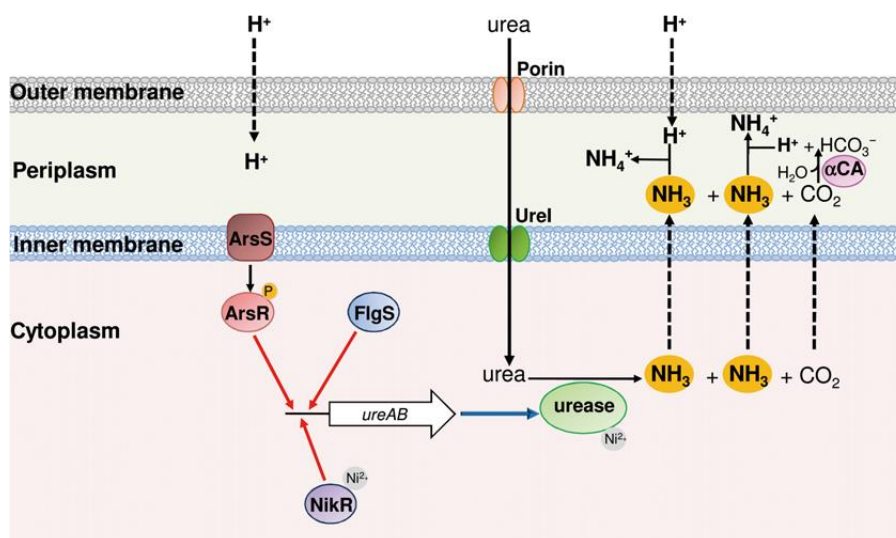
### 1.3.7 ¿Cómo sienten las bacterias una fluctuación en la concentración de protones?

Las bacterias generalmente usan sistemas de dos componentes (TCS, por sus siglas en inglés) para sentir las condiciones extracelulares y un ejemplo de esto es el sentido de protones. Estos TCS, permiten a las bacterias detectar y amplificar señales que permiten la generación de respuestas particulares dándoles la capacidad de adaptación o supervivencia a concentraciones elevadas de protones. Un TCS prototipo consiste de una proteína sensora, (cinasa histidinica o HK por histidine kinase) y un regulador de respuesta (RR, por response regulator) (Stock et al., 2000). De manera general, los TCS funcionan detectando una señal a través de la transferencia de grupos fosforilo entre residuos de histidina y aspartato de una HK y un RR y se caracterizan por tener una alta especificidad que garantiza la respuesta adecuada a cada nueva condición. Se han reportado diferentes TCS, sin embargo, para explicar cómo funcionan en respuesta a acidez, describiremos los sistemas PhoPQ (descrito en diversas bacterias entéricas como *Salmonella* o *E. coli*) y ArsRS de *H. pylori*.

PhoQ es una proteína de membrana interna con 2 regiones transmembranales, un dominio sensor periplásmico y un dominio cinasa citosólico, el cual se autofosforila a través de una interacción intramolecular que promueve la fosforilación del RR PhoP (Lund et al., 2014). El dominio periplásmico de PhoQ (en *Salmonella* spp.) se une a cationes divalentes, formando puentes con los fosfolípidos de membrana interna para que PhoQ se mantenga inactivo. Sin embargo, este dominio se activa cuando está expuesto a acidez (pH 5.5) adoptando una conformación diferente, contrario a cuando se encuentra interaccionando con cationes divalentes; por lo tanto, ya no se lleva a cabo el sentido (Prost et al., 2007). Por otra parte PhoP es el regulador de respuesta de este sistema, lo cual también sugiere que tiene alguna función en la respuesta a acidez, tal como lo observó Miller et al., 1989, en donde una mutante en PhoP de *S. typhimurium* era susceptible en macrófagos murinos (cuyo pH oscila en 5.5) y no solo era reducida su supervivencia, sino que también afectó la virulencia de esta bacteria dentro de los macrófagos. Por lo tanto se concluyó que además de

estar implicado en respuesta a acidez, tenía alguna relación con la virulencia de la cepa (Lund et al., 2014).

El sistema ArsRS descrito en *H. pylori* (figura 6), es otro ejemplo de TCS que participan en respuesta a acidez. Este sistema es uno de varios que ayudan a *H. pylori* a adaptarse a ambientes tan ácidos como el estómago, el cual se encarga de regular los genes de ureasa los cuales son importantes para que este organismo logre vivir en su nicho. En condiciones de acidez ArsR (fosforilado por ArsS), se une a los promotores del cluster *ureA*, B, I, F, G y H promoviendo la transcripción de estos genes, necesarios para el sistema ureasa empleado para la adaptación de este patógeno a las condiciones estomacales (Wen et al., 2003). Contrario a esto, cuando *H. pylori* se encuentra en condiciones neutrales, ArsR se encuentra en su forma no fosforilada y de esta manera se une a un RNA pequeño antisentido que evita la transcripción del gen que codifica a una de las subunidades de la ureasa. El dominio sensor de ArsS contiene 7 residuos de histidina, lo cual le confiere la capacidad de poder sensar cuando el ambiente es ácido, sin embargo, de estos residuos únicamente el residuo H94, es el responsable de la detección de la alta concentración de protones en el medio, dado que mutaciones en los otros 6 residuos no afectan el sentido ni la expresión de los genes del sistema ureasa (Lund et al., 2014; Müller et al., 2009). Este sistema también está presente en colonizadores no gástricos como *H. hepaticus* (de la familia Helicobacteraceae), *Campylobacter jejuni* and *Wolinella succinogenes* (Müller et al., 2009).



**Figura 6. TCS ArsRS de *H. pylori*.** Tanto como ArsR, FlgS y NikR se unen a la región promotora de *ureAB* para activar la expresión de ureasa. Urel participa en el transporte de urea la cual es hidrolizada por la ureasa liberando amonio y CO<sub>2</sub>, los cuales se difunden al periplasma donde el CO<sub>2</sub> es hidratado por una anhidrasa carbónica y además los protones presentes en el citoplasma protonan al NH<sub>3</sub> a NH<sub>4</sub>. Tomada de Lund et al., 2014.

## 2. ANTECEDENTES

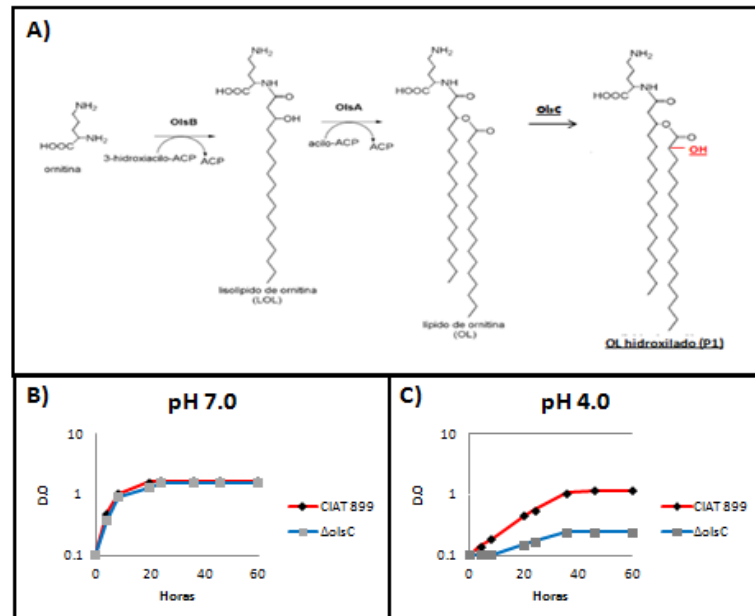
En general existen pocos reportes acerca de los mecanismos de respuesta a acidez en los Rhizobia (Correa et al., 1999; Graham et al., 1994), por ejemplo, se ha reportado que la cantidad producida de EPS correlaciona con la tolerancia a acidez. Por esto se postula que esta producción elevada de EPS modifica el microambiente de la bacteria y por lo tanto disminuye el estrés inducido por el aumento en la concentración de protones (Cunningham & Munns, 1984). Sin embargo, en el microsimbionte *Mesorhizobium loti*, la cantidad de EPS no está correlacionada con la tolerancia a acidez (Correa & Barneix, 1997). Glenn et al., 1999, reportaron algunos genes esenciales para el crecimiento a bajo pH en *S. meliloti*, por ejemplo *actA*, *actP*, *actR*, *actS* y *exoR*, cuyos productos participan en la inducción de la respuesta ATR (para el caso de los genes *act*) y para la regulación de la biosíntesis de EPS (*exoR*), respectivamente (Dilworth et al., 2001). Un caso particular es el del microsimbionte *M. loti*; dado que en esta bacteria, los genes sobreexpresados en condiciones de un choque por acidez de 30 minutos, son muy diferentes con respecto a los reportados anteriormente (*act* o *exo*). Por ejemplo, los genes con mayor expresión fueron los pertenecientes a las categorías de mecanismos de defensa y transcripción, así como muchos genes cuyos productos son de función desconocida (Laranjo et al., 2014).

Para el caso particular de *R. tropici* CIAT 899 cuya característica es que es la cepa hasta ahora descrita, más acidorresistente dentro de la familia *Rhizobiaceae*, tampoco se conocen bien los mecanismos moleculares y bioquímicos por los cuales CIAT 899 logra sobrevivir a condiciones de estrés por acidez.

Riccillo et al., 2000, reportaron que el glutatión era necesario para que CIAT 899 lograra sobrevivir en condiciones de acidez, dado que una mutante en el gen *gshB* (el cual participa en la síntesis de glutatión) afecta su crecimiento a pHs ácidos y además la transcripción de este gen es inducida bajo esta condición (Muglia et al., 2007). En otro estudio hecho por Vinuesa et al., 2003 se identificaron dos mutantes sensibles a acidez mediante un análisis de aproximadamente 1700 mutantes por transposón (Tn5), una de estas mutantes se localizó en el cluster *sycA-olsC* y la otra mutante en el operón *lpiA-atvA*.

Posteriormente se logró elucidar la función de uno de estos genes (*olsC*) en la respuesta a acidez (Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al., 2011; Vinuesa et al., 2003). *OlsC* participa en la biosíntesis de lípidos de ornitina hidroxilados (OLs), y se piensa que dichos OLs se relaciona con una disminución de la permeabilidad de la membrana a protones y por lo tanto resistencia a acidez. Mutantes en el gen *olsC*, tienen bajo crecimiento en condiciones de pH ácido comparada con la cepa silvestre (figura7).

El gen *lpiA* (low pH inducible) codifica para una lisil fosfatidil glicerol (LPG) sintasa, homóloga a MprF (multiple peptide resistance factor) (Andrä et al., 2011) de *Staphylococcus aureus* mientras que el gene *atvA* (acid tolerance and virulence) codifica para una serina lipasa putativa, homóloga a AcvB y VirJ de *Agrobacterium tumefaciens* (Kang et al., 1994; Wirawan et al., 1993). Se demostró que *lpiA* se induce en condiciones de acidez, y que la enzima LpiA es responsable de la biosíntesis de LPG (Sohlenkamp et al., 2007). Se ha reportado que la transcripción del gen *lpiA* también se induce en condiciones de acidez en *Sinorhizobium medicae* y *S. meliloti* (Hellweg et al., 2009; Reeve et al., 2006). Se han descrito Ortólogos de MprF en los patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecium* o *Staphylococcus aureus*; en donde dilucidaron que la falta de aminoacil fosfatidil glicerol (aa-PG) resulta en una disminución de la resistencia a los péptidos antimicrobianos y a diversas condiciones de estrés, entre ellas el estrés por acidez (Arendt et al., 2012; Hebecker et al., 2011; Smith et al., 2013).



**Fig. 7. Biosíntesis de OLs y crecimiento de una mutante en el gen *olsC* de *R. tropici* CIAT 899.** La hidroxilación de los OLs que introduce *OlsC* se ha relacionado con resistencia a estrés por acidez, modificando la permeabilidad membranal y por lo tanto, el paso de los protones. A) Biosíntesis de lípidos de ornitina (OLs), B) Crecimiento de la cepa silvestre y una mutante en el gen *olsC* a pH 7.0 y a pH 4.0 (C) Tomada y modificada de Vences-Guzmán et al., 2011.

Se conoce que el genoma de *R. tropici* CIAT 899 contiene 6359 genes predichos (Ormeño-Orrillo et al., 2012), por lo tanto, se piensa que puede haber más genes involucrados en mecanismos que confieran resistencia a acidez además de los ya reportados por Vinuesa et al., 2003. Ormeño y colaboradores reportan que el genoma de esta cepa alberga genes de respuesta a acidez, por ejemplo *eptA*, *cfa*, antiporters o genes *exo* necesarios para la biosíntesis de EPS, que se han reportado en otras bacterias y que son necesarios para la resistencia a acidez (algunos descritos en la sección introducción). Tal es el caso de *S. meliloti*, en donde se observó la inducción de todo un cluster que codifica proteínas necesarias para la biosíntesis de EPS (Hellweg et al., 2009). Dado que el genoma de esta cepa alberga arriba de 6000 genes, se piensa que existan nuevos genes que contribuyan a la resistencia a acidez en este organismo que aun no se han reportado como parte de los genes ya conocidos de respuesta a acidez. En este estudio nosotros combinamos una mutagénesis por transposón saturante con un estudio transcriptómico para obtener el repertorio de genes importantes o esenciales para la respuesta a acidez en *R. tropici* CIAT 899.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 General**

Identificar genes que confieran resistencia a estrés por acidez en *R. tropici* CIAT 899.

#### **3.2 Específicos**

- Construir una biblioteca de mutantes al azar mediante una mutagénesis por transposón (Tn5).
- Analizar las mutantes en búsqueda del fenotipo de sensibilidad a acidez.
- Identificar el sitio de inserción del Tn5 de las mutantes sensibles a acidez.
- Realizar un RNA-seq de la cepa silvestre crecida en 3 diferentes condiciones de pH (un medio neutro, un medio ácido y un choque por acidez).
- Identificar los genes que diferencialmente se expresan utilizando el RNA extraído de la cepa crecida en medio a pH ácido comparada con la condición control (pH neutro).
- Identificar que genes diferencialmente expresados pertenecen a mecanismos relacionados a acidez.



## 4. MATERIALES Y METODOS

### 4.1 Cepas y plásmidos usados en este estudio

Algunas de las cepas y plásmidos diseñados en este estudio están incluidas en la sección 6.1, 16 se reportan en resultados y 9 más en la tabla 4. Además, se obtuvieron cepas complementadas que se incluyen en la misma tabla.

**Tabla 4. Plásmidos utilizados para la complementación de dos mutantes sensibles a acidez.**

Cepa	Particularidades	Referencias
<b>Plásmidos</b>		
pET17RR	Regulador de respuesta clonado en pET17b y transformado en DH5 $\alpha$ , Cb <sup>R</sup> .	Este trabajo
pRK402RR	Regulador de respuesta clonado en pRK402 y transformado en DH5 $\alpha$ , Cb-Tc <sup>R</sup> .	Este trabajo
pRK402RR17.1	Regulador de respuesta clonado en pRK402 y transformado en S17.1, Cb-Tc <sup>R</sup> .	Este trabajo
pET17TCS	Sistema de dos componentes (SDC) clonado en pET17b y transformado en DH5 $\alpha$ , Cb <sup>R</sup> .	Este trabajo
pRk402TCS	SDC clonado en pRK402 y transformado en DH5 $\alpha$ , Cb-Tc <sup>R</sup> .	Este trabajo
pRK402TCS17.1	SDC clonado en pRK402 y transformado en S17.1, Cb-Tc <sup>R</sup> .	Este trabajo
pET17ANT	Antiporter clonado en pET17b y transformado en DH5 $\alpha$ , Cb <sup>R</sup> .	Este trabajo

### 4.2 Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Se usaron diferentes medios de cultivo para el crecimiento de *R. tropici* CIAT 899, PY (Beringer, 1974), o medio mínimo (MM) o minimal acid medium (MAM) descrito por Kingsley and Bohlool en 1992, los cuales se detallan en la sección de apéndices. Las bacterias se incubaron a 30°C por 2 días (para el caso de PY) o de 3-5 días (para el caso de MM o MAM). Para cultivar *E. coli* se usó el medio Luria Bertani y las células se incubaron a 37 °C. Cuando se requirió se usaron respectivos antibióticos mencionados en la sección 6.1.

### 4.3 Mutagénesis con transposón Tn5

La mutagénesis se realizó vía conjugación diparental (Simon et al., 1983). Las transconjugantes generadas se replicaron en medio solido PY usando un replicador de 48 colonias, se pasaron a medio líquido en placas de ELISA de 96 pocillos y se crecieron toda la noche y posteriormente se guardaron a -80 °C con 30% (p/v) de glicerol. Se seleccionaron 10 transconjugantes para verificar la inserción en diferentes regiones del genoma mediante un análisis de Southern blot detallado en apéndices. La selección de mutantes sensibles a acidez se

realizó primero replicando cada una en medio PY, posteriormente se pasaron a MM o MAM, se crecieron hasta 5 días y se seleccionaron las que presentaban sensibilidad a acidez (SA) o aquellas que eran medianamente sensibles a acidez (MSA) de las cuales se extrajo DNA genómico para su posterior análisis.

#### **4.4 Aislamiento de DNA genómico**

El DNA total, tanto de las cepas silvestres como de las mutantes se realizó con el sistema comercial de purificación Roche (DNA isolation Kit for Cells and Tissues) a partir de 5 mL de cultivo crecidos en PY. Este DNA se utilizó para identificar el sitio de inserción del Tn5 mediante digestión-clonación-secuenciación (DCS) y/o PCR inversa (iPCR). El método se detalla en apéndices.

#### **5.5 Analisis de transconjugantes Tn5 para verificar inserción azarosa del transposón.**

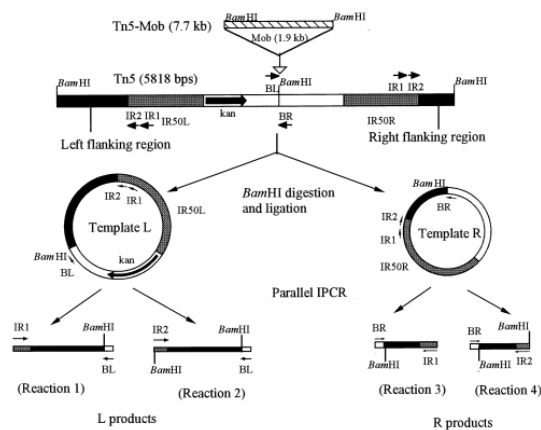
Se seleccionaron transconjugantes (10) para analizar mediante Southern blot que la transposición fue azarosa. Para lo cual se extrajo ADN de las transconjugantes seleccionadas y se digirieron con *EcoRI* (New England Biolabs). Una vez comprobado que las muestras de ADN genómico digirió completamente, se corrieron en un gel de agarosa a 0.9 % con todo el volumen de la digestión. Posteriormente el ADN se desnaturalizó en el gel con una solución de 1.5 M de NaCl, 05 M de NaOH seguido por una neutralización con 1.5 M de NaCl y 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5). Enseguida el ADN se transfirió a una membrana de nitrocelulosa cargada positivamente (Amershan Biosciences) durante toda la noche en solución de transferencia (detallado en los apéndices). Después de la transferencia, el ADN se fijó a la membrana a través de un UV-crosslinker (spectro linker X-1000) usando un programa automático del propio equipo.

#### **5.6 Identificación del sitio de inserción mediante iPCR o digestión-clonación-secuenciación (DCS)**

La identificación del sitio de inserción del Tn5 se hizo por dos metodologías diferentes, mediante DCS o iPCR; para el caso de DCS, se extrajo DNA

genómico, se digirieron 8  $\mu\text{g}$  este mismo con la enzima *EcoRI* la cual no corta el casete de resistencia a kanamicina y se realizó una clonación de fragmentos al azar con el vector pUC18 (digerido con la misma enzima), posteriormente se seleccionaban las transformantes resistentes a kanamicina, se purificaba el plásmido y se secuenciaba con oligonucleótidos T7, los resultados de la secuenciación se mapeaban en el genoma de *R. tropici* CIAT 899 y se determinaba el sitio de inserción del Tn5.

Para el caso de la iPCR (Huang et al., 2000), primero se diseñaron oligonucleótidos (descritos en tabla 2 de la sección 6) a partir de los bordes (repetidos invertidos) de la secuencia del Tn5 y a partir del único sitio *Bam*HI, para amplificar regiones flanqueantes del transposón. El ADN genómico se digirió con la enzima *Bam*HI (en este caso ya no importaba si digería el casete de resistencia) a 37 °C, el DNA digerido se usó para ligar todos los posibles fragmentos a una concentración de 0.3–0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ –1 en presencia de 3 U/ml–1 de T4 DNA ligase (NEB, biolabs) toda la noche a 16°C. Esta reacción de ligación se utilizó como templado para amplificar con los oligos del Tn5, los componentes de ambas reacciones tanto de digestión, como de ligación y de iPCR fueron purificadas antes de realizar la siguiente reacción o en el caso de la iPCR antes de enviar a secuenciación estos amplicones (figura 7).



**Figura 8. Estrategia para amplificar secuencias de DNA flanqueantes del Tn5 mediante iPCR.** Las regiones oscuras representan el DNA flanqueante del transposón, las regiones grises las repetidos invertidos del Tn5, la región en blanco representa la región central del Tn5 que confiere resistencia a diversos antibióticos, los primers IR1, IR2, BL y BR se denotan por líneas, los sitios *Bam*HI son mostrados. Tomada de Huang et al., 2000.

## 5.7 Complementación de dos mutantes sensibles a acidez (JG2646 y JG9587)

Se diseñaron iniciadores para amplificar los genes afectados de las mutantes JG2646 y JG9587 (regulador de respuesta de unión a DNA y antiporter K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, respectivamente), para el caso de la mutante JG2646 como la inserción está localizada en un operon (regulador de respuesta e histidin cinasa), se diseñaron iniciadores tanto para amplificar el regulador de respuesta como para el operon completo. Los cebadores se describen en la siguiente tabla 5.

**Tabla 5. Iniciadores usados para amplificar genes de mutantes JG2646 Y JG9587.** Se muestra en negrita el sitio de restricción (*NdeI* para *F* y *BamHI* para *R*) para cada oligonucleótido.

Nombre	Longitud	Secuencia (5'-3')	T <sub>m</sub> * ( ° C)	Referencias
RR- <i>F</i>	32	ACTG <b>CATATG</b> AAGATTCTGATCATCGAAGACG	73.0	Este trabajo
RR- <i>R</i>	32	ACTG <b>GGATCC</b> TCATCCCTCGTCCTTGATCATG	79.6	Este trabajo
CS- <i>R</i>	33	ACTG <b>GGATCC</b> CTATTGTTTCTGCAGGGGAAGA	78.7	Este trabajo
Ant- <i>F</i>	32	ACTG <b>CATATG</b> GAGGCATTTTACATTATCGTGC	73.3	Este trabajo
Ant- <i>R</i>	32	ACTG <b>GGATCC</b> TCAGGCGTCGTTTTTACCCGGT	81.2	Este trabajo

Se amplificaron los genes correspondientes con el siguiente programa de PCR: 98 °C por 30 segundos (s), seguido por 30 ciclos de 98 °C por 10 s, 55-65 °C por 30 s, 68 °C por 1 minuto (min) y finalmente 68 °C por 10 min. Se usó una unidad de Accu Prime *Pfx* DNA polimerase. Para amplificar el regulador de respuesta se usaron los oligos RR-*F* y RR-*R*, para el operon se usaron RR-*F* y CS-*R* y para el antiporter se usaron Ant-*F* y Ant-*R*. Los amplificados se digirieron con sus respectivas enzimas y se clonaron en el vector pET17b (digeridos con los mismos sitios de restricción), posteriormente se transformaron en DH5a, se subclonaron en el vector de amplio rango de hospedero pRK404 y las clonas se transformaron en S17.1, para finalmente conjugar a las cepas mutantes JG2646 y JG9587, respectivamente. Se logró complementar la mutante JG2646 con ambos fragmentos de ADN (regulador de respuesta y operon) y se analizaron para ver cual restauraba el fenotipo de sensibilidad a acidez.

## **5.8 Aislamiento, purificación e integridad de RNA**

Para aislar el RNA para realizar un transcriptoma mediante RNA-seq, se usaron varios métodos, hasta lograr estandarizar el que se describe en la sección 6.1, cuyos detalles se anexan en la sección de apéndices. La calidad del mismo se analizó usando el TapeStation 2,200 instrument (Agilent Technologies).

## 5. RESULTADOS

Los resultados fundamentales de este trabajo se publicaron en un artículo en la revista *Frontiers in Microbiology* en la sección Fisiología y Metabolismo Microbiano.

“Dissecting the Acid Stress Response of *Rhizobium tropici* CIAT 899”

Julio Guerrero-Castro, Luis Lozano and Christian Sohlenkamp (2018). *Frontiers in Microbiology* 9:846. doi: 10.3389/fmicb.2018.00846.



# Dissecting the Acid Stress Response of *Rhizobium tropici* CIAT 899

Julio Guerrero-Castro<sup>1,2</sup>, Luis Lozano<sup>3</sup> and Christian Sohlenkamp<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, <sup>2</sup> Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico, <sup>3</sup> Programa de Genómica Evolutiva, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mexico

*Rhizobium tropici* CIAT899 is a nodule-forming  $\alpha$ -proteobacterium displaying intrinsic resistance to several abiotic stress conditions such as low pH and high temperatures, which are common in tropical environments. It is a good competitor for *Phaseolus vulgaris* (common bean) nodule occupancy at low pH values, however little is known about the genetic and physiological basis of the tolerance to acidic conditions. To identify genes in *R. tropici* involved in pH stress response we combined two different approaches: (1) A Tn5 mutant library of *R. tropici* CIAT899 was screened and 26 acid-sensitive mutants were identified. For 17 of these mutants, the transposon insertion sites could be identified. (2) We also studied the transcriptomes of cells grown under different pH conditions using RNA-Seq. RNA was extracted from cells grown for several generations in minimal medium at 6.8 or 4.5 (adapted cells). In addition, we acid-shocked cells pre-grown at pH 6.8 for 45 min at pH 4.5. Of the 6,289 protein-coding genes annotated in the genome of *R. tropici* CIAT 899, 383 were differentially expressed under acidic conditions (pH 4.5) vs. control condition (pH 6.8). Three hundred and fifty one genes were induced and 32 genes were repressed; only 11 genes were induced upon acid shock. The acid stress response of *R. tropici* CIAT899 is versatile: we found genes encoding response regulators and membrane transporters, enzymes involved in amino acid and carbohydrate metabolism and proton extrusion, in addition to several hypothetical genes. Our findings enhance our understanding of the core genes that are important during the acid stress response in *R. tropici*.

**Keywords:** *Rhizobium tropici* CIAT899, pH, acid stress response, Tn5, transcriptome, RNA-Seq

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Marc Strous,  
University of Calgary, Canada

### Reviewed by:

Ernesto Ormeño-Orrillo,  
National Agrarian University, Peru  
Amy Michele Grunden,  
North Carolina State University,  
United States

### \*Correspondence:

Christian Sohlenkamp  
chsohlen@ccg.unam.mx

### Specialty section:

This article was submitted to  
Microbial Physiology and Metabolism,  
a section of the journal  
Frontiers in Microbiology

Received: 22 December 2017

Accepted: 12 April 2018

Published: 30 April 2018

### Citation:

Guerrero-Castro J, Lozano L and  
Sohlenkamp C (2018) Dissecting the  
Acid Stress Response of *Rhizobium*  
*tropici* CIAT 899.  
Front. Microbiol. 9:846.  
doi: 10.3389/fmicb.2018.00846

## INTRODUCTION

The response to acidic stress conditions is understood best in enterobacteria, and *Escherichia coli*, *S. enterica* var. Typhimurium, *P. mirabilis* and *Y. enterocolitica* (Castanie-Cornet et al., 1999; Kieboom and Abee, 2006; De Biase and Pennacchiotti, 2012), all have effective systems to contend with acid stress. Well-known are the decarboxylation systems, which are composed of two components: a decarboxylase and an antiporter. Protons are consumed in the cytoplasm through the decarboxylation of specific amino acids and the corresponding antiporter exports the decarboxylation product and imports more of the required amino acid (Foster, 2004). The best-studied example is the glutamate decarboxylase (Gad) system depending upon the concerted action of glutamate decarboxylase (GadA/GadB) and of the glutamate/GABA antiporter, GadC (Foster, 1999; Audia et al., 2001; Lund et al., 2014).

*Rhizobium tropici* CIAT899 is an  $\alpha$ -proteobacterium capable of establishing a symbiosis with different leguminous plants including common bean (*Phaseolus vulgaris*) (Martínez-Romero et al., 1991). During this symbiosis root nodules are formed, which are specialized organs where biological nitrogen fixation (BNF) will take place (Suzaki et al., 2015). The efficiency of this symbiosis can be restrained by different environmental conditions, such as high temperature and low pH (Martínez-Romero et al., 1991; Graham et al., 1994; Hungria et al., 2000; Vinuesa et al., 2003). For example under acidic pH conditions, where survival and persistence of the bacteria are limited, nodulation and BNF can be severely affected. Acidic conditions can be found in the rhizosphere of plants, where the pH is lowered by plant exudates containing protons and organic acids, and inside symbiosomes (Udvardi and Day, 1997). Compared to most other nodule-forming bacteria *R. tropici* CIAT899 presents an increased resistance to acidic growth conditions.

A few studies trying to identify the genetic determinants of growth at acidic pH have been made in *R. tropici* (Ricciolo et al., 2000; Vinuesa et al., 2003; Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al., 2011). In 2003, Vinuesa et al. (2003), identified novel rhizobial genes required for acid tolerance. During a screen of a small Tn5 mutant library composed of 1,728 clones, they identified two mutants affected in acid tolerance. In one mutant, the Tn5 was inserted in the *sycA-olsC* gene cluster and in the second mutant, it was inserted in the *lpiA-atvA* operon. OlsC catalyzes the hydroxylation at the 2-position of the secondary fatty acid of ornithine lipids (OLs). The presence of this hydroxyl group has been correlated later to an increase tolerance to acidic conditions and high temperatures in CIAT899 (Vinuesa et al., 2003; Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al., 2011). LpiA is a lysyl-phosphatidylglycerol synthase homologous to MprF from *Staphylococcus aureus* and the *atvA* gene is encoding a putative serine lipase homologous to the virulence proteins AcvB and VirJ from *Agrobacterium tumefaciens*. It was demonstrated that *lpiA* is induced under acidic conditions, and that LpiA participates in lysyl-phosphatidylglycerol (LPG) biosynthesis, which confers an increased resistance of *R. tropici* CIAT899 to the cationic peptide polymyxin under acidic growth conditions (Vinuesa et al., 2003; Sohlenkamp et al., 2007). Transcriptional induction of *lpiA* expression was also induced in *Sinorhizobium medicae* and *Sinorhizobium meliloti* as part of the response to low pH (Reeve et al., 2006; Hellweg et al., 2009). GshB participates in glutathione biosynthesis (Ricciolo et al., 2000), which is necessary to grow in several environmental conditions like oxidative stress, osmotic stress and acid stress and transcription of *gshB* is induced under acidic stress conditions as shown by quantitative PCR (Muglia et al., 2007).

In addition, the CIAT899 genome encodes homologs to several proteins that are involved in acid stress response in other bacteria: (1) *eptA* encodes a putative lipid A phosphoethanolamine transferase, which confers acid resistance in *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Shigella flexneri* 2a (Martinić et al., 2011); (2) *cfa* encodes cyclopropane-fatty-acyl-phospholipid synthase which enhances acid tolerance in *E. coli* by reducing the permeability of the membrane to H<sup>+</sup> (Shabala and Ross, 2008; Sohlenkamp, 2017). Five different copies of *cfa* genes are encoded in the genome of *R. tropici* CIAT899; (3) H<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>

antiporters are responsible for protons extrusion when *E. coli* or *Helicobacter pylori* are exposed to acidic conditions (Inoue et al., 1999; Padan et al., 2004; Padan, 2008). CIAT899 possesses four genes encoding antiporters that possibly help to maintain pH homeostasis; (4) Exopolysaccharide (EPS) biosynthesis has been related to acid tolerance. In *S. meliloti* it has been shown that genes related to EPS production are expressed under acidic conditions (Cunningham and Munns, 1984; Hellweg et al., 2009) and the genome of CIAT899 encodes several *exo* genes and EPS production could help the bacteria to resist acid stress. It is not known, if the orthologues to these genes involved in acid stress response in other bacteria have a function during the acid stress response in *R. tropici*.

Vinuesa et al. (2003) had identified at least two novel genes involved in the acid stress response in *R. tropici* out of a screen using only 1,728 mutants. As the genome of *R. tropici* CIAT899 contains more than 6,280 genes (Ormeño-Orrillo et al., 2012), we think that it should be possible to discover further novel genes having a function in acid stress response in this organism. Here we present a study combining random transposon mutagenesis with transcriptomics to obtain a broad catalog of genes important or essential for the acid stress response in *R. tropici* CIAT899.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial Strains and Culture Conditions

Bacterial strains and plasmids used in this work are listed in **Table 1**. *R. tropici* CIAT899 was routinely grown in TY medium (Beringer, 1974) or the minimal medium described by Kingsley and Bohlool (Kingsley and Bohlool, 1992), adjusted to pH 6.8 [MM- buffered to pH 6.8 with 20 mM Hepes (*N*-(2-Hydroxyethyl)piperazine-*N'*-(2-ethanesulfonic acid))] or to pH 4.5 (MAM-buffered to pH 4.5 with 25 mM Homopipes (Homopiperazine-*N,N'*-bis-2-(ethanesulfonic acid))), Research Organics, Cleveland, OH, USA) at 30°C. MM and MAM were solidified with 0.8% gelrite (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany). *E. coli* strains were grown in Luria-Bertani (LB) medium at 37°C. Antibiotics were added at the following final concentrations ( $\mu$ g/mL): kanamycin (Km) 150; carbenicillin (Cb) 100; tetracycline (Tc) 10, and nalidixic acid (Nal) 20.

### Tn5 Mutagenesis of *Rhizobium tropici* CIAT899

A general Tn5 transposon mutagenesis of *R. tropici* CIAT899 was performed via conjugal transfer of pSUP1021 into CIAT899 utilizing *E. coli* S17.1 as the donor strain (Simon et al., 1983). Appropriate dilutions were plated on TY medium, supplemented with kanamycin and nalidixic acid to select for Tn5 transconjugants. Individual colonies were transferred to microtiter plate wells with TY medium and were grown overnight at 30°C. Glycerol was added to a final concentration of 30% (w/v) and the mutant library was stored at -80°C. To check the quality of the library, 10 transconjugants were randomly selected, genomic DNA was extracted, digested with *EcoRI* (New England Biolabs), and Southern blot hybridization was performed using a digoxigenin-labeled probe hybridizing to a fragment of the Tn5. The probe was synthesized using the oligos Tn5-1 and Tn5-2 (**Table 2**). This analysis established that the transposon had



**TABLE 1** | Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strains or plasmid	Relevant characteristics	References
<b>Rhizobium tropici</b>		
<sup>A</sup> CIAT899	A bean-nodulating strain acid tolerant, Naf <sup>r</sup>	Martínez-Romero et al., 1991
<b>Escherichia coli</b>		
DH5 $\alpha$	<i>recA1</i> , $\Delta$ <i>acU169</i> , $\Delta$ <i>80d</i> <i>lacZ</i> $\Delta$ M1	Hanahan, 1983
HB101	<i>supE44 hsdS20</i> (r-Bm-B) <i>recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 syl-5 mtl-1</i>	New England Biolabs
S17.1	<i>thi pro hsdR- hsdM</i> $\Delta$ <i>recA</i> , RP4 integrated in the chromosome, 2-Tc::Mu- Km::Tn7(Tp <sup>r</sup> /Sm <sup>r</sup> )	Simon et al., 1983
<b>PLASMIDS</b>		
pET17B	Expression vector, Cb <sup>r</sup>	Studier, 1991
pRK404	Broad-host-range vector, Tc <sup>r</sup>	Ditta et al., 1985
pBBR5MCS-2	Broad-host-range plasmid, Km <sup>r</sup>	Kovach et al., 1994
pUC18	Cloning vector, Amp <sup>r</sup>	Yanisch-Perron et al., 1985
pK18mobsacB	Conjugative suicide vector, Km <sup>r</sup>	Schäfer et al., 1994
pSJP1011	Mobilizable suicide plasmid for Tn5 mutagenesis	Simon et al., 1983

<sup>A</sup>CIAT stands for "Centro Internacional de Agricultura Tropical," which is located in Cali, Colombia.

**TABLE 2** | Primers used in this study.

Primer	Length	DNA sequence (5' to 3')	Tm* (°C)	References
Tn5-1	20	CATTGAAGCGGAAGGGACT	68.1	This study
Tn5-2	20	AGATCCTCGCGTCGGGCAT	69.8	This study
BL	20	GGGGAACCTTGACAGATAGC	55.8	Huang et al., 2000
BR	23	CATTCTGTAGCGGATGAGATC	56.9	Huang et al., 2000
IR1	21	GAGCAGAAGTTATCATGAACG	50.3	Huang et al., 2000
IR2	29	CGGGATCCTCACATGGAAGTCAGATCCTG	64.3	Huang et al., 2000

Tm\* was calculated for DNA/DNA hybrid with a monovalent cation concentration of 100 mmol<sup>-1</sup> using the program Tm calculator on the NEB webpage (<http://tmcalculator.neb.com/#/>).

inserted in each strain only once and into different regions within the genome of *R. tropici* CIAT899.

### Screen for Acid-Sensitive Mutants

The ordered mutant library was replica-plated from the glycerol stock onto TY plates and grown for 3 days. Clones were transferred using a 48-pin replicator onto MM and MAM plates, and grown for 5 days. Mutants that grew as the wildtype under neutral pH conditions (MM), but that were strongly affected or that did not grow at low pH (MAM) were selected for further analysis. The Tn5 insertion sites were mapped using two approaches. Most of the transposon insertion sites were determined using inverse PCR (iPCR) using the oligos described in **Table 2**. Briefly, 1  $\mu$ g of genomic DNA of an acid-sensitive mutant is digested with the enzyme *Bam*HI (New England Biolabs) that cuts just in the middle of the Tn5. Following digestion, the reactions were inactivated at 65°C for 15 min. The restricted DNA was circularized overnight at 16°C in 100  $\mu$ L reactions with 200 U of T4 DNA ligase (New England Biolabs), and then purified with High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). The iPCR mix contained 10  $\mu$ L of 10x PCR buffer, 6  $\mu$ L of 25 mM MgCl<sub>2</sub> (final concentration of 1.5 mM), 2  $\mu$ L 10 mM dNTP mix (final concentration of 200  $\mu$ M each dNTP), 0.5  $\mu$ M (4  $\mu$ L) of each primer (different combinations like BL-IR1,

BL-IR2, or BR-IR1, BR-IR2 were used for the amplification, see **Table 2**), 10  $\mu$ L (500 ng) of circularized template and 1.6 U of rTth DNA polymerase XL (Applied Biosystems) and ultrapure water (Milli-Q). The target DNA sequence was amplified using the following program: 94°C for 10 min, then 35 cycles 94°C for 1 min, 68°C for 5 min and 72°C for 10 min, and finally 72 °C for 10 min. PCR products were purified and sequenced (using different combinations of primers (see **Table 2**) at the Institute of Biotechnology (IBT) of the UNAM and mapped to the reference genome to identify the position of the Tn5 insertions. For the other approach genomic DNA of acid-sensitive mutants was digested with *Eco*RI (cuts Tn5 sequence without damaging the kanamycin resistance cassette) and then cloned into pUC19. After transformation we selected for kanamycin-resistant clones containing the resistance cassette and flanking sequences from the *R. tropici* genome. Plasmids were sequenced, and the insertion sites were mapped in the reference genome.

### RNA Isolation

*R. tropici* CIAT899 was pre-grown in TY medium, then cultured in MM (control pH 6.8) (sample AR) or MAM (pH 4.5) (sample BR) until an OD<sub>620</sub> of 0.6–0.7. For acid shock treatment cells were cultured in MM medium to mid-log phase, then washed with MAM and incubated another 45 min in MAM

(pH 4.5) (sample CR). Cells were harvested by centrifugation and the pellets were immediately frozen in liquid nitrogen. Total RNA was prepared using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Hildesheim, Germany) with some modifications. Pellets were resuspended in RLT buffer supplemented with lysozyme (20 mg per mL; QIAGEN, Hildesheim, Germany) and containing Zirconium Oxide Beads (0.5 mm, Next Advance). Cells were disrupted using the Bullet Blender Tissue Homogenizer (Next-Advance) in impact-resistant 2 mL tubes. Genomic DNA was eliminated by digestion with RNase-free DNase (QIAGEN, Hildesheim, Germany) for 20 min at room temperature. Final RNA concentrations were determined using a NanoDrop (Thermo Scientific). The typical OD<sub>260</sub> to OD<sub>280</sub> ratio of RNA samples was approximately 2.0. The integrity of RNA samples was verified using a TapeStation 2,200 instrument (Agilent Technologies) and the RNA integrity number (RIN<sup>e</sup>) was determined. Three independent total RNA extractions were obtained for each condition and each one was analyzed separately.

### RNA-Seq and Data Analysis

RNA-Seq libraries were prepared using the TruSeq RNA sample Prep kit (Illumina) and sequenced (150 nt per read) by HiSeq 2500 instrument (Illumina) at the Beijing Genomics Institute (BGI, China). For the analysis of RNA-Seq data, Bowtie2 was used to align raw reads to the *R. tropici* CIAT 899 genome (Genbank entry CP004015, CP004016, CP004017, and CP004018) and samtools was used to obtain BAM files. Differentially expressed genes (DEGs) were obtained via NOISeq 2.14.1 Bioconductor package using local fit and betaPrior parameter set to False. NOISeq implements differential expression analysis based on the Negative Binomial distribution. A false discovery rate (FDR) threshold of 0.95 was set for DEG calling. Sample clustering and principal component analyses were performed upon variance stabilizing transformation of expression data (NOISeq package). Transcripts were called as differentially expressed when the FDR-Log<sub>2</sub>FC adjusted *p*-values were below 0.05 and fold-changes over 2 (Tarazona et al., 2011, 2015).

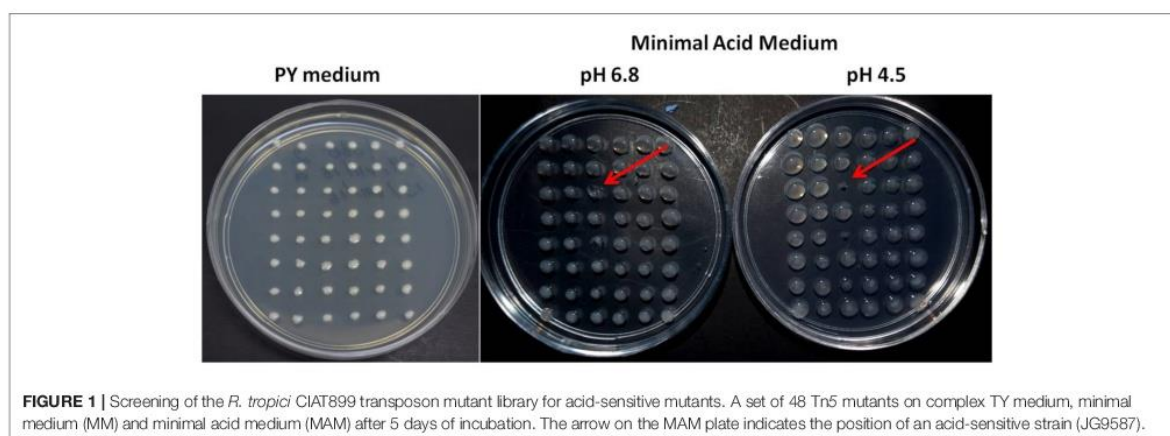
### Functional Categorization of Genes

The Clusters of Orthologous Groups (COGs) database was used to classify DEGs in *R. tropici* CIAT899 into functional categories (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>).

## RESULTS

### Insertional Mutagenesis of *Rhizobium tropici* CIAT899 and Selection of Acid-Sensitive Transposon Mutants

*R. tropici* CIAT899 has a 6.3 Mb genome in which some 6,280 protein-encoding genes are annotated. The aim was to saturate the genome with transposon insertions or at least to come close to saturation. An ordered library of 18,300 mutants was constructed using Tn5-derived transposons (Simon et al., 1983). For a small subset of mutants, we showed that each one presented a single Tn5-insertion and that they presented different RFLPs, indicating that the insertions were at different sites. Mutants were replica-plated on TY medium from the 96-well plate glycerol stock. After 3 days of growth, cells were replicated to minimal acid medium (MAM) and to neutral minimal medium (MM) to identify and select acid-sensitive mutants. Mutants were grown for 5 days, selecting those that grew at neutral pH as well as the wildtype but did not grow at acidic pH or that showed a drastically reduced growth under the latter condition (Figure 1). We grouped the mutants into two classes, those unable to grow at acid pH (AS: acid-sensitive) and those that presented only residual growth (MAS: mildly acid-sensitive). In total, 26 mutants were identified that showed growth deficiency under acid conditions, of these three are AS and 23 MAS at pH 4.5. We succeeded in identifying 17 Tn5 insertions among these (Table 3). Most mutants presented insertions sites in the chromosome (14 mutants), except JG283 and JG9867, for which the insertion site was located in the megaplasmid pC (locus tag RTCIAT899\_RS28660, polysaccharide biosynthesis protein). Megaplasmid pC has the characteristics of a chromid (Harrison et al., 2010), since it harbors essential genes involved in the biosynthesis of vitamins like thiamine and cobalamin. For



**FIGURE 1** | Screening of the *R. tropici* CIAT899 transposon mutant library for acid-sensitive mutants. A set of 48 Tn5 mutants on complex TY medium, minimal medium (MM) and minimal acid medium (MAM) after 5 days of incubation. The arrow on the MAM plate indicates the position of an acid-sensitive strain (JG9587).

**TABLE 3** | Description of the acid-sensitive mutants identified in the mutant library.

Mutant	Locus tag	Phenotype	log2FC		Gen product
			AR vs. BR	AR vs. CR	
JG241	RTCIAT899_RS09205	MAS	0.082820403	0.358090297	Triose-phosphate isomerase
JG1042	RTCIAT899_RS09635	MAS	0.562135533	0.019664157	Fibulose phosphate 3-epimerase.
JG4882	RTCIAT899_RS05920	MAS	1.127623534	0.775841137	prolyl aminopeptidase
JG6187	RTCIAT899_RS18500	MAS	0.27111116	0.62190933	Acs acetyl-coenzyme A synthetase
JG5373	RTCIAT899_RS15005	MAS	-0.19186143	0.374167234	Glutathione-dependent formaldehyde-activating GFA
JG283	RTCIAT899_RS28660	MAS	-1.16368769	-0.27188271	Polysaccharide biosynthesis protein (pC)
JG9867					
JG8656	RTCIAT899_RS13445	MAS	-0.16562978	-0.35630822	Ornithine lipid biosynthesis protein OlsC.
JG9587	RTCIAT899_RS14675	AS	0.033702161	-0.04398059	K <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> antiporter
JG163	RTCIAT899_RS14610	AS	0.810602571	0.312163145	Virulence factor family protein
JG9477	RTCIAT899_RS00995	MAS	-0.07145354	-0.56570741	MarR family transcriptional regulator
JG8654	RTCIAT899_RS09190	MAS	0.048965121	0.482194227	Transcriptional regulator FtrA
JG2646	RTCIAT899_RS05450	AS	1.131753457	1.39942044	DNA-binding response regulator
JG1076	RTCIAT899_RS31680	MAS	0.050745221	-0.56595384	Hypothetical protein
JG4655					
JG6057	RTCIAT899_RS18385	MAS	0.035556937	-0.30504672	Hypothetical protein (pA)
JG5634	RTCIAT899_RS20115	MAS	0.43645166	0.498978895	IS5/IS1182 family transposase

The site of transposon insertion, the phenotype and the predicted gene product are described for each mutant. For comparison, the expression data obtained by RNA-Seq for these genes are presented. For example the transposon insertion in mutant JG2646 was localized to a gene encoding a DNA-binding response regulator and its expression was more than 2-fold induced in both cases (AR vs. BR and AR vs. CR). AR vs. BR = pH 6.8 vs. pH 4.5, AR vs. CR, pH 6.8 vs. acid shock for 45 min to pH 4.5, pA, pRtrCIAT899a; pC, pRtrCIAT899c.

mutant JG6057 the transposon insertion site was located to the plasmid pA (locus tag RTCIAT899\_RS18385, hypothetical protein). This is the smallest plasmid of *R. tropici* CIAT899, it is self-transmissible and includes various conjugation systems genes (Figure 2 and Table 3). None of the insertions was localized in the symbiotic plasmid (pSym or pB).

### Transcriptomic Analysis Shows That Many Genes Are Expressed Differentially in Response to Acidic Conditions

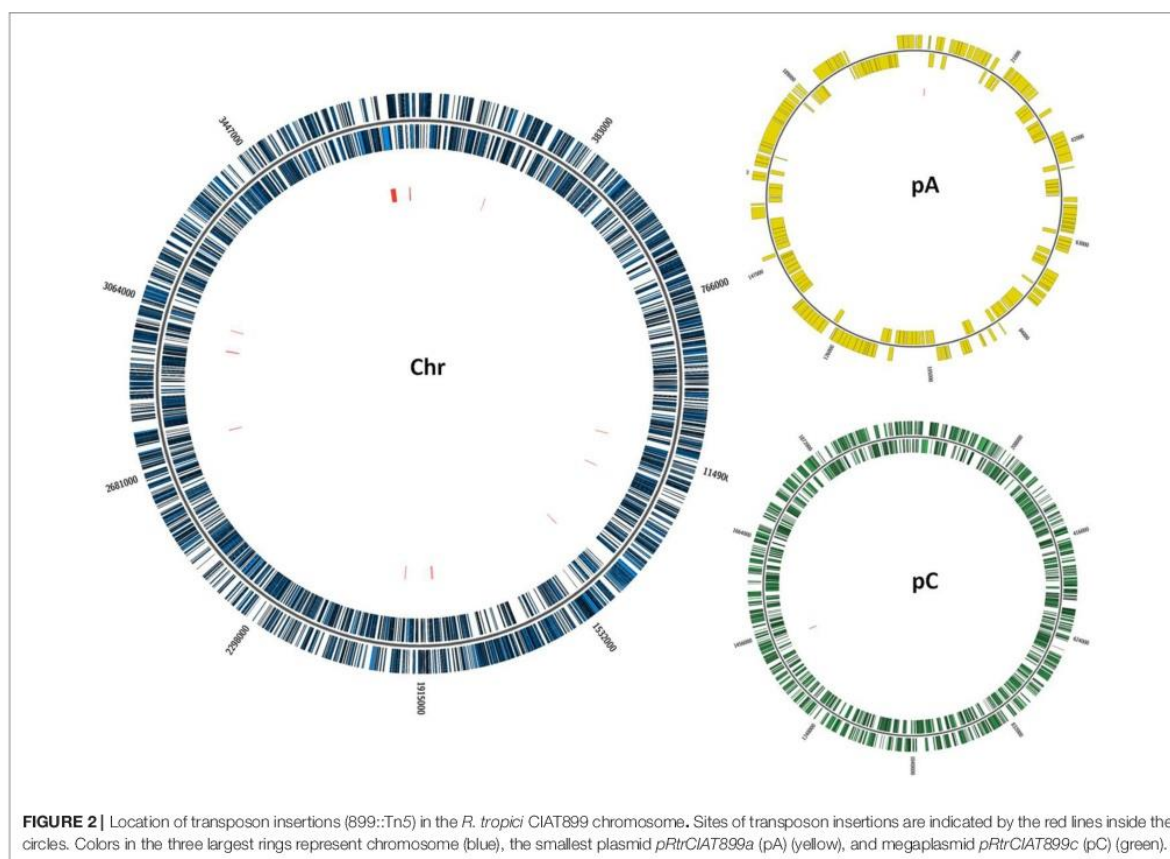
The principal aim of this study was to identify novel genes important during acid stress in *R. tropici*. The screening of Tn5 mutants allowed us to identify genes that are important under acid stress, but dispensable under neutral pH conditions. Unfortunately, this approach would not allow for the identification of genes that are important during acid stress, but that are at the same time essential for growth at neutral pH. We guessed that these genes should be either transcriptionally induced or repressed during acid stress. *R. tropici* CIAT899 cells were grown under control conditions (pH 6.8 adapted, sample AR), in MAM at pH 4.5 (pH 4.5 adapted cells, sample BR), or pre-grown at pH 6.8 until an OD 600 nm of 0.6, washed and then transferred to pH 4.5 for 45 min (acid-shocked, sample CR). Three independent biological experiments were performed for each condition and transcriptomes were analyzed by RNA-Seq. Libraries were sequenced and between 6 and 11 million reads were obtained under each condition. Before subsequent analysis, a normalization process was carried out to eschew statistical deviations due to differences in library sizes (Alexandre et al., 2014). Differentially expressed genes in each condition were

identified using the statistical software R (Figure 3). 394 genes were expressed differentially and most of these genes (353) were located in the chromosome, but a few were located in plasmid A (3), plasmid B (8), and plasmid C (30) (Figure 3A). RNA-seq data were submitted to the Sequence Read Archive (SRA) database with the accession number GSE108074.

When comparing the transcriptomes of cells grown at pH 6.8 to cells adapted to pH 4.5, we observed that 351 genes were induced (chromosome: 288, pA: 3, pB: 2 and pC:58, respectively) (Figure 4A). The large majority of these genes was located on the chromosome and several others on plasmid C. Only very few of the induced genes were on plasmids A and B. 32 genes were repressed (chromosome: 17 and pC: 15) (Figures 3B,C, 4A). However, when comparing the transcriptomes of cells grown at pH 6.8 to the transcriptome of cells pre-grown at pH 6.8 and then acid-shocked for 45 min, only 11 genes were up-regulated (chromosome: 6, pB: 1 and pC: 4) and no gene was down-regulated under these conditions (Figures 3D, 4).

### Functional Analysis of Differentially Expressed Genes

Genes that were differentially expressed (DEGs) were grouped according to the COGs protein database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/>) and were classified into four principal categories: (1) processes and signaling, (2) information storage and processing, (3) metabolism and (4) poorly characterized (Figure 5). DEGs assigned to these principal categories were further sub-grouped. When comparing the transcriptomes of acid-adapted cells (sample BR) and control cells (sample AR), of the 126 differently expressed genes grouped into the COG

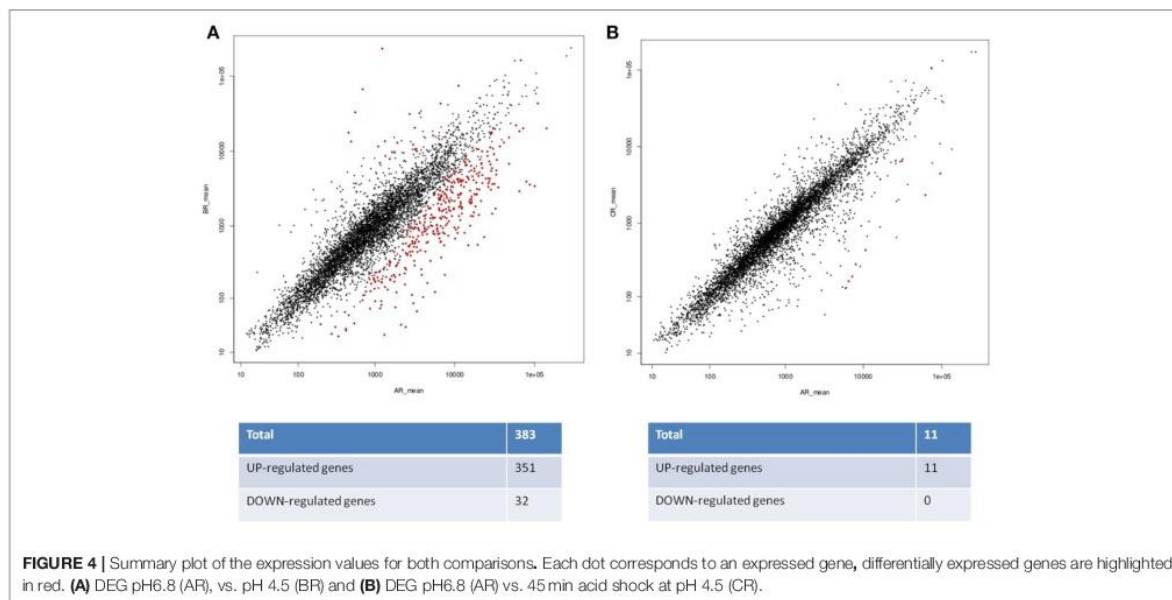
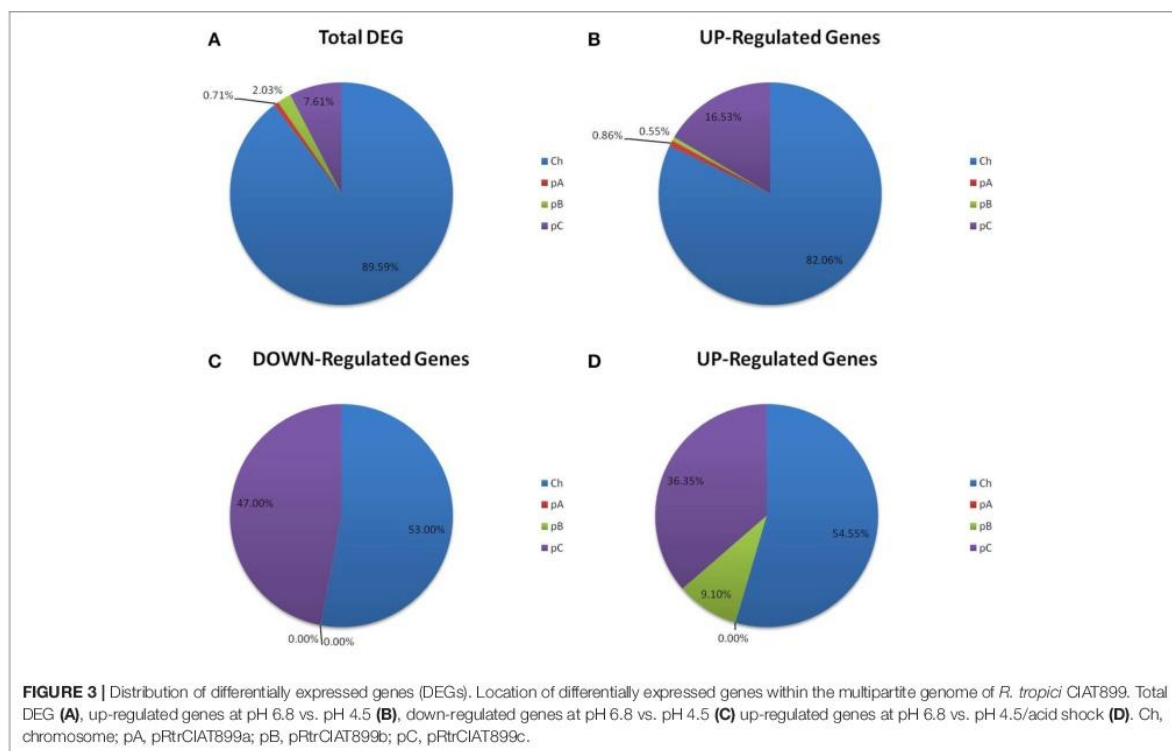


category metabolism, 35 DEGs were assigned to amino acid transport and metabolism (E), 26 DEGs to inorganic ion transport and metabolism (P), 17 DEGs to energy production and conversion (C) and to coenzyme transport and metabolism (H), 15 DEGs to carbohydrate transport and metabolism (G), 7 DEGs to lipid transport and metabolism (I), 6 DEGs to nucleotide transport and metabolism (F) and finally 3 DEGs were assigned to the sub-category secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism (Q). Another principal category that is also over-represented is information storage and processing (99 DEGs). Of these DEGs, 79 DEGs were grouped to the sub-categories translation, ribosome structure and biogenesis (J), 16 DEGs to transcription (K) and 4 DEGs to replication, recombination and repair (L). The third principal category is cellular processes and signaling with 55 DEGs. Of these, 19 DEGs were assigned to post-translational modification, protein turnover, and chaperones (O), 15 DEGs to cell wall/membrane/envelope biogenesis (M), 8 DEGs to intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport (U), 6 DEGs to defense mechanisms (V), 5 DEGs to signal transduction mechanism (T) and 2 DEGs to cell cycle control, cell division, chromosome partitioning (D). Finally, a few DEGs are poorly characterized and cannot be classified within the other principal categories. This includes General functional

prediction only (R, 12 DEGs) and Function unknown (S, 14 DEGs) (**Figure 5A**). When we analyzed the DEGs that were repressed comparing the transcriptomes of acid-adapted cells and control cells, 8 DEGs were grouped in amino acid transport and metabolism (E), and 3 DEGs in carbohydrate transport and metabolism (G). To a few other subcategories, one DEG each was assigned (M, T, D, J, P, C, F, and S). When comparing the transcriptomes of acid-shocked cells and control cells, we found only 11 DEGs, with 6 DEGs grouped into the principal category metabolism and one DEG grouped into the principal category information storage and processing (**Figure 5C**). In total, 62 DEGs could not be classified in COGs (for all conditions).

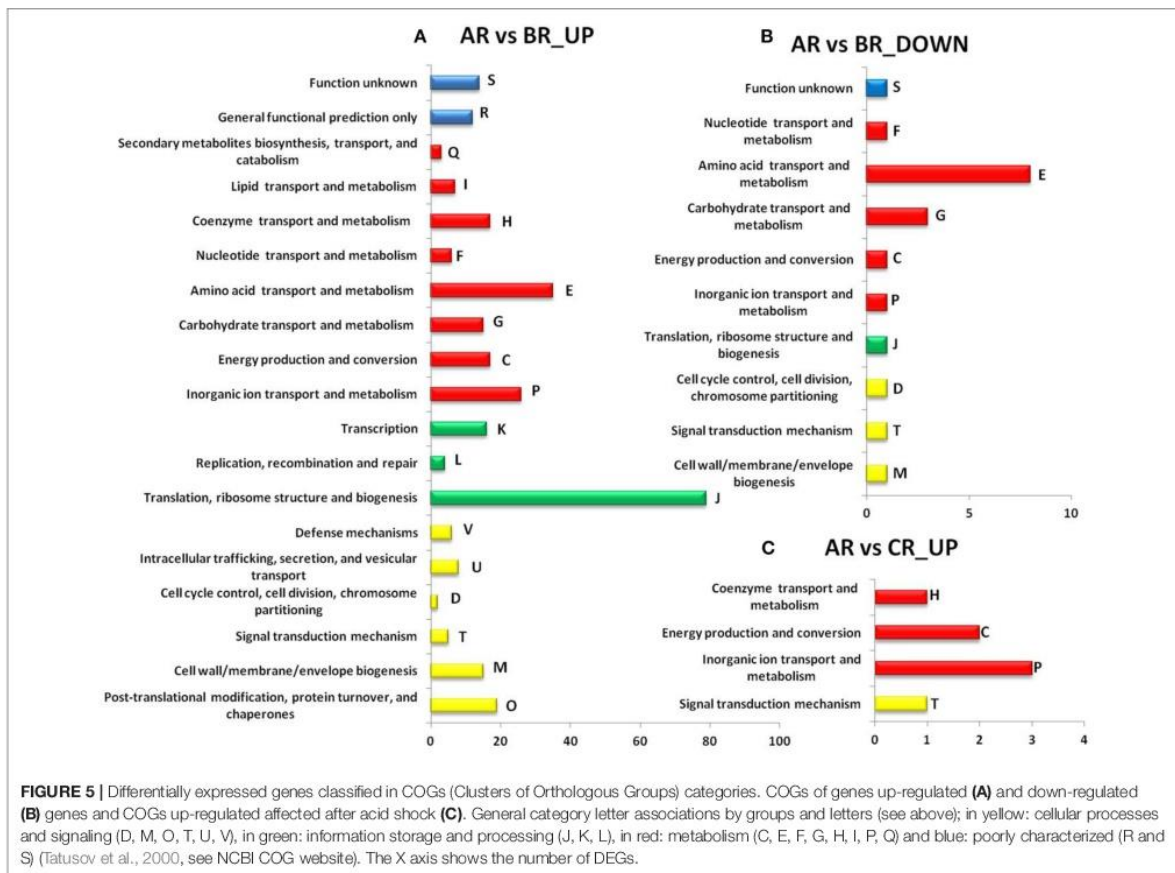
## DISCUSSION

The effects of acid stress have been characterized best in *Enterobacteriaceae* that can be exposed to extreme changes in extracellular pH as they pass through the inhospitable environment of the stomach into the lower digestive tract (Foster, 2004; Lund et al., 2014). Rhizobia show significant variability in their ability to grow under different low pH conditions, and within this family *R. tropici* CIAT899 is among the most tolerant strains (Martínez-Romero et al., 1991; Graham et al., 1994). The



capacity to grow and persist under environmental changes is essential for survival in the rhizosphere and within the nodules of leguminous plants. A Tn5-based transposon library of 18,300

insertional mutants was screened to identify mutants growing as the wildtype at neutral pH, but that did not grow or that showed a drastically reduced growth under low pH conditions.



This strategy aimed at identifying genes specifically required for the acid stress response, but not for growth at neutral pH. We isolated 26 Tn5 mutants that were unable to grow under acidic conditions (see Table 3). For 17 of these we could identify the transposon insertion sites, which could be located mainly to the chromosome, but also to the plasmids pA and pC. None of the selected mutants presented an insertion site in the symbiotic plasmid pB (Figure 2).

Vinuesa et al. (2003) had made a similar screening, but on a much smaller scale. One of the mutants identified in the earlier study had an insertion in the *sycA/olsC* gene cluster (Vinuesa et al., 2003; Rojas-Jiménez et al., 2005). Interestingly, the mutant JG8656 identified in the present study also had an insertion in the gene *olsC*. This gene codes for the ornithine lipid (OLs) hydroxylase OlsC, which is responsible for the 2-hydroxylation of the secondary fatty acid in OLs. This hydroxylation has been correlated to an increased resistance of *R. tropici* to acid stress and high temperatures (Vences-Guzmán et al., 2011). One hypothesis is that the presence of the additional hydroxyl group allows the formation of hydrogen bonds between lipid head groups, thereby making the membrane less fluid and less permeable to protons (Nikaido, 2003; Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al.,

2011; Sohlenkamp and Geiger, 2016). Another gene found by Vinuesa et al. was *lpiA* (low pH inducible) encoding a putative lysyl-phosphatidylglycerol (LPG) synthase, implicated in LPG biosynthesis. LPG is a membrane lipid whose presence confers resistance to various cationic peptides to *S. aureus* (Peschel et al., 2001). The *lpiA* gene is found in an operon with *atvA* (acid tolerance and virulence), which is an orthologue of *acvB* from *A. tumefaciens*. Interestingly, in our study we found a mutant (JG163) affected in *atvA*, which is consistent with the results obtained by Vinuesa and co-workers (Vinuesa et al., 2003). Furthermore, three mutants were affected in a gene whose product is a hypothetical protein (JG1076, JG4655 and JG6057), in this case two of them have an insertion in the same ORF (JG1076, JG4655). Interestingly, two more mutants (JG283 and JG9867) also presented transposon insertions in an identical ORF. This could be indicating that the transposon mutagenesis is close to saturation.

Mutant JG241 presents an insertion in a gene encoding a putative triose phosphate isomerase enzyme (*tpiA1*). It has been reported that *H. pylori*, in addition to the genes involved in urea hydrolysis, induces genes at pH 5.5 that are related to carbohydrate metabolism (including the *tpiA* gene). An

explanation suggested was that the cell's energy requirement is increased under this condition (Ang et al., 2001; Wen et al., 2003; Zanotti and Cendron, 2010). Besides, we found other mutants with insertions in genes related to anabolic and energy generation process like ribulose phosphate 3-epimerase (locus tag RTCIAT899\_RS09635), prolyl aminopeptidase (RTCIAT899\_RS05920) and acetyl-coenzyme A synthetase (Acs) (RTCIAT899\_RS18500). Another mutant (JG283) presented an insertion in a gene encoding a polysaccharide biosynthesis protein. Polysaccharide and exopolysaccharide biosynthesis has been reported to help counteract high proton concentrations by preventing protons from passing into the cell (Aarons and Graham, 1991; Graham et al., 1994; Reeve et al., 1997, 1998; Hellweg et al., 2009). Mutant JG9587 has a Tn5 insertion in an ORF encoding a putative antiporter protein, whose function could be to expel protons toward the periplasm under acid stress conditions. In *E. coli* the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter (NhaA) helps to maintain Na<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> homeostasis and several reports indicate that NhaA activity is increased at high or neutral pH (Padan et al., 2004; Padan, 2008). In contrast, *H. pylori* has a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter whose activity is high at acidic and neutral pH, indicating that *H. pylori* employs this antiporter under acidic conditions (Inoue et al., 1999).

In some bacteria an increase of the extracellular proton concentration is sensed through two-component systems (Lund et al., 2014), examples being the PhoPQ system from *S. typhimurium* which is induced in acidic conditions (Prost et al., 2007) and the ArsRS system from *H. pylori*, which senses increased proton concentrations and responds by regulating genes of biosynthesis and metabolism of the urease system (Pflock et al., 2006). Mutant JG2646 presented a transposon insertion in a gene encoding a response regulator. This gene is found in an operon with a gene encoding a histidine kinase, and so this two-component system may be sensing the external pH and may be responsible for the activation of a subset of genes under this condition. Two more mutants had transposon insertions in genes encoding transcription factors (JG9477 and JG8654). These genes code for proteins with homology to MarR and FtrA (locus tag RTCIAT899\_RS00995 and RTCIAT899\_RS009190), respectively. MarR presents similarity to the transcriptional regulator Rv1404 from *Mycobacterium tuberculosis*, which regulates the transcription of the genes *rv1403c* and *rv1405c* encoding putative S-adenosyl methionine (SAM)-dependent methyltransferases. This activation under acid stress conditions (pH 5.5) also requires *phoP* (Healy et al., 2016). In the case of FtrA, there are no reports about its role acid stress conditions.

In mutant JG5373 the transposon insertion is probably affecting a gene whose product might be involved in catalyzing the condensation of formaldehyde and glutathione to S-hydroxymethylglutathione (*gshA*). In the genomic context of *R. tropici* CIAT899, a glutamate synthase (possibly *gshB*) is located downstream of *gshA*. Riccillo et al. reported that a mutant affected in a gene involved in the biosynthesis of tripeptide glutathione (*gshB*) in *R. tropici* was affected in growth under acidic conditions (Riccillo et al., 2000). It is possible that the transposon insertion in the mutant JG5373 creates a polar effect

affecting glutathione biosynthesis and causing susceptibility to acid stress. Most often a polar effect occurs when the transposon is inserted into the first ORFs of an operon affecting the expression of the downstream genes of the same operon (Zipser, 1969). In our study, we identified three mutants (JG4882, JG163 and JG2646), whose Tn5 insertion occurred in putative operon, however, only the mutant JG2646 has the insertion in the first gene (Supplementary Figure S1) of the operon. The latter transposon insertion can be expected to cause a polar effect on the expression of the downstream genes. This hypothesis was verified by a complementation assay of mutant JG2646: the gene encoding for the response regulator alone was not able to complement the mutant phenotype when provided in trans whereas the complete operon (including the histidine kinase (HK), locus tag RT899\_RS05455) complemented the mutant phenotype when provided in trans.

The results obtained by our library screening indicate that outside of certain conserved components of the acid stress response, such as response regulators or antiporters, the genes necessary for an acid stress response vary from species to species. To study the acid stress response from another angle we used RNA-seq to analyze the transcriptomes of *R. tropici* CIAT899 cells grown at neutral pH (6.8, control condition), of cells grown at pH 4.5 (acid-adapted cells), and of cells pre-grown at pH 6.8 and then acid-shocked for 45 min at pH 4.5. We chose such a short time (45 min) for the acid shock because we were interested in the very first transcriptional responses. Earlier transcriptome studies in *S. meliloti* 1021 applied a pH shift from pH 7.0 to pH 5.75 (the lowest pH at which *S. meliloti* grows) for varying times (from 3 to 63 min), observing the maximum induction between 33 and 63 min (Hellweg et al., 2009). Our RNA-seq results exhibit that gene expression of *R. tropici* CIAT899 was broadly changed by the acid stress. Hundreds of genes (351 up-regulated and 32 down-regulated in acidic conditions and 11 up-regulated in acid shock) were significantly up- or down-regulated under acidic conditions (Table 4 and Supplementary Table S1). These differently expressed genes (DEGs) can be functionally grouped according to the predicted functions of the encoded proteins. We identified several genes associated with metal transport (like RTCIAT899\_RS04615, RTCIAT899\_RS04620, RTCIAT899\_RS04610, RTCIAT899\_RS17535, RTCIAT899\_RS10385, or RTCIAT899\_RS14255). It is known that in tropical acid soils high concentrations of metals like Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, and often, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> and mercury ions are very common. Therefore, these metal transporters could be contributing to the efflux of these metals to avoid the toxic effects of metal ions (Montanini et al., 2007) when the cells encounter high proton and metal concentrations. ABC transporters transport solutes across the membrane utilizing the energy of ATP hydrolysis and they have been over-expressed after acid shock in other bacteria, including *S. aureus* (Bore et al., 2007). In our study, several of the identified DEGs encoded ABC transporters that were significantly over-expressed under acid stress (Jia et al., 2017) (Figure 5 and Supplementary Table S1). Furthermore, we identified a few putative transcription factors that might be implicated in the regulation of efflux pumps under acid stress

**TABLE 4 |** List of differentially expressed genes showing the strongest induction or repression.

Locus tag	Location	Log2FC	COG	Function
<b>UP-REGULATED GENES pH 4.5 vs. pH 6.8</b>				
RTCIAT899_RS04615	Chromosome	5.7363999	P	Mn/Zn ABC transporter permease
RTCIAT899_RS04620	Chromosome	5.5273566	P	Mn/Zn ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS26115	pRtrCIAT899c	5.2777315	P	Potassium-transporting ATPase subunit A
RTCIAT899_RS27660	pRtrCIAT899c	5.1789806	Q	L-lysine 6-monooxygenase (Lysine 6-N-hydroxylase)(Lysine N(6)-hydroxylase) (Lysine-N-oxygenase)
<b>RTCIAT899_RS10390</b>	<b>Chromosome</b>	<b>5.1308622</b>	<b>P</b>	<b>Zinc ABC transporter substrate-binding protein</b>
RTCIAT899_RS07330	Chromosome	5.1206373	J	30S ribosomal protein S7
RTCIAT899_RS07325	Chromosome	5.0474634	J	30S ribosomal protein S12
<b>RTCIAT899_RS28825</b>	<b>pRtrCIAT899c</b>	<b>4.8717347</b>	<b>KT</b>	<b>Phage shock protein A, PspA</b>
RTCIAT899_RS13555	Chromosome	4.7818776	P	HmuS-like siderophore transporter
RTCIAT899_RS01890	Chromosome	4.7545879	S	Metalloproteinase
RTCIAT899_RS13560	Chromosome	4.7083112	P	Hemin ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS07335	Chromosome	4.6010438	J	Elongation factor G
RTCIAT899_RS28820	pRtrCIAT899c	4.464704	S	Hypothetical protein
RTCIAT899_RS29995	pRtrCIAT899c	4.3322649	KG	DeoR family transcriptional regulator
RTCIAT899_RS12735	Chromosome	4.3314229	E	2-isopropylmalate synthase
<b>RTCIAT899_RS10890</b>	<b>Chromosome</b>	<b>4.252498</b>	<b>EH</b>	<b>Acetolactate synthase 3 large subunit</b>
RTCIAT899_RS04610	Chromosome	4.1803897	P	Mn/Zn ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS23310	Chromosome	4.1736339		Hypothetical protein
RTCIAT899_RS16580	Chromosome	2.2041402	C	FOF1 ATP synthase subunit epsilon
<b>RTCIAT899_RS16685</b>	<b>Chromosome</b>	<b>1.8911647</b>	<b>C</b>	<b>Dihydroliipoamide succinyltransferase</b>
<b>DOWN-REGULATED GENES pH 4.5 vs. pH 6.8</b>				
RTCIAT899_RS11180	Chromosome	-0.7724538	D	Cell division protein FtsZ
RTCIAT899_RS25455	pRtrCIAT899c	-1.0066353	C	Oxidoreductase alpha (molybdopterin) subunit
RTCIAT899_RS15135	Chromosome	-1.0153571	G	Maltodextrin phosphorylase
RTCIAT899_RS02985	Chromosome	-1.2719958	E	Glutamine synthetase 2
RTCIAT899_RS15110	Chromosome	-1.7130873	S	Transglutaminase
RTCIAT899_RS13620	Chromosome	-2.014387	E	Zn-dependent hydrolase
RTCIAT899_RS01510	Chromosome	-2.4492838	G	Sugar ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS28315	pRtrCIAT899c	-2.5649069	T	Hybrid sensor histidine kinase/response regulator
RTCIAT899_RS28150	pRtrCIAT899c	-2.594403	G	Amino acid ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS25690	pRtrCIAT899c	-2.6742957	J	Amidase
<b>UP-REGULATED GENES SHOCK BY ACID (pH 4.5/45 MIN)</b>				
RTCIAT899_RS24705	pRtrCIAT899c	5.280397	P	Nitrate ABC transporter, permease protein
<b>RTCIAT899_RS10390</b>	<b>Chromosome</b>	<b>5.225411</b>	<b>P</b>	<b>Zinc ABC transporter substrate-binding protein</b>
RTCIAT899_RS24685	pRtrCIAT899c	4.829516	C	Nitrate reductase
<b>RTCIAT899_RS28825</b>	<b>pRtrCIAT899c</b>	<b>4.419892</b>	<b>T</b>	<b>Phage shock protein A, PspA</b>
RTCIAT899_RS02060	Chromosome	3.059133	P	Choline-sulfatase
<b>RTCIAT899_RS10890</b>	<b>Chromosome</b>	<b>2.250506</b>	<b>H</b>	<b>Acetolactate synthase 3 large subunit</b>
<b>RTCIAT899_RS16685</b>	<b>Chromosome</b>	<b>1.982522</b>	<b>C</b>	<b>Dihydroliipoamide succinyltransferase</b>

Genes differentially expressed in both conditions are highlighted in boldface. DEGs were those with a *p*-value in hypergeometrical test inferior to 0.15.

(like DeoR, RTCIAT899\_RS29995; TetR, RTCIAT899\_RS10760, RTCIAT899\_RS28830, or YebC/PmpR, RTCIAT899\_RS14585). The TetR family of transcriptional regulators has been reported to be involved in the regulation of efflux pumps (Perrone et al., 2017) and drug efflux in mycobacteria (Betts et al., 2003; Wei et al., 2014). Among the DEGs that were up-regulated were also the *hyc* genes encoding hydrogenases proteins. In *E. coli* and *Salmonella* these hydrogenases can reduce acid stress by

proton consumption and H<sub>2</sub> production. In this study, 10 genes encoding hydrogenases were over-expressed and the transcriptional induction of hydrogenase genes observed in this study is probably involved in the acid stress response, indicating that *R. tropici* uses this mechanism to resist high proton concentrations (**Supplementary Table S1**; Hayes et al., 2006; Zbell and Maier, 2009; Noguchi et al., 2010; Jia et al., 2017). F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> synthase normally catalyzes the synthesis of ATP

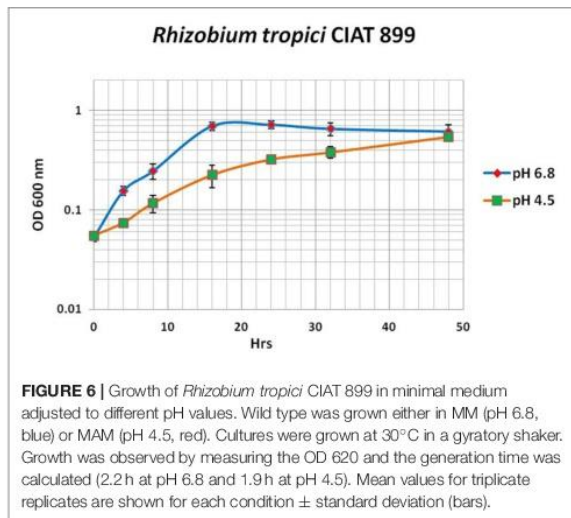


**TABLE 5** | Expression of genes whose orthologues are reported to be involved in acid stress response in other bacteria.

Gene	Locus tag	log2FC		Product	References
		AB	AC		
<i>lpiA</i>	RTCIA899_RS14615	0.72083386	0.17611909	Low pH inducible protein	Vinuesa et al., 2003
<i>atvA</i>	RTCIA899_RS14610	0.81060257	0.31216314	Acid tolerance and virulence protein	
<i>oisC</i>	RTCIA899_RS13445	-0.16562978	-0.35630822	Omithine lipid biosynthesis protein OisC	Vences-Guzmán et al., 2011
<i>eptA</i>	RTCIA899_RS13365	0.45261766	-0.28158652	Phosphoethanolamine transferase	Martinić et al., 2011
<i>cfa1</i>	RTCIA899_RS04265	0.52083757	-0.09048503	Class I SAM-dependent methyltransferase	Shabala and Ross, 2008
<i>cfa2</i>	RTCIA899_RS17235	0.03053786	-0.92576353	Class I SAM-dependent methyltransferase	
<i>cfa3</i>	RTCIA899_RS24775	-0.7897075	-0.08312349	Class I SAM-dependent methyltransferase	
<i>cfa4</i>	RTCIA899_RS18940	0.67863217	0.54558424	SAM-dependent methyltransferase	
<i>cfa5</i>	RTCIA899_RS18960	0.18275374	0.45288988	SAM-dependent methyltransferase	
<i>Exo</i>	RTCIA899_RS06570	-1.33771965	-0.11074631	EPS transporter family	Yuan et al., 2008
<i>exoX</i>	RTCIA899_RS29115	0.10549587	0.69617043	EPS production repressor protein ExoX	Hellweg et al., 2009
<i>Exo</i>	RTCIA899_RS29675	0.33066767	0.12072731	EPS synthesis protein	Cunningham and Munns, 1984
<i>Exo</i>	RTCIA899_RS24840	-1.07127212	-0.35927437	Putative EPS biosynthesis protein	
<i>exoZ</i>	RTCIA899_RS07595	-0.09169763	0.17806745	EPS production protein exoz	
<i>Exo</i>	RTCIA899_RS10240	0.06877117	-0.05075594	EPS biosynthesis protein	
<i>exoQ</i>	RTCIA899_RS29130	-0.87644662	-0.09605896	EPS polymerase ExoQ	
<i>Exo</i>	RTCIA899_RS27545	-0.72836468	0.54432119	EPS polymerization protein	
<i>Exo</i>	RTCIA899_RS24315	-0.11007681	-0.08717239	EPS biosynthesis protein	
<i>Exo</i>	RTCIA899_RS24280	-0.29950943	-0.15973563	EPS biosynthesis protein	
<i>trkD</i>	RTCIA899_RS04105	0.2878656	-0.04007632	Potassium transporter Kup	Foster, 2004
<i>gshB</i>	RTCIA899_RS01980	1.00662168	0.28522761	Glutathione synthase	Ricillo et al., 2000
<i>kefB/kefC</i>	RTCIA899_RS04005	-0.13325459	0.09956478	System protein KefB/KefC	
<i>Cic</i>	RTCIA899_RS10520	-0.01091242	0.05697754	Chloride channel protein	Accardi and Miller, 2004
<i>Cic</i>	RTCIA899_RS04900	-0.00017649	-0.31726611	CiC-type chloride channel	
<i>Cic</i>	RTCIA899_RS14650	0.02874732	-0.2712195	CiC-type chloride channel	
<i>sysA</i>	RTCIA899_RS13450	0.00631424	-0.32276777	CiC-type chloride channel	Rojas-Jiménez et al., 2005
<i>dnaK</i>	RTCIA899_RS00760	1.83544366	0.34592161	Molecular chaperone DnaK	Teixeira-Gomes et al., 2000; Bearson et al., 2006
<i>groL</i>	RTCIA899_RS03935	0.61461457	-0.3681504	Molecular chaperone GroEL	Zanotti and Cendron, 2010
<i>groS</i>	RTCIA899_RS03940	0.9051802	-0.26609308	Molecular chaperone GroES	Zanotti and Cendron, 2010
<i>ureC</i>	RTCIA899_RS13685	-0.75813131	-0.1082779	Urease subunit alpha	Mobley et al., 1995; Bandara et al., 2007
<i>ureE</i>	RTCIA899_RS13675	-0.90771714	0.23427801	Urease accessory protein UreE	
<i>ureF</i>	RTCIA899_RS13670	-0.71555469	-0.03317185	Urease accessory protein UreF	
<i>ure</i>	RTCIA899_RS13700	-1.03377163	-0.10253492	Urease subunit beta	
<i>ure</i>	RTCIA899_RS13715	-1.18510604	0.08358709	Urease accessory protein	
<i>ure</i>	RTCIA899_RS13710	-0.99533936	-0.03468376	Urease subunit gamma	
<i>ureG</i>	RTCIA899_RS13665	-2.47268777	0.08669492	Urease accessory protein UreG	
<i>ure</i>	RTCIA899_RS13690	-0.77758167	0.04132216	Urease accessory protein	
<i>ure</i>	RTCIA899_RS13705	-0.92906417	-0.10094011	Hypothetical protein	

from ADP using the energy derived from an electrochemical proton gradient. Under acid stress conditions, hydrolysis of ATP may be used to expel protons from the cytoplasm. This flow of protons through the  $F_0$  subunit could contribute to pH homeostasis and therefore contributed to acid stress response like in *E. coli* or *Corynebacterium glutamicum* (Diez et al., 2004; Barriuso-Iglesias et al., 2013). In our study we identify two gene clusters encoding several subunits of  $F_0F_1$  ATPase encompassing nine genes involved in the assembly of the two units of ATPase ( $F_0$  and  $F_1$ ), which are up-regulated more than 4

times at pH 4.5 compared to pH 6.8. Sigma factors are subunits of the bacterial RNA polymerase (RNAP) playing important roles in transcription initiation, especially during promoter recognition. Specific sigma factors have functions during the differential expression of genes during abiotic stress, during development or during specific growth phases (Paget, 2015). The sigma factor E (SigE) in *M. tuberculosis* is up-regulated during acid stress response, and Bansal et al. (2017) demonstrated that PhoP interacts with acid-inducible extra-cytoplasmic SigE to regulate a complex transcriptional of genes. In this study,



we observed that three sigma factors (RTCIAT899\_RS15835, RTCIAT899\_RS13855, and RTCIAT899\_RS12250) were induced during the acid stress response. These sigma factors are possibly responsible for regulating other genes important for growth under acid conditions. In addition, forty hypothetical proteins were differentially expressed in acidic conditions (see **Table 4** and **Supplementary Table S1**). Further studies are required to explore the functions of these proteins under acid stress. We also specifically looked at the transcriptome data of orthologues of genes that had been reported to contribute to the acid stress response in other bacteria. For example, the gene glutathione synthase (RTCIAT899\_RS01980) and the molecular chaperone DnaK (RTCIAT899\_RS00760), have a  $\log_2FC$  of 1 and 1.8 respectively. Genes such as *lpiA* (RTCIAT899\_RS14615) and *atvA* (RTCIAT899\_RS14610) also have a similar  $\log_2FC$ , and most of the orthologues of genes involved in the acid response in other bacteria have very low  $\log_2FC$  values or are even repressed (**Table 5**). To our surprise only a very small number of genes was induced in response to 45 min of acid shock. We had designed our experiment based on the article published by Hellweg et al. (2009). Maybe the transcription induction responding to acid stress is slower in *R. tropici*, but there is also the possibility that pH 4.5 is not sufficiently stressful for the bacteria to induce a major short-term response (**Figure 6**).

## REFERENCES

- Aarons, S. R., and Graham, P. H. (1991). Response of *Rhizobium leguminosarum* by *phaseoli* to acidity. *Plant Soil* 134, 145–151. doi: 10.1007/BF00010727
- Accardi, A., and Miller, C. (2004). Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl<sup>-</sup> channels. *Nature* 427, 803–807. doi: 10.1038/nature02314
- Alexandre, A., Laranjo, M., and Oliveira, S. (2014). Global transcriptional response to heat shock of the legume symbiont *Mesorhizobium loti*

Although *R. tropici* grows slower at pH 4.5 than at pH 6.8, there is no clear adaptation phase visible in the growth curve obtained at the lower pH.

As expected, both, the Tn5 mutagenesis and RNA-seq approach, produced complementary sets of results. But, the use of both approaches allows the identification of a wider range of genes involved in the acid stress response. Therefore, with this work, we make an important step toward comprehending the genetic bases to understanding the acid stress response in *R. tropici* CIAT899. Much work remains to be done to understand how all the identified genes contribute to the acid stress response. This is especially interesting in the case of genes where the correlation to acid stress is not completely obvious.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

JG-C and CS designed the study. JG-C and CS carried out the experiments. JG-C and LL carried out the data analysis. JG-C and CS were involved in drafting the manuscript and all authors read and approved the final manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

JG-C was a recipient of a Ph.D. scholarship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) and this article is part of his thesis at the Ph.D. Program in Biomedical Sciences (Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas) of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Research in our lab was supported by grants from CONACyT-Mexico (153200, 237713), PAPIIT/UNAM (IN202413 and IN208116), and UC-MEXUS/CONACyT (CN-12-552) to CS.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.00846/full#supplementary-material>

**Supplementary Table S1 |** Complete list of differentially expressed genes. DEGs over-regulated in acid stress conditions. AR\_vs\_BR\_UP (pH 6.8 vs. pH 4.5), AR\_vs\_BR\_DOWN (pH 6.8 vs. pH 4.5) and AR\_vs\_CR\_UP (pH 6.8 vs. acid shock 45 min). Genes differentially expressed in both conditions are highlighted in boldface.

**Supplementary Figure S1 |** Genomic context of Tn5 mutants from *R. tropici* CIAT899. White arrows represent the genes that were interrupted by the transposon Tn5 (yellow triangles), gray arrows represent neighboring genes to each mutated gene, black lines indicate the genome of *R. tropici* CIAT899.

- MAFF303099 comprises extensive gene downregulation. *DNA Res.* 21, 195–206. doi: 10.1093/dnares/dst050
- Ang, S., Lee, C. Z., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., et al. (2001). Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: study in genomic scale by microarray. *Infect. Immun.* 69, 1679–1686. doi: 10.1128/IAI.69.3.1679-1686.2001
- Audia, J. P., Webb, C. C., and Foster, J. W. (2001). Breaking through the acid barrier: an orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.* 291, 97–106. doi: 10.1078/1438-4221-00106

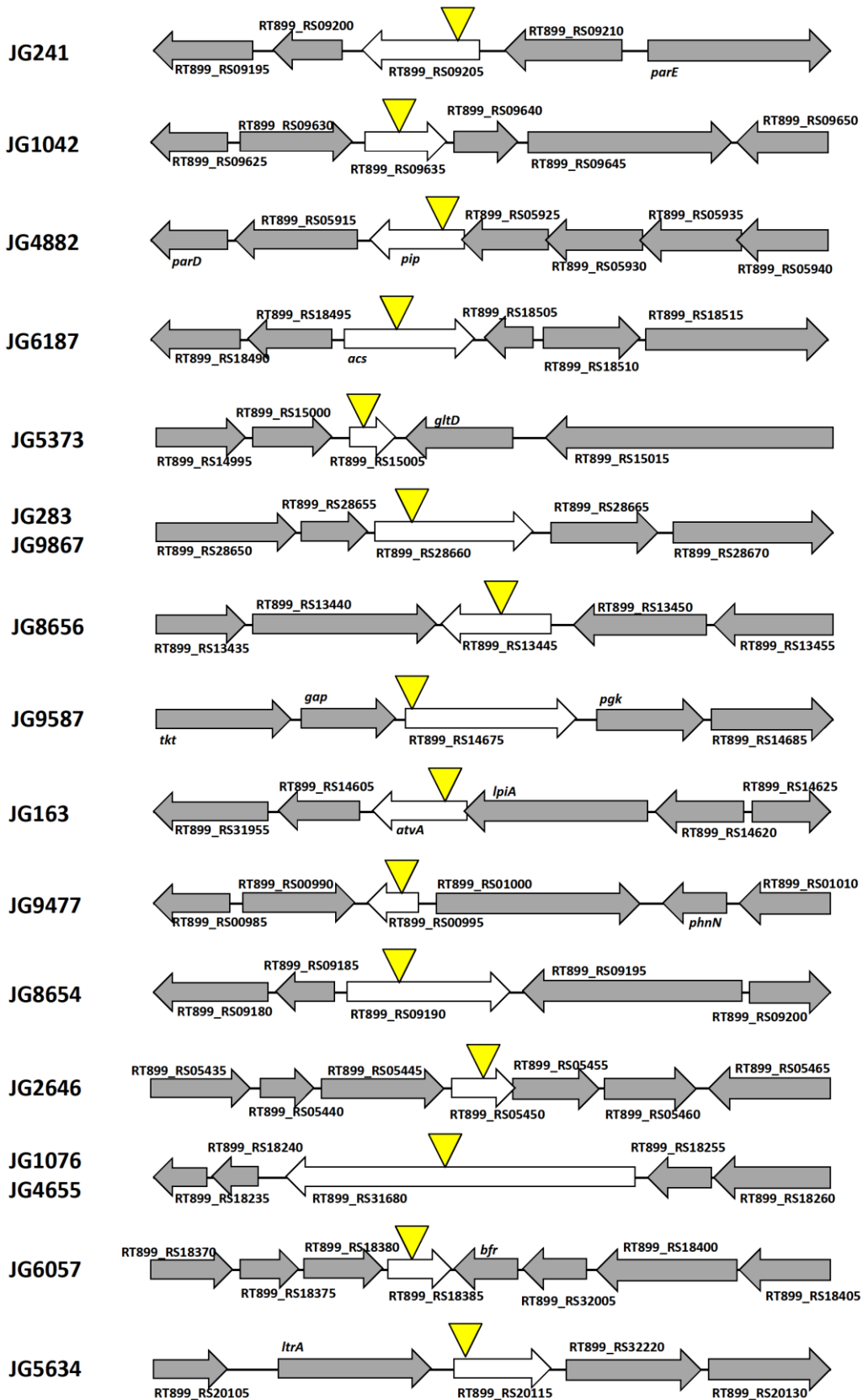
- Bandara, A. B., Contreras, A., Contreras-Rodríguez, A., Martins, A. M., Dobrea, V., Poff-Reichow, S., et al. (2007). *Brucella suis* urease encoded by *ure1* but not *ure2* is necessary for intestinal infection of BALB/c mice. *BMC Microbiol.* 7:57. doi: 10.1186/1471-2180-7-57
- Bansal, R., Anil Kumar, V., Sevalkar, R. R., Singh, P. R., and Sarkar, D. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* virulence-regulator PhoP interacts with alternative sigma factor SigE during acid-stress response. *Mol. Microbiol.* 104, 400–411. doi: 10.1111/mmi.13635
- Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Sola-Landa, A., and Martin, J. F. (2013). Transcriptional control of the F0F1-ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: sigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microb. Biotechnol.* 6, 178–188. doi: 10.1111/1751-7915.12022
- Bearson, S. M., Bearson, B. L., and Rasmussen, M. A. (2006). Identification of *Salmonella enterica* serovar typhimurium genes important for survival in the swine gastric environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 2829–2836. doi: 10.1128/AEM.72.4.2829-2836.2006
- Beringer, J. E. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 84, 188–198. doi: 10.1099/00221287-84-1-188
- Betts, J. C., McLaren, A., Lennon, M. G., Kelly, F. M., Lukey, P. T., Blakemore, S. J., et al. (2003). Signature gene expression profiles discriminate between ioniazid-, thiolactomycin-, and triclosan-treated *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 2903–2913. doi: 10.1128/AAC.47.9.2903-2913.2003
- Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, O., Rode, T. M., and Holck, A. (2007). Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology* 153, 2289–2303. doi: 10.1099/mic.0.2007/005942-0
- Castanie-Cornet, M. P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., and Foster, J. W. (1999). Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181, 3525–3535.
- Cunningham, S. D., and Munns, D. N. (1984). The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 48, 1273–1276. doi: 10.2136/sssaj1984.03615995004800060014x
- De Biase, D., and Pennacchietti, E. (2012). Glutamate decarboxylase-dependent acid resistance in orally acquired bacteria: function, distribution and biomedical implications of the *gadBC* operon. *Mol. Microbiol.* 86, 770–786. doi: 10.1111/mmi.12020
- Diez, M., Zimmermann, B., Borsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., et al. (2004). Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F0F1-ATP synthase. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 135–141. doi: 10.1038/nsmb718
- Ditta, G., Schmidhauser, T., Yakobson, E., Lu, P., Liang, X. W., Finlay, D. R., et al. (1985). Plasmids related to the broad host range vector, pRK290, useful for gene cloning and for monitoring gene expression. *Plasmid* 13, 149–153. doi: 10.1016/0147-619X(85)90068-X
- Foster, J. W. (1999). When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 170–174. doi: 10.1016/S1369-5274(99)80030-7
- Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 898–907. doi: 10.1038/nrmicro1021
- Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martínez, E., et al. (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* Umr1899. *Can. J. Microbiol.* 40, 198–207. doi: 10.1139/m94-033
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557–580. doi: 10.1016/S0022-2836(83)80284-8
- Harrison, P. W., Lower, R. P., Kim, N. K., and Young, J. P. (2010). Introducing the bacterial 'chromid': not a chromosome, not a plasmid. *Trends Microbiol.* 18, 141–148. doi: 10.1016/j.tim.2009.12.010
- Hayes, E. T., Wilks, J. C., Sanfilippo, P., Yohannes, E., Tate, D. P., Jones, B. D., et al. (2006). Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiol.* 6:89. doi: 10.1186/1471-2180-6-89
- Healy, C., Golby, P., MacHugh, D. E., and Gordon, S. V. (2016). The MarR family transcription factor Rv1404 coordinates adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acid stress via controlled expression of Rv1405c, a virulence-associated methyltransferase. *Tuberculosis* 97, 154–162. doi: 10.1016/j.tube.2015.10.003
- Hellweg, C., Pühler, A., and Weidner, S. (2009). The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiol.* 9:37. doi: 10.1186/1471-2180-9-37
- Huang, G., Zhang, L., and Birch, R. G. (2000). Rapid amplification and cloning of Tn5 flanking fragments by inverse PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 31, 149–153. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.00781.x
- Hungria, M., Andrade, D. D., Chueire, L. M. D., Probanza, A., Gutiérrez-Manero, F. J., and Megias, M. (2000). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1515–1528. doi: 10.1016/S0038-0717(00)00663-8
- Inoue, H., Sakurai, T., Ujike, S., Tsuchiya, T., Murakami, H., and Kanazawa, H. (1999). Expression of functional Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporters of *Helicobacter pylori* in antiporter-deficient *Escherichia coli* mutants. *FEBS Lett.* 443, 11–16. doi: 10.1016/S0014-5793(98)01652-4
- Jia, K., Wang, G. Y., Liang, L. J., Wang, M., Wang, H. H., and Xu, X. L. (2017). Preliminary transcriptome analysis of mature biofilm and planktonic cells of *Salmonella enteritidis* exposure to acid stress. *Front. Microbiol.* 8:1861. doi: 10.3389/fmicb.2017.01861
- Kieboom, J., and Abe, T. (2006). Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J. Bacteriol.* 188, 5650–5653. doi: 10.1128/JB.00323-06
- Kingsley, M. T., and Bohlool, B. (1992). Extracellular polysaccharide is not responsible for aluminum tolerance of *Rhizobium leguminosarum* by phaseoli CIAT899. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1095–1101.
- Kovach, M. E., Phillips, R. W., Elzer, P. H., Roop, R. M., and Peterson, K. M. (1994). pBBR1mcs - a broad-host-range cloning vector. *Biotechniques* 16, 800–802.
- Lund, P., Tramonti, A., and De Biase, D. (2014). Coping with low pH: molecular strategies in neutrophilic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 1091–1125. doi: 10.1111/1574-6976.12076
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., and Pardo, M. A. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41, 417–426. doi: 10.1099/00207713-41-3-417
- Martinić, M., Hoare, A., Contreras, I., and Alvarez, S. A. (2011). Contribution of the lipopolysaccharide to resistance of *Shigella flexneri* 2a to extreme acidity. *PLoS ONE* 6:e25557. doi: 10.1371/journal.pone.0025557
- Mobley, H. L., Island, M. D., and Hausinger, R. P. (1995). Molecular biology of microbial ureases. *Microbiol. Rev.* 59, 451–480.
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., and Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics* 8:107. doi: 10.1186/1471-2164-8-107
- Muglia, C. I., Grasso, D. H., and Aguilar, O. M. (2007). *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. *Microbiology* 153, 1286–1296. doi: 10.1099/mic.0.2006/003483-0
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67, 593–656. doi: 10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003
- Noguchi, K., Riggins, D. P., Eldahan, K. C., Kitko, R. D., and Slonczewski, J. L. (2010). Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli*. *PLoS ONE* 5:e10132. doi: 10.1371/journal.pone.0010132
- Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G. P., Ollero, F. J., Nicolas, M. F., Rodrigues, E. P., et al. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics* 13:735. doi: 10.1186/1471-2164-13-735
- Padan, E. (2008). The enlightening encounter between structure and function in the NhaA Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiporter. *Trends Biochem. Sci.* 33, 435–443. doi: 10.1016/j.tibs.2008.06.007
- Padan, E., Tzuber, T., Herz, K., Kozachkov, L., Rimon, A., and Galili, L. (2004). NhaA of *Escherichia coli*, as a model of a pH-regulated Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 2–13. doi: 10.1016/j.bbabi.2004.04.018
- Paget, M. S. (2015). Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: structure, function and distribution. *Biomolecules* 5, 1245–1265. doi: 10.3390/biom5031245

- Perrone, F., De Siena, B., Muscariello, L., Kendall, S. L., Waddell, S. J., and Sacco, M. (2017). A novel TetR-Like transcriptional regulator is induced in acid-nitrosative stress and controls expression of an efflux pump in mycobacteria. *Front. Microbiol.* 8:2039. doi: 10.3389/fmicb.2017.02039
- Peschel, A., Jack, R. W., Otto, M., Collins, L. V., Staubitz, P., Nicholson, G., et al. (2001). *Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor MprF is based on modification of membrane lipids with L-lysine. *J. Exp. Med.* 193, 1067–1076. doi: 10.1084/jem.193.9.1067
- Pflock, M., Finsterer, N., Joseph, B., Mollenkop, H., Meyer, T. F., and Beier, D. (2006). Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *J. Bacteriol.* 188, 3449–3462. doi: 10.1128/JB.188.10.3449-3462.2006
- Prost, L. R., Daley, M. E., Le Sage, V., Bader, M. W., Le Moual, H., Klevit, R. E., et al. (2007). Activation of the bacterial sensor kinase PhoQ by acidic pH. *Mol. Cell* 26, 165–174. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.008
- Reeve, W. G., Brau, L., Castelli, J., Garau, G., Sohlenkamp, C., Geiger, O., et al. (2006). The *Sinorhizobium medicae* WSM419 *IpiA* gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions. *Microbiology* 152, 3049–3059. doi: 10.1099/mic.0.28764-0
- Reeve, W. G., Dilworth, M. J., Tiwari, R. P., and Glenn, A. R. (1997). Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710 involves *exoR*. *Microbiology* 143, 1951–1958. doi: 10.1099/00221287-143-6-1951
- Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Wong, C. M., Dilworth, M. J., and Glenn, A. R. (1998). The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology* 144, 3335–3342. doi: 10.1099/00221287-144-12-3335
- Ricciolo, P. M., Muglia, C. I., de Bruijn, F. J., Roe, A. J., Booth, I. R., and Aguilar, O. M. (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.* 182, 1748–1753. doi: 10.1128/JB.182.6.1748-1753.2000
- Rojas-Jiménez, K., Sohlenkamp, C., Geiger, O., Martínez-Romero, E., Werner, D., and Vinuesa, P. (2005). A ClC chloride channel homolog and ornithine-containing membrane lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 are involved in symbiotic efficiency and acid tolerance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18, 1175–1185. doi: 10.1094/MPMI-18-1175
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., and Pühler, A. (1994). Small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19 - selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73. doi: 10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Shabala, L., and Ross, T. (2008). Cyclopropane fatty acids improve *Escherichia coli* survival in acidified minimal media by reducing membrane permeability to H<sup>+</sup> and enhanced ability to extrude H<sup>+</sup>. *Res. Microbiol.* 159, 458–461. doi: 10.1016/j.resmic.2008.04.011
- Simon, R., Priefer, U., and Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering - transposon mutagenesis in gram-negative bacteria. *Bio-Technology* 1, 784–791. doi: 10.1038/nbt1183-784
- Sohlenkamp, C. (2017). "Membrane homeostasis in bacteria upon pH challenge," in *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes*, ed O. Geiger (Cham: Springer International Publishing), 1–13.
- Sohlenkamp, C., Galindo-Lagunas, K. A., Guan, Z. Q., Vinuesa, P., Robinson, S., Thomas-Oates, J., et al. (2007). The lipid lysyl-phosphatidylglycerol is present in membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and confers increased resistance to polymyxin B under acidic growth conditions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 1421–1430. doi: 10.1094/MPMI-20-11-1421
- Sohlenkamp, C., and Geiger, O. (2016). Bacterial membrane lipids: diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 133–159. doi: 10.1093/femsre/fuv008
- Studier, F. W. (1991). Use of bacteriophage-T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *J. Mol. Biol.* 219, 37–44. doi: 10.1016/0022-2836(91)90855-Z
- Suzuki, T., Yoro, E., and Kawaguchi, M. (2015). "Chapter three - leguminous plants: inventors of root nodules to accommodate symbiotic bacteria," in *International Review of Cell and Molecular Biology*, ed K. W. Jeon (Okazaki: Academic Press), 111–158.
- Tarazona, S., Furio-Tari, P., Turra, D., Di Pietro, A., Nueda, M. J., Ferrer, A., et al. (2015). Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res.* 43:e140. doi: 10.1093/nar/gkv711
- Tarazona, S., Garcia-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A., and Conesa, A. (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* 21, 2213–2223. doi: 10.1101/gr.124321.111
- Tatusov, R. L., Galperin, M. Y., Natale, D. A., and Koonin, E. V. (2000). The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution. *Nucleic Acids Res.* 28, 33–36. doi: 10.1093/nar/28.1.33
- Teixeira-Gomes, A. P., Cloeckaert, A., and Zygmunt, M. S. (2000). Characterization of heat, oxidative, and acid stress responses in *Brucella melitensis*. *Infect. Immun.* 68, 2954–2961. doi: 10.1128/IAI.68.5.2954-2961.2000
- Udvardi, M. K., and Day, D. A. (1997). Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 493–523. doi: 10.1146/annurev.arplant.48.1.493
- Vences-Guzmán, M. A., Guan, Z., Ormeno-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I. M., Martínez-Romero, E., et al. (2011). Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol. Microbiol.* 79, 1496–1514. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x
- Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H. P., Martínez-Romero, E., and Werner, D. (2003). Genetic analysis of a pH-regulated operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 involved in acid tolerance and nodulation competitiveness. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16, 159–168. doi: 10.1094/MPMI.2003.16.2.159
- Wei, J., Liang, J. C., Shi, Q. Y., Yuan, P., Meng, R. Z., Tang, X. D., et al. (2014). Genome-wide transcription analyses in *Mycobacterium tuberculosis* treated with lupulone. *Braz. J. Microbiol.* 45, 333–341. doi: 10.1590/S1517-83822014005000032
- Wen, Y., Marcus, E. A., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., Scott, D. R., and Sachs, G. (2003). Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infect. Immun.* 71, 5921–5939. doi: 10.1128/IAI.71.10.5921-5939.2003
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains - nucleotide-sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103–119. doi: 10.1016/0378-1119(85)90120-9
- Yuan, Z. C., Liu, P., Saenkham, P., Kerr, K., and Nester, E. W. (2008). Transcriptome profiling and functional analysis of *Agrobacterium tumefaciens* reveals a general conserved response to acidic conditions (pH 5.5) and a complex acid-mediated signaling involved in *Agrobacterium*-plant interactions. *J. Bacteriol.* 190, 494–507. doi: 10.1128/JB.01387-07
- Zanotti, G., and Cendron, L. (2010). Functional and structural aspects of *Helicobacter pylori* acidic stress response factors. *IUBMB Life* 62, 715–723. doi: 10.1002/iub.382
- Zbell, A. L., and Maier, R. J. (2009). Role of the hya hydrogenase in recycling of anaerobically produced H<sub>2</sub> in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1456–1459. doi: 10.1128/AEM.02064-08
- Zipsper, D. (1969). Polar mutations and operon function. *Nature* 221, 21–25.

**Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Guerrero-Castro, Lozano and Sohlenkamp. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Genomic context of Tn5 mutants from *R. tropici* CIAT 899



Supplementary Table S1

## AR\_vs\_BR\_UP

Locus tag	Location	Log2FC	COG	Function
RTCIAT899_RS13535	chromosome	6.1396304		hypothetical protein
RTCIAT899_RS13545	chromosome	5.803119		hypothetical protein
RTCIAT899_RS04615	chromosome	5.7363999	P	Mn/Zn ABC transporter permease
RTCIAT899_RS13530	chromosome	5.7172931		hypothetical protein
RTCIAT899_RS04620	chromosome	5.5273566	P	Mn/Zn ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS26115	pRtrCIAT899c	5.2777315	P	potassium-transporting ATPase subunit A
RTCIAT899_RS27660	pRtrCIAT899c	5.1789806	Q	L-lysine 6-monooxygenase (Lysine 6-N-hydroxylase) (Lysine N(6)-hydroxylase) (Lysine-N-oxygenase)
<b>RTCIAT899_RS10390</b>	<b>chromosome</b>	<b>5.130862</b>	<b>P</b>	<b>zinc ABC transporter substrate-binding protein</b>
RTCIAT899_RS07330	chromosome	5.1206373	J	30S ribosomal protein S7
RTCIAT899_RS07325	chromosome	5.0474634	J	30S ribosomal protein S12
<b>RTCIAT899_RS28825</b>	<b>pRtrCIAT899c</b>	<b>4.871735</b>	<b>KT</b>	<b>phage shock protein A, PspA</b>
RTCIAT899_RS13555	chromosome	4.7818776	P	HmuS-like siderophore transporter
RTCIAT899_RS01890	chromosome	4.7545879	S	metallopeptidase
RTCIAT899_RS13560	chromosome	4.7083112	P	hemin ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS13540	chromosome	4.6320761		membrane protein
RTCIAT899_RS07335	chromosome	4.6010438	J	elongation factor G
<b>RTCIAT899_RS28820</b>	<b>pRtrCIAT899c</b>	<b>4.464704</b>	<b>S</b>	<b>hypothetical protein</b>
RTCIAT899_RS29995	pRtrCIAT899c	4.3322649	KG	DeoR family transcriptional regulator
RTCIAT899_RS12735	chromosome	4.3314229	E	2-isopropylmalate synthase
<b>RTCIAT899_RS10890</b>	<b>chromosome</b>	<b>4.252498</b>	<b>EH</b>	<b>acetolactate synthase 3 large subunit</b>
RTCIAT899_RS04610	chromosome	4.1803897	P	Mn/Zn ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS23310	chromosome	4.173639		hypothetical protein
RTCIAT899_RS11275	chromosome	4.051318	M	transglycosylase
RTCIAT899_RS00960	chromosome	4.0405941	P	Fe(3+) ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS06050	chromosome	3.9495412	J	30S ribosomal protein S6
RTCIAT899_RS27650	pRtrCIAT899c	3.9379825	JO	N(6)-hydroxylysine O-acetyltransferase
RTCIAT899_RS13565	chromosome	3.9355753	P	iron ABC transporter
RTCIAT899_RS00345	chromosome	3.9293207		hypothetical protein
RTCIAT899_RS10885	chromosome	3.9041867	E	acetolactate synthase small subunit
RTCIAT899_RS27640	pRtrCIAT899c	3.8937675	E	methionine gamma-lyase
RTCIAT899_RS06045	chromosome	3.885223	J	30S ribosomal protein S18
RTCIAT899_RS13550	chromosome	3.8739124	H	HmuP/HemP-like siderophore transporter
RTCIAT899_RS31785	chromosome	3.836212		4'-phosphopantetheinyl transferase
RTCIAT899_RS09765	chromosome	3.8284468	J	30S ribosomal protein S4
RTCIAT899_RS11795	chromosome	3.7619522		hypothetical protein
RTCIAT899_RS23320	pRtrCIAT899c	3.7495716	E	cysteine synthase
RTCIAT899_RS23315	chromosome	3.7472668		lysine/ornithine decarboxylase
RTCIAT899_RS27645	chromosome	3.7336881		MATE family efflux transporter
RTCIAT899_RS24410	pRtrCIAT899c	3.7124368	S	hypothetical protein

RTCIAT899_RS30000	pRtrCIAT899c	3.6507004	S	hypothetical protein
RTCIAT899_RS26110	chromosome	3.6461274		ATPase
RTCIAT899_RS01655	chromosome	3.5480082	J	50S ribosomal protein L35
RTCIAT899_RS15825	chromosome	3.5448501	R	integral membrane protein
RTCIAT899_RS17535	chromosome	3.5315207	P	divalent metal cation transporter
RTCIAT899_RS01660	chromosome	3.5085462	J	50S ribosomal protein L20
RTCIAT899_RS02195	chromosome	3.4907971	J	30S ribosomal protein S20
RTCIAT899_RS00350	chromosome	3.4835991		hypothetical protein
RTCIAT899_RS18300	chromosome	3.4499746	JO	acetyltransferase
RTCIAT899_RS13180	chromosome	3.4401751	L	ATP-dependent RNA helicase
RTCIAT899_RS15830	chromosome	3.4372878	K	hypothetical protein
RTCIAT899_RS26120	pRtrCIAT899c	3.4295027	P	K <sup>+</sup> -transporting ATPase B subunit
RTCIAT899_RS07950	chromosome	3.4166984	O	trigger factor
RTCIAT899_RS07545	pRtrCIAT899c	3.4166956		hypothetical protein
RTCIAT899_RS15835	chromosome	3.3848553	K	RNA polymerase sigma factor
RTCIAT899_RS16845	chromosome	3.3752296	T	GTP-binding protein
RTCIAT899_RS02035	chromosome	3.3388315	J	peptide chain release factor 3
RTCIAT899_RS00565	chromosome	3.3176461	J	polyribonucleotide nucleotidyltransferase
RTCIAT899_RS01235	chromosome	3.2954781	HC	FAD-dependent oxidoreductase
RTCIAT899_RS29985	pRtrCIAT899c	3.2908508	E	sugar ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS27655	chromosome	3.2653622		vicibactin biosynthesis non-ribosomal peptide synthase
RTCIAT899_RS18295	chromosome	3.2555299	JO	acetyltransferase
RTCIAT899_RS25550	pRtrCIAT899c	3.2471269	E	glycine oxidase ThiO
RTCIAT899_RS25260	pRtrCIAT899c	3.2373301	P	NADPH-dependent ferric siderophore reductase
RTCIAT899_RS17735	chromosome	3.233225	J	elongation factor P
RTCIAT899_RS06040	chromosome	3.2177536		membrane protein
RTCIAT899_RS25555	pRtrCIAT899c	3.2123405	H	phosphomethylpyrimidine synthase ThiC
RTCIAT899_RS00500	chromosome	3.1968575		tRNA-Ala resistance nodulation cell division (RND)
RTCIAT899_RS24100	pRtrCIAT899c	3.1669121	MV	drug efflux pump, MFP component
RTCIAT899_RS07555	pRtrCIAT899c	3.1581008		hypothetical protein
RTCIAT899_RS00340	chromosome	3.1500827		hypothetical protein
RTCIAT899_RS27585	pRtrCIAT899c	3.1248803	S	hypothetical protein 50S ribosomal protein L25/general stress protein Ctc
RTCIAT899_RS12545	chromosome	3.1038168	J	
RTCIAT899_RS27470	pRtrCIAT899c	3.0900349	H	6-pyruvoyl tetrahydrobiopterin synthase
RTCIAT899_RS11790	chromosome	3.0900293	P	nitrate/nitrite/cyanate ABC transporter permease
RTCIAT899_RS29990	pRtrCIAT899c	3.0623432	IQR	estradiol 17-beta-dehydrogenase 8 polar amino acid ABC transporter substrate- binding protein
RTCIAT899_RS23115	pRtrCIAT899c	3.0500597	ET	
RTCIAT899_RS23355	pRtrCIAT899c	3.0446525	P	energy transducer TonB
RTCIAT899_RS16595	chromosome	3.0391451	C	ATP synthase subunit alpha
RTCIAT899_RS06335	chromosome	3.0262957	J	aspartate--tRNA ligase
RTCIAT899_RS16335	chromosome	3.0122672	S	hypothetical protein

RTCIAT899_RS14715	chromosome	2.9917877	J	50S ribosomal protein L31
RTCIAT899_RS00605	chromosome	2.9846135	K	transcription termination protein NusA
RTCIAT899_RS07410	chromosome	2.9839571	J	50S ribosomal protein L5
RTCIAT899_RS17825	chromosome	2.982798	H	thiamine transporter substrate binding subunit resistance nodulation cell division (RND) drug efflux pump, MFP component
RTCIAT899_RS24105	pRtrCIAT899c	2.9809653	MV	hemolysin D
RTCIAT899_RS15450	chromosome	2.9716359	V	50S ribosomal protein L24
RTCIAT899_RS07405	chromosome	2.9614218	J	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase erythritol ABC transporter ATP-binding protein EryE
RTCIAT899_RS04850	chromosome	2.9361822	E	nucleoside-diphosphate kinase
RTCIAT899_RS27590	pRtrCIAT899c	2.9323864	G	hypothetical protein
RTCIAT899_RS06205	chromosome	2.9275208	F	50S ribosomal protein L28
RTCIAT899_RS01900	chromosome	2.9268377	M	carbohydrate kinase
RTCIAT899_RS16330	chromosome	2.9063116	J	tRNA-Pro
RTCIAT899_RS27580	pRtrCIAT899c	2.9057882	G	F0F1 ATP synthase subunit A
RTCIAT899_RS04820	pRtrCIAT899c	2.8956169		tRNA-Gly
RTCIAT899_RS04125	chromosome	2.8735192	C	3-isopropylmalate dehydrogenase
RTCIAT899_RS17215	chromosome	2.8627056		carbohydrate kinase
RTCIAT899_RS18455	chromosome	2.8596479	CE	hypothetical protein
RTCIAT899_RS29980	pRtrCIAT899c	2.8584971	G	50S ribosomal protein L34
RTCIAT899_RS01885	chromosome	2.8426042	R	30S ribosomal protein S14
RTCIAT899_RS02590	chromosome	2.8420867	J	F0F1 ATP synthase subunit gamma
RTCIAT899_RS07415	chromosome	2.8394343	J	elongation factor Tu
RTCIAT899_RS16590	chromosome	2.8393532	C	30S ribosomal protein S2
RTCIAT899_RS07340	chromosome	2.8380096	J	acetyltransferase
RTCIAT899_RS08405	chromosome	2.8300603	J	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
RTCIAT899_RS15310	chromosome	2.820207	R	50S ribosomal protein L14
RTCIAT899_RS07470	chromosome	2.820189	K	ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS07400	chromosome	2.8174668	J	AMP-dependent ligase
RTCIAT899_RS17380	chromosome	2.8135422	P	50S ribosomal protein L19
RTCIAT899_RS28815	pRtrCIAT899c	2.8053947	G	tRNA-Met
RTCIAT899_RS17070	chromosome	2.7998971	J	isoleucine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS00335	pRtrCIAT899c	2.7910115		sulfite reductase
RTCIAT899_RS03975	chromosome	2.7822129	J	50S ribosomal protein L6
RTCIAT899_RS24415	pRtrCIAT899c	2.7791936	S	anthranilate synthase
RTCIAT899_RS07425	chromosome	2.7787169	J	ATP synthase F1, delta subunit
RTCIAT899_RS12800	chromosome	2.7686426	EH	ribonuclease P protein component
RTCIAT899_RS16600	chromosome	2.759064	C	hypothetical protein
RTCIAT899_RS02585	chromosome	2.7579549	J	hypothetical protein
RTCIAT899_RS23175	pRtrCIAT899c	2.7537559		MFS transporter
RTCIAT899_RS15445	chromosome	2.7407877	GEPR	50S ribosomal protein L32
RTCIAT899_RS17890	chromosome	2.7299959	J	30S ribosomal protein S8
RTCIAT899_RS07420	chromosome	2.7257638	J	



RTCIAT899_RS07465	chromosome	2.7157447	J	30S ribosomal protein S11
RTCIAT899_RS07345	chromosome	2.7155621	J	30S ribosomal protein S10
RTCIAT899_RS25540	pRtrCIAT899c	2.7059576	H	thiazole synthase
RTCIAT899_RS05945	chromosome	2.6956239	J	cysteine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS10220	chromosome	2.6955639	P	aliphatic sulfonate ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS11785	chromosome	2.6917233	S	nitrate/nitrite/cyanate ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS29960	chromosome	2.6899523		putative sugar ABC transporter, substrate-binding protein
RTCIAT899_RS12575	chromosome	2.6892664	J	GTP-binding protein YchF
RTCIAT899_RS11080	chromosome	2.6815212	H	pantoate--beta-alanine ligase
RTCIAT899_RS12620	chromosome	2.6793921	V	drug efflux ABC transporter ATP-binding/permease
RTCIAT899_RS10385	chromosome	2.6784633	P	zinc ABC uptake transporter ZnuC-like ATP-binding protein
RTCIAT899_RS00600	chromosome	2.6665177	R	hypothetical protein
RTCIAT899_RS06035	chromosome	2.6588151	J	50S ribosomal protein L9
RTCIAT899_RS09555	chromosome	2.6514898	J	tyrosine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS16015	chromosome	2.6411167	E	aspartate kinase
RTCIAT899_RS00355	chromosome	2.6295776	M	hypothetical protein
RTCIAT899_RS01880	chromosome	2.6252867	S	hypothetical protein
RTCIAT899_RS00585	chromosome	2.6147447	J	ribosome-binding factor A glyoxalase/bleomycin resistance protein/dioxygenase
RTCIAT899_RS25705	pRtrCIAT899c	2.6115128	Q	hypothetical protein
RTCIAT899_RS02980	pRtrCIAT899b	2.6053018		hypothetical protein
RTCIAT899_RS07475	chromosome	2.6048363	J	50S ribosomal protein L17
RTCIAT899_RS07290	chromosome	2.5975089	J	50S ribosomal protein L11
RTCIAT899_RS16585	chromosome	2.58524	C	ATP synthase subunit beta
RTCIAT899_RS08410	chromosome	2.5820532	J	elongation factor Ts
RTCIAT899_RS00595	chromosome	2.5705881	J	translation initiation factor IF-2 polar amino acid ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS23235	pRtrCIAT899c	2.555114	ET	inositol monophosphatase
RTCIAT899_RS14750	chromosome	2.5535273	G	GNAT family acetyltransferase
RTCIAT899_RS11145	chromosome	2.5445927	JO	TetR family transcriptional regulator
RTCIAT899_RS10760	chromosome	2.5406095	K	hypothetical protein
RTCIAT899_RS26415	chromosome	2.5345836		hypothetical protein
RTCIAT899_RS29955	chromosome	2.5329445		oxidoreductase
RTCIAT899_RS18495	chromosome	2.5270165	S	hypothetical protein
RTCIAT899_RS24110	pRtrCIAT899c	2.5262699	V	resistance nodulation cell division (RND) drug efflux pump, inner membrane component
RTCIAT899_RS01665	chromosome	2.5251188	J	phenylalanine--tRNA ligase subunit alpha
RTCIAT899_RS02580	chromosome	2.5205125	M	membrane protein insertase YidC
RTCIAT899_RS09255	chromosome	2.5140914	J	threonine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS07350	chromosome	2.502067	J	50S ribosomal protein L3
RTCIAT899_RS04135	chromosome	2.4993657	C	ATP synthase B' chain (Subunit II)
RTCIAT899_RS25665	pRtrCIAT899c	2.498855	EM	dihydrodipicolinate synthase family protein

RTCIAT899_RS27575	pRtrCIAT899c	2.4971688	C	aerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase
RTCIAT899_RS19165	pRtrCIAT899a	2.4752858	T	S15 family serine protease
RTCIAT899_RS12305	chromosome	2.4678213	V	MATE family efflux transporter
RTCIAT899_RS06820	chromosome	2.4576344		tRNA-Asp
RTCIAT899_RS04140	chromosome	2.4476924	C	ATP synthase B chain (Subunit I)
RTCIAT899_RS07945	pRtrCIAT899c	2.4334432		tRNA-Leu
RTCIAT899_RS05570	chromosome	2.420291	M	family 2 glycosyl transferase bifunctional phosphoribosylamino- imidazolecarboxamide formyltransferase/inosine monophosphate cyclohydrolase
RTCIAT899_RS18525	chromosome	2.4008067	F	monophosphate cyclohydrolase
RTCIAT899_RS00850	chromosome	2.3972588	E	ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS07230	pRtrCIAT899c	2.3966959		tRNA-Tyr
RTCIAT899_RS30805	chromosome	2.3909053		hypothetical protein
RTCIAT899_RS07295	chromosome	2.3907757	J	50S ribosomal protein L1
RTCIAT899_RS03580	chromosome	2.3894775	L	DEAD/DEAH box helicase
RTCIAT899_RS10395	chromosome	2.385805	R	cobalamin synthesis protein
RTCIAT899_RS05720	chromosome	2.3801006		porin
RTCIAT899_RS00485	chromosome	2.374026	F	cytidylate kinase phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS
RTCIAT899_RS06655	chromosome	2.366963	P	phosphate ABC transporter substrate-binding protein PstS
RTCIAT899_RS31480	chromosome	2.3631445	PH	siderophore ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS23110	pRtrCIAT899c	2.3586021	E	polar amino acid ABC transporter permease alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)- dependent
RTCIAT899_RS10215	chromosome	2.3572429	HR	alkanesulfonate monooxygenase, FMNH(2)- dependent
RTCIAT899_RS00495	chromosome	2.345278		TIGR02300 family protein
RTCIAT899_RS07020	chromosome	2.3392253	J	50S ribosomal protein L33
RTCIAT899_RS00610	chromosome	2.3221478	J	ribosome maturation factor 23S rRNA (adenine(2503)-C(2))- methyltransferase RlmN
RTCIAT899_RS16895	chromosome	2.3137725	J	ribosome maturation factor 23S rRNA (adenine(2503)-C(2))- methyltransferase RlmN
RTCIAT899_RS18305	pRtrCIAT899c	2.3119988		hypothetical protein
RTCIAT899_RS27595	pRtrCIAT899c	2.309919	G	sugar ABC transporter permease
RTCIAT899_RS03720	chromosome	2.3092024	R	IMP dehydrogenase
RTCIAT899_RS18285	chromosome	2.3034831	J	50S ribosomal protein L21
RTCIAT899_RS01240	chromosome	2.3001865	H	riboflavin biosynthesis protein
RTCIAT899_RS28830	pRtrCIAT899c	2.3000473	K	transcriptional regulator
RTCIAT899_RS23105	pRtrCIAT899c	2.292089	E	polar amino acid ABC transporter permease
RTCIAT899_RS18290	chromosome	2.2901708	J	50S ribosomal protein L27
RTCIAT899_RS10210	chromosome	2.2871885	P	aliphatic sulfonate ABC transporter permease
RTCIAT899_RS00030	chromosome	2.2859812	U	protein-export chaperone SecB methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C (5))-methyltransferase (FADH(2)-oxidizing) TrmFO
RTCIAT899_RS07930	chromosome	2.275412	J	methylenetetrahydrofolate--tRNA-(uracil(54)-C (5))-methyltransferase (FADH(2)-oxidizing) TrmFO
RTCIAT899_RS15950	chromosome	2.2603703	H	methyltransferase type 11
RTCIAT899_RS09760	chromosome	2.2581156	E	glutaminase
RTCIAT899_RS07200	chromosome	2.2532198	J	peptide chain release factor 2 polar amino acid ABC transporter ATP- binding protein
RTCIAT899_RS23100	pRtrCIAT899c	2.2412226	E	polar amino acid ABC transporter ATP- binding protein

RTCIAT899_RS31470	pRtrCIAT899c	2.2397578	P	Siderophore ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS12340	chromosome	2.2379631	EF	carbamoyl phosphate synthase large subunit
RTCIAT899_RS17385	chromosome	2.2368484	P	NMT1/THI5-like protein
RTCIAT899_RS18590	chromosome	2.2138918	K	transcription termination factor Rho
RTCIAT899_RS16095	chromosome	2.2112028	U	preprotein translocase subunit SecA
RTCIAT899_RS16580	chromosome	2.2041402	C	F0F1 ATP synthase subunit epsilon
RTCIAT899_RS15285	chromosome	2.2039783	R	cobalamin synthesis protein
RTCIAT899_RS01670	chromosome	2.2030719	J	phenylalanine--tRNA ligase subunit beta
RTCIAT899_RS13850	chromosome	2.1862215	J	ribosomal large subunit pseudouridine synthase D
RTCIAT899_RS06825	pRtrCIAT899c	2.1773174		tRNA-Asp
RTCIAT899_RS03135	chromosome	2.1514765	U	protein translocase subunit SecDF
RTCIAT899_RS22015	pRtrCIAT899b	2.1460657	I	phosphatidylethanolamine N-methyltransferase
RTCIAT899_RS14585	chromosome	2.1416772	KJ	transcriptional regulator
RTCIAT899_RS14415	chromosome	2.1393568	HR	phosphoglycerate dehydrogenase
RTCIAT899_RS12415	chromosome	2.1390284	E	aspartate aminotransferase A
RTCIAT899_RS00175	chromosome	2.1373671	H	adenosylhomocysteinase
RTCIAT899_RS15945	chromosome	2.1344864	I	putative hydrolase
RTCIAT899_RS05530	chromosome	2.1339307	P	magnesium transporter
RTCIAT899_RS07430	chromosome	2.1074843	J	50S ribosomal protein L18
RTCIAT899_RS07355	chromosome	2.1004222	J	50S ribosomal protein L4
RTCIAT899_RS08415	chromosome	2.0946017	F	UMP kinase
RTCIAT899_RS00570	chromosome	2.0773355	J	30S ribosomal protein S15
RTCIAT899_RS09925	pRtrCIAT899c	2.0761729		hypothetical protein
RTCIAT899_RS15210	chromosome	2.0676742	J	30S ribosomal protein S21
RTCIAT899_RS26100	pRtrCIAT899c	2.0670169	I	import inner membrane translocase subunit Tim44
RTCIAT899_RS15315	chromosome	2.0655297	E	Orn/DAP/Arg decarboxylase
RTCIAT899_RS01445	chromosome	2.0429904		hypothetical protein
RTCIAT899_RS09200	chromosome	2.0384086	U	preprotein translocase subunit SecG
RTCIAT899_RS15475	chromosome	2.0324887	J	glutamate--tRNA ligase
RTCIAT899_RS00780	chromosome	1.9938638	S	SH3 type 3 domain-containing protein
RTCIAT899_RS18175	chromosome	1.9860007	M	dTDP-glucose 4,6-dehydratase
RTCIAT899_RS04130	chromosome	1.9715071	C	hypothetical protein
RTCIAT899_RS10055	chromosome	1.9714247	E	3-deoxy-7-phosphoheptulonate synthase
RTCIAT899_RS15035	chromosome	1.9663119	O	heat-shock protein Hsp20
RTCIAT899_RS01245	chromosome	1.9600102		hypothetical protein
RTCIAT899_RS07905	chromosome	1.9566153	U	preprotein translocase YajC subunit
RTCIAT899_RS12295	chromosome	1.9487373	EF	carbamoyl phosphate synthase small subunit
RTCIAT899_RS17040	chromosome	1.9403373	U	signal recognition particle protein
RTCIAT899_RS16215	chromosome	1.9317384	E	argininosuccinate lyase
RTCIAT899_RS07435	chromosome	1.9272511	J	30S ribosomal protein S5
RTCIAT899_RS12425	chromosome	1.9235761	GER	DMT family permease

RTCIAT899_RS23095	pRtrCIAT899c	1.9061607	G	hypothetical protein transcription termination/antitermination protein NusG
RTCIAT899_RS07285	chromosome	1.9051994	K	
RTCIAT899_RS02875	chromosome	1.9050531	O	Hsp33 family chaperone
<b>RTCIAT899_RS16685</b>	<b>chromosome</b>	<b>1.891165</b>	<b>C</b>	<b>dihydrolipoamide succinyltransferase</b>
RTCIAT899_RS03990	chromosome	1.8892408		pseudouridine synthase
RTCIAT899_RS06625	chromosome	1.8855444	J	50S ribosomal protein L13 alpha/beta hydrolase fold-1 catalytic domain- containing protein
RTCIAT899_RS19160	pRtrCIAT899a	1.8762773	T	
RTCIAT899_RS07460	chromosome	1.8578214	J	30S ribosomal protein S13
RTCIAT899_RS07370	pRtrCIAT899c	1.8533569	J	30S ribosomal protein S19
RTCIAT899_RS15480	chromosome	1.8506857	J	lysine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS00760	chromosome	1.8354437	O	molecular chaperone DnaK
RTCIAT899_RS00260	chromosome	1.8346325	O	ATP-dependent protease ATP-binding subunit HslU
RTCIAT899_RS04690	chromosome	1.8207507	GR	haloacid dehalogenase
RTCIAT899_RS00480	chromosome	1.8040457	J	30S ribosomal protein S1
RTCIAT899_RS02890	chromosome	1.8013729	E	O-succinylhomoserine sulfhydrylase
RTCIAT899_RS07360	chromosome	1.7744993	J	50S ribosomal protein L23
RTCIAT899_RS12525	chromosome	1.7689228	FE	ribose-phosphate pyrophosphokinase
RTCIAT899_RS07365	chromosome	1.7652485	J	50S ribosomal protein L2
RTCIAT899_RS19570	pRtrCIAT899c	1.7525828		transcriptional regulator
RTCIAT899_RS23615	chromosome	1.7521228		hypothetical protein
RTCIAT899_RS00255	chromosome	1.7521124	O	ATP-dependent protease subunit HslV
RTCIAT899_RS09825	chromosome	1.743863	J	alanine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS04235	chromosome	1.7348943	J	glycine--tRNA ligase subunit beta
RTCIAT899_RS11515	chromosome	1.7299769	E	methionine synthase
RTCIAT899_RS17755	chromosome	1.7255245	E	homoserine O-succinyltransferase 1-(5-phosphoribosyl)-5-[(5-phosphoribosylamino) methylideneamino]imidazole-4-carboxamide isomerase
RTCIAT899_RS00235	chromosome	1.7187011	E	
RTCIAT899_RS00265	chromosome	1.7125589	M	hypothetical protein
RTCIAT899_RS18480	chromosome	1.7021425	E	aspartate-semialdehyde dehydrogenase
RTCIAT899_RS08900	chromosome	1.6916607	O	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase tRNA preQ1(34) S-adenosylmethionine ribosyltransferase-isomerase QueA
RTCIAT899_RS08910	chromosome	1.6860422	J	
RTCIAT899_RS17980	chromosome	1.680831	V	cyclic beta-1,2-glucan ABC transporter
RTCIAT899_RS13855	chromosome	1.6689601	K	RNA polymerase factor sigma-32
RTCIAT899_RS12770	chromosome	1.665341	S	hypothetical protein
RTCIAT899_RS08790	chromosome	1.662609	LK	transcription-repair coupling factor
RTCIAT899_RS14255	chromosome	1.6583014	P	metal ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS16695	chromosome	1.6578132	C	2-oxoglutarate dehydrogenase subunit E1
RTCIAT899_RS07245	chromosome	1.6474119	J	elongation factor Tu
RTCIAT899_RS18310	chromosome	1.6402905	DL	GTPase ObgE
RTCIAT899_RS08820	chromosome	1.6396707	R	invasion protein B
RTCIAT899_RS06620	chromosome	1.6381767	J	30S ribosomal protein S9

RTCIAT899_RS05750	chromosome	1.6330972	K	DNA-directed RNA polymerase subunit omega
RTCIAT899_RS17050	chromosome	1.6238693	J	30S ribosomal protein S16
RTCIAT899_RS29165	pRtrCIAT899c	1.5932925	G	beta-galactosidase
RTCIAT899_RS14420	chromosome	1.5921519	HE	phosphoserine aminotransferase
RTCIAT899_RS11375	chromosome	1.580308	V	hypothetical protein
RTCIAT899_RS18315	chromosome	1.5779204	E	glutamate 5-kinase
RTCIAT899_RS10160	chromosome	1.5773849	M	OmpA family protein
RTCIAT899_RS16715	chromosome	1.5747886	C	malate dehydrogenase
RTCIAT899_RS07445	pRtrCIAT899c	1.5532238	J	50S ribosomal protein L15
RTCIAT899_RS00200	chromosome	1.5512415	TK	DNA-binding response regulator
RTCIAT899_RS17090	chromosome	1.539201	E	3-isopropylmalate dehydratase large subunit
RTCIAT899_RS07810	chromosome	1.5328627	J	valine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS06115	chromosome	1.5295954		SurA domain-containing protein
RTCIAT899_RS07280	chromosome	1.5285213	U	preprotein translocase subunit SecE
RTCIAT899_RS01595	chromosome	1.5183785		elongation factor 4 energy-dependent translational throttle protein EttA
RTCIAT899_RS11345	chromosome	1.5125043	R	
RTCIAT899_RS02870	chromosome	1.5121819	E	ornithine carbamoyltransferase sulfate adenylyltransferase subunit 2 (ATP-sulfurylase small subunit)
RTCIAT899_RS04885	chromosome	1.499386	EH	
RTCIAT899_RS13865	chromosome	1.4976329	F	adenylosuccinate synthase
RTCIAT899_RS12190	pRtrCIAT899c	1.4806844		hypothetical protein
RTCIAT899_RS00755	chromosome	1.4602812	O	molecular chaperone DnaJ
RTCIAT899_RS20145	pRtrCIAT899b	1.4589526	R	N-acyltransferase NodA3
RTCIAT899_RS15995	chromosome	1.4521667	S	hypothetical protein
RTCIAT899_RS12345	chromosome	1.4457362	K	transcription elongation factor GreA
RTCIAT899_RS02245	chromosome	1.4395639	O	nucleotide exchange factor GrpE
RTCIAT899_RS03905	chromosome	1.4344544	J	histidine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS25255	pRtrCIAT899c	1.425482	O	molecular chaperone HtpG
RTCIAT899_RS16710	chromosome	1.4224726	C	succinate--CoA ligase subunit beta
RTCIAT899_RS04890	chromosome	1.4097	EH	phosphoadenosine phosphosulfate reductase
RTCIAT899_RS07310	chromosome	1.4076188	K	DNA-directed RNA polymerase subunit beta
RTCIAT899_RS10755	chromosome	1.3988689	EH	ketol-acid reductoisomerase
RTCIAT899_RS08905	chromosome	1.3848191	O	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
RTCIAT899_RS16835	chromosome	1.3802106	CP	inorganic diphosphatase
RTCIAT899_RS15990	chromosome	1.376469	O	ATP-dependent chaperone ClpB
RTCIAT899_RS05445	chromosome	1.3454585	O	protease HtrA
RTCIAT899_RS09585	chromosome	1.3394801	L	ATP-dependent RNA helicase RhlE
RTCIAT899_RS17950	chromosome	1.3320774	ET	amino acid ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS04880	chromosome	1.3250741	P	sulfate adenylyltransferase
RTCIAT899_RS08420	chromosome	1.3156274	J	ribosome recycling factor
RTCIAT899_RS31520	pRtrCIAT899c	1.3064717		porin
RTCIAT899_RS08645	chromosome	1.3054804	C	ferredoxin--NADP(+) reductase
RTCIAT899_RS00285	chromosome	1.2713175	M	transpeptidase

RTCIAT899_RS07880	chromosome	1.2705752	J	serine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS11325	chromosome	1.2496317	M	murein transglycosylase
RTCIAT899_RS02430	chromosome	1.1429739	H	methionine adenosyltransferase
RTCIAT899_RS07450	chromosome	1.1412065	U	preprotein translocase subunit SecY
RTCIAT899_RS18550	chromosome	1.1059518	J	leucine--tRNA ligase
RTCIAT899_RS10425	chromosome	1.1054326	IQ	beta-ketoacyl-ACP synthase II
RTCIAT899_RS08635	chromosome	1.101628	P	nitrate/sulfite reductase
RTCIAT899_RS00135	chromosome	1.074592	I	acetyl-CoA carboxylase subunit beta
RTCIAT899_RS06090	chromosome	1.062988	D	aminodeoxychorismate lyase
RTCIAT899_RS16090	chromosome	1.0082332	O	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase
RTCIAT899_RS10420	chromosome	0.9936351	IQ	beta-ketoacyl-ACP synthase II
RTCIAT899_RS00540	chromosome	0.9618755	IQ	beta-ketoacyl-[acyl-carrier-protein] synthase I
RTCIAT899_RS07265	chromosome	0.9605725	M	hypothetical protein
RTCIAT899_RS16195	chromosome	0.9591696	C	electron transfer flavoprotein subunit beta
RTCIAT899_RS15215	chromosome	0.9582447	R	O-linked GlcNAc transferase
RTCIAT899_RS11170	chromosome	0.907082	M	lipoprotein
RTCIAT899_RS03510	chromosome	0.9044884	G	glucose-6-phosphate dehydrogenase
RTCIAT899_RS10065	chromosome	0.9000613	S	hypothetical protein
RTCIAT899_RS24955	pRtrCIAT899c	0.8600686	E	branched chain amino acid ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS15015	chromosome	0.806278	E	glutamate synthase
RTCIAT899_RS06940	chromosome	0.8008991	J	proline--tRNA ligase
RTCIAT899_RS10925	chromosome	0.7970002	O	protease modulator HflK
RTCIAT899_RS17995	chromosome	0.7568095	G	cyclic beta 1-2 glucan synthetase
RTCIAT899_RS06405	chromosome	0.7042681	M	peptidoglycan-binding protein
RTCIAT899_RS03505	chromosome	0.6783565	G	6-phosphogluconolactonase
RTCIAT899_RS14670	chromosome	0.6716755	G	type I glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
RTCIAT899_RS14665	chromosome	0.6214242	G	transketolase
RTCIAT899_RS17865	chromosome	0.5873438	L	helicase
RTCIAT899_RS12250	chromosome	0.5396963	K	RNA polymerase sigma factor RpoD

## AR\_vs\_BR\_DOWN

Locus tag	Location	Log2FC	COG	Function
RTCIAT899_RS11180	chromosome	-0.7724538	D	cell division protein FtsZ
RTCIAT899_RS01260	chromosome	-0.7738898		BMP family ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS10165	chromosome	-0.9167252		polar amino acid ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS25455	pRtrCIAT899c	-1.0066353	C	oxidoreductase alpha (molybdopterin) subunit
RTCIAT899_RS15135	chromosome	-1.0153571	G	maltodextrin phosphorylase
RTCIAT899_RS02985	chromosome	-1.2719958	E	glutamine synthetase 2
RTCIAT899_RS29070	pRtrCIAT899c	-1.3011521		UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase
RTCIAT899_RS12875	chromosome	-1.5802271		choline ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS13750	chromosome	-1.5807939		amino acid ABC transporter permease
RTCIAT899_RS15110	chromosome	-1.7130873	S	transglutaminase

RTCIAT899_RS13205	chromosome	-1.7243063		transglutaminase
RTCIAT899_RS13620	chromosome	-2.014387	E	Zn-dependent hydrolase
RTCIAT899_RS27150	pRtrCIAT899c	-2.3576979		polyamine ABC transporter permease
RTCIAT899_RS01510	chromosome	-2.4492838	G	sugar ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS28315	pRtrCIAT899c	-2.5649069	T	hybrid sensor histidine kinase/response regulator
RTCIAT899_RS29770	pRtrCIAT899c	-2.571346		polar amino acid ABC transporter permease
RTCIAT899_RS28150	pRtrCIAT899c	-2.594403	G	amino acid ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS25690	pRtrCIAT899c	-2.6742957	J	amidase
RTCIAT899_RS13610	chromosome	-2.6847381	F	dihydropyrimidine dehydrogenase subunit B
RTCIAT899_RS13635	chromosome	-2.6901182		ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS25695	pRtrCIAT899c	-2.6937079	M	periplasmic protein
RTCIAT899_RS07785	chromosome	-2.7340872		porin
RTCIAT899_RS13650	chromosome	-2.7651647		nitrate ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS27145	pRtrCIAT899c	-3.1437658	E	polyamine ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS09180	chromosome	-3.3417997	P	nickel transporter
RTCIAT899_RS11410	chromosome	-3.3978936	E	amino acid permease-associated region
RTCIAT899_RS25855	pRtrCIAT899c	-3.5190013	E	peptide ABC transporter substrate-binding protein
RTCIAT899_RS28290	pRtrCIAT899c	-4.7578545		ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS28295	pRtrCIAT899c	-5.2639561		ABC transporter ATP-binding protein
RTCIAT899_RS28300	pRtrCIAT899c	-5.876051	E	urea ABC transporter permease subunit UrtC
RTCIAT899_RS28305	pRtrCIAT899c	-6.5800354	E	urea ABC transporter permease subunit UrtB
RTCIAT899_RS28310	pRtrCIAT899c	-7.5459789	E	urea ABC transporter substrate-binding protein

## AR\_vs\_CR\_UP

Locus tag	Location	Log2FC	COG	Function
RTCIAT899_RS24705	pRtrCIAT899c	5.280397	P	nitrate ABC transporter, permease protein
<b>RTCIAT899_RS10390</b>	<b>chromosome</b>	<b>5.225411</b>	<b>P</b>	<b>zinc ABC transporter substrate-binding protein</b>
RTCIAT899_RS24685	pRtrCIAT899c	4.829516	C	nitrate reductase
<b>RTCIAT899_RS28820</b>	<b>pRtrCIAT899c</b>	<b>4.718863</b>		<b>hypothetical protein</b>
RTCIAT899_RS07785	chromosome	4.604866		porin
<b>RTCIAT899_RS28825</b>	<b>pRtrCIAT899c</b>	<b>4.419892</b>	<b>T</b>	<b>phage shock protein A, PspA</b>
RTCIAT899_RS02060	chromosome	3.059133	P	choline-sulfatase
RTCIAT899_RS10685	chromosome	2.925881		hypothetical protein
RTCIAT899_RS20590	pRtrCIAT899b	2.542096		coproporphyrinogen III oxidase
<b>RTCIAT899_RS10890</b>	<b>chromosome</b>	<b>2.250506</b>	<b>H</b>	<b>acetolactate synthase 3 large subunit</b>
<b>RTCIAT899_RS16685</b>	<b>chromosome</b>	<b>1.982522</b>	<b>C</b>	<b>dihydrolipoamide succinyltransferase</b>

## 5.1 RESULTADOS ADICIONALES

### 5.1.1 Mutagénesis por transposón

Como se menciona en la sección de resultados, se aislaron 26 mutantes sensibles a acidez de las cuales se logró identificar el sitio de inserción de 17. De las 9 restantes que se incluyen en la tabla 6 en la sección de materiales y métodos, aún no se conoce el sitio de inserción.

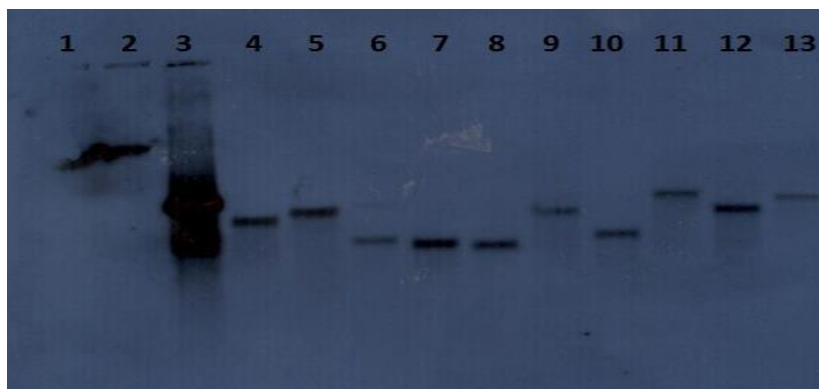
**Tabla 6. Mutantes por transposón no descritas en el artículo y mutantes JG2646 y JG9587 complementadas.** De estas mutantes no se conoce aún el sitio de inserciones del Tn5 y las mutantes complementadas aún no están caracterizadas.

Cepa	Particularidades	Referencias
<b>Mutante Tn5</b>		
JG462	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG712	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG1025	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG4874	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG6834	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG8947	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG9477	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG9809	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG10062	Mutante Tn5 derivada de <i>R. tropici</i> CIAT 899, Nal-Spec <sup>R</sup> , medianamente sensible a acidez.	Este trabajo
JG2646-RR	Cepa mutante en un regulador de respuesta complementada en trans con el mismo gen clonado en pET17b.	Este trabajo
JG2646-TCS	Cepa mutante en un regulador de respuesta complementada en trans con el operon que incluye además del RR la cinasa histidinica clonado en pET17b.	Este trabajo
JG2646-17b	Cepa mutante en un regulador de respuesta complementada en trans con el vector vacío pET17b.	Este trabajo
JG9587-Ant	Cepa mutante en un antiporter complementada en trans con el mismo gen clonado en pET17b.	Este trabajo
JG9587-17b	Cepa mutante en un antiporter complementada en trans con el vector vacío pET17b.	Este trabajo

Estas mutantes presentan el fenotipo de ser medianamente sensibles a acidez. Un análisis tipo Southern blot, nos permitió validar la transposición azarosa del Tn5, para esto se seleccionaron al azar 10 mutantes y se digirieron con *EcoRI*,



este gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa durante toda la noche para posteriormente hacer la hibridación, el revelado se muestra en la figura 9.

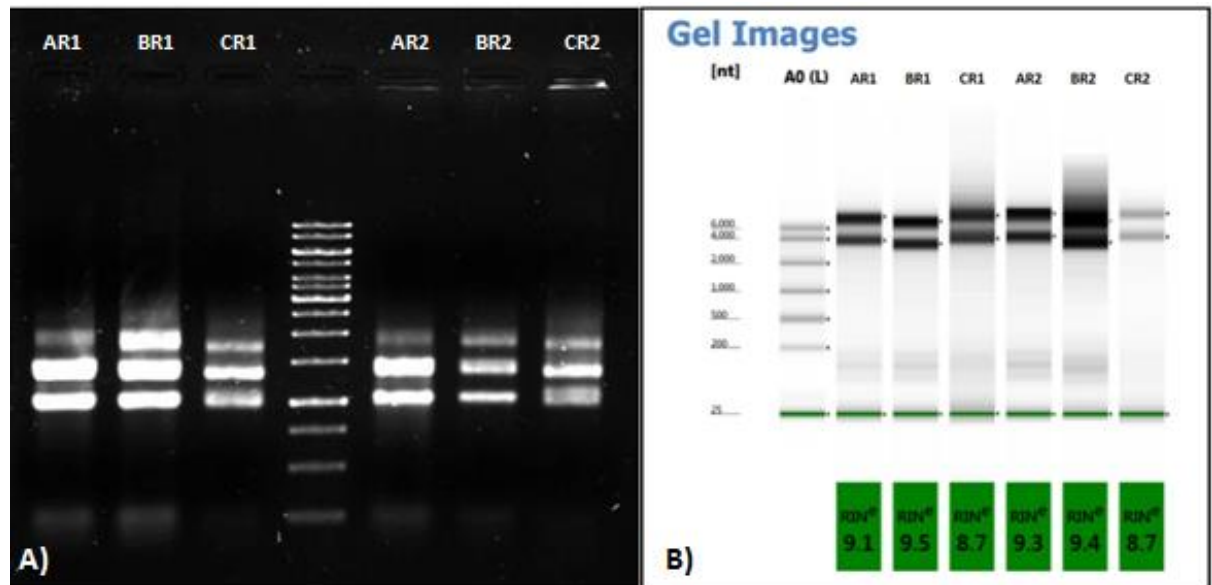


**Figura 9. Hibridación tipo Southern blot de 10 mutantes escogidas azarosamente.** Cada una fue digerida con *EcoRI* e hibridada con una sonda correspondiente al casete de Kanamicina. 1. Cepa silvestre, 2. Sonda, 3. pSUP2021, 4-13 Mutantes Tn5 seleccionadas 1-10.

Este análisis nos permitió conocer la diversidad de la transposición, ya que como se observa en la figura 10, en los carriles 4-13 el perfil es diferente en cada cepa seleccionada (Tn5).

### 5.1.2 Aislamiento, purificación e integridad de ARN

Debido a que el enfoque es aislar el repertorio completo de genes de resistencia a acidez, se utilizaron diferentes metodologías de extracción de RNA para optimizar la extracción y así obtener la mayor calidad posible para realizar un transcriptoma mediante RNA-seq. Se probaron extracción con trizol, el kit Fast RNA blue y el kit de RNase mini de QIAGEN (QIAGEN, Hildesheim, Germany); este último se logró estandarizar y es con el que se purificaron las muestras que se enviaron a secuenciación dado que con el mismo se obtuvieron tanto la concentración adecuada como la integridad requerida para la secuenciación. Además, para conocer la integridad de cada una de las muestras se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa y con el TapeStation 2,200 instrument (Agilent Technologies), los resultados se muestran en la figura 10. Se obtuvieron 3 condiciones y 3 réplicas de cada condición en experimentos separados. Las condiciones fueron una a pH 6.8 otra a pH 4.5 y la tercera fue un choque por acidez a pH 4.5, se hicieron 3 experimentos por separado para obtener las 3 replicas las cuales fueron analizadas por separado, en la figura 9 se muestran 2 de las replicas (replica 1 y replica 2).



**Figura 10. Integridad de las muestras de ARN que se secuenciaron.** A) Electroforesis en gel de agarosa al 1% y B) RNA Integrity Number (RIN) de las mismas muestras. AR1 (pH 6.8), BR1 (pH 4.5), CR1 (choque por acidez a pH 4.5). R1 indica que es la replica 1 y R2, replica 2.

### 5.1.3 Complementación de dos mutantes Tn5 sensibles a acidez.

Del análisis de las 18300 mutantes por transposón, aislamos 26 mutantes que presentaron el fenotipo que nos interesaba. De estas mutantes (tabla 4) logramos identificar el sitio de inserción de 17, lo cual nos permitió indagar sobre los genes posiblemente afectados. Dentro de este grupo de mutantes cuyo sitio de inserción había sido identificado, seleccionamos dos para realizar un análisis de complementación.

Éstas mutantes fueron seleccionadas, primero por el fenotipo que presentaban de crecimiento a pH 6.8 pero no a pH 4.5; y segundo por la probable función del gen identificado; es decir, dado que en CIAT 899 no se conoce por ejemplo como sensa los cambios en la concentración de protones (JG2646) o en el caso del antiporter de cationes y protones. Se piensa que ambos genes afectados pudieran estar participando en el sensado de un aumento de protones o contribuyendo a la homeostasis de protones, respectivamente y por lo tanto mantener un equilibrio en la concentración de los mismos. Se realizó un ensayo en el cual se amplificaron el regulador de respuesta y el operon que incluye a la

cinasa histidinica (JG2646), usando los iniciadores RR-F y RR-R (tabla 4) para amplificar el regulador de respuesta y los iniciadores RR-F Y CS-R para amplificar el operón completo. Para el antiporter se usaron los iniciadores Ant-F y Ant-R. Posteriormente se subclonaron en un vector de amplio rango de hospedero (pRK404) y estas construcciones se conjugaron a la cepa mutante JG2646 y JG9587, respectivamente. Se hicieron ambas complementaciones, sin embargo, solo se analizó la complementación de la cepa JG2646, la cual únicamente restauró el fenotipo de crecimiento a acidez cuando se complementó con el operon completo, esto nos indica que la inserción en el regulador de respuesta ejerce un efecto polar.

## 6. DISCUSIÓN

Se conoce que el estrés por acidez es muy común en casi cualquier ambiente, y que el nicho donde habita *R. tropici* CIAT 899 las concentraciones de protones son muy variables. En la rizósfera y en los nódulos, el ambiente ácido propicia que la bacteria active mecanismos de defensa para lograr sobrevivir, de tal manera que le permitan instalarse dentro del simbiosoma. Los mecanismos de respuesta a acidez se han estudiado en organismos modelos como *E. coli* o *B. subtilis* (Lund et al., 2014), estos involucran genes que codifican por ejemplo para chaperonas, proteínas que modifican la membrana, expulsión de protones a través de ATPasas o antiporters que expelen protones como producto de descarboxilación de aminoácidos, entre otros. En este estudio reportamos el conjunto de genes de respuesta a estrés por acidez en *R. tropici* CIAT 899 a través de una mutagénesis por transposón y un análisis transcriptómico mediante RNA-seq.

Con la primera estrategia se lograron obtener 18300 mutantes por inserción del Tn5 de la cepa silvestre. Todas ellas se analizaron para buscar el fenotipo de sensibilidad a acidez (descrito anteriormente) y se lograron identificar 26 mutantes que presentaban este fenotipo. Logramos identificar el sitio de inserción del Tn5 en 17 de ellas, dicha transposición no se logró observar en el plásmido simbiótico; lo cual nos dice que los genes localizados en este ente no participan en este tipo de respuesta. Dentro de estas 17 mutantes encontramos dos (JG8656 y JG163) afectadas en los genes que codifican para una hidroxilasa de lípidos de ornitina (OlsC) y una lisil fosfatidil glicerol sintetasa putativa, respectivamente. Estos genes habían sido reportados como genes de respuesta a acidez en la misma cepa (Rojas-Jiménez et al., 2005; Vences-Guzmán et al., 2011; Vinuesa et al., 2003). Este resultado confirma que estos genes estén participando en la respuesta a acidez, ocasionando un probable cambio en la permeabilidad membranal, lo cual evitaría el paso de protones al citoplasma y por consiguiente el daño celular. Se encontraron otras tres mutantes que están afectadas en proteínas hipotéticas (JG1076, JG4655 Y JG6057), dos de las cuales (JG1076 y JG4655) tienen la inserción en el mismo ORF (RTCIAT\_RS31680); otras mutantes que tienen inserción en el mismo ORF son las mutantes JG283 y JG9867. Encontrar

inserciones en el mismo ORF en mutantes diferentes nos indica que la mutagénesis es saturante.

JG241 alberga el transposón en un gene que codifica para una triosa fosfato isomerasa, este gen también se encontró en los estudios transcriptómicos realizados en *H. pylori*, en donde se observó que además de los genes que hidrolizan la urea, también sobreexpresaba genes relacionados al metabolismo del carbono, entre ellos *tpiA*, lo cual indica un fuerte requerimiento de energía en esta condición (Ang et al., 2001; Wen et al., 2003; Zanotti & Cendron, 2010). Otras de las mutantes por inserción, están involucrados en la generación de energía como la prolil aminopeptidasa, la ribulosa fosfato epimerasa o la acetil coenzima A sintetasa (ver tabla 3 dentro de la sección 6).

Un mecanismo de defensa contra este tipo de estrés es modificar la primera barrera de la célula, es decir modificar la membrana, la pared celular o la cápsula en el caso de las bacterias encapsuladas. Por ejemplo, se ha reportado que los polisacáridos y los exopolisacáridos incrementan sus niveles cuando la célula está expuesta a una alta concentración de protones (Aarons & Graham, 1991; Graham et al., 1994; Hellweg et al., 2009; Reeve et al., 1997; Reeve et al., 1998). En nuestro estudio aislamos una mutante que tiene una inserción en un ORF que codifica para una proteína implicada en la biosíntesis de polisacáridos, lo cual correlaciona con lo encontrado en otros estudios. Otro posible mecanismo que esté funcionando en *R. tropici* CIAT 899 es expeler protones al ambiente extracelular a través de antiporter de cationes protones (mutante JG9587), justo como está reportado para algunas bacterias como *H. pylori* (Inoue et al., 1999).

Encontramos un *locus* correspondiente a un SDC afectado por el Tn5 (JG2646), cuya inserción se encuentra en el regulador de respuesta, probablemente este sistema esté implicado en sensar un ambiente ácido y de esta manera active la transcripción de otros genes que estén participando en esta respuesta (Lund et al., 2014). Por ejemplo, *Salmonella typhimurium* activa su sistema PhoP/PhoQ (Prost et al., 2007) en respuesta al incremento en la concentración de protones y a su vez desencadena una respuesta transcripcional que ayudan a la célula a sobrevivir o adaptarse bajo esta condición. Otro claro ejemplo de SDC ya caracterizado, que se activa en condiciones de estrés por acidez es el sistema ArsS/ArsR (Pflock et al.,

2006) en el patógeno causante de cáncer gástrico *H. pylori*. Además de este SDC, encontramos algunos reguladores transcripcionales afectados por el transposón (JG9477 y JG8654), los cuales codifican para proteínas homologas a MarR y FtrA, respectivamente. Rv1404 (de *Mycobacterium tuberculosis*) es una proteína homologa a MarR y se ha reportado que regula genes que codifican para S-adenosil metionina –dependiente de metiltransferasas (rv1403c y rv1405c), la cual ocurre bajo condiciones de acidez (Healy et al., 2016).

Ricillo y colaboradores reportaron en el 2000, que el gen *gshB* se expresa en *R. tropici* en condiciones de acidez, y su producto participa en la biosíntesis de glutatión. En nuestro estudio localizamos una inserción (JG5373) en *gshA*, el cual puede estar involucrado en la condensación de formaldehido y glutatión a S-hidroxi glutatión, dado que ambos genes se encuentran localizados en un cluster, puede que esta mutación ejerza un efecto polar afectado la biosíntesis de glutatión y por lo tanto causando una susceptibilidad a crecer en condiciones de acidez. Los efectos polares ocurren cuando la mutación se localiza en el primer ORF y esto afecta la transcripción de los genes localizados río abajo y por lo tanto se ejerce un efecto polar (Zipser, 1969). En nuestra mutagénesis se generaron 3 mutantes cuya inserción está en un operón y probablemente haya un efecto polar ya que una de éstas tiene la inserción en el primer gen (Figura S1 en la sección 6). Esto se verificó cuando se complementó la mutante JG2646 con el regulador de respuesta y con el operón completo en trans, restaurando el fenotipo únicamente cuando se complementó con el operón completo. Para finalizar esta parte de nuestra investigación, podemos decir que estos genes encontrados en la mutagénesis varían de especie a especie e incluso interespecies, dado que la cepa más cercana a CIAT 899, la PRF81, aunque contiene un genoma parecido al de CIAT899, no posee algunos de los “genes de respuesta a acidez” que previamente se habían reportado cuando se publicó el genoma de CIAT 899 (Ormeño-Orrillo et al., 2012).

El enfoque anterior nos permitió identificar genes esenciales que se activan en condiciones de acidez, sin embargo, pueden existir genes con un papel importante en condiciones de acidez que no se puedan identificar con el enfoque descrito arriba. Puede que haya genes que se induzcan bajo este estrés, pero que también sean esenciales para el crecimiento en condiciones neutrales e incluso puede que

haya genes redundantes; por lo tanto, de manera adicional y como enfoque complementario realizamos un análisis transcriptómico mediante RNA-seq, que nos permitió obtener más genes que participan en esta respuesta.

Analizamos la respuesta transcripcional de CIAT 899 en respuesta a la acidez. Crecimos la cepa silvestre en 3 condiciones diferentes (pH 6.8, pH 4.5 y un choque por acidez (de pH 6.8 a pH 4.5) durante 45 minutos) que se detallan en materiales y métodos. Anteriormente se había reportado en *S. meliloti* un estudio transcripcional en respuesta a acidez, en el cual encontraron que hay una gran expresión de genes a tiempos cortos (Hellweg et al., 2009). Nosotros elegimos un tiempo medianamente corto para observar el perfil de genes diferencialmente expresados (DEGs) en una etapa temprana. Este análisis mostró un perfil transcripcional bastante cambiante (figura 3 y 4 en sección 6), dado que 383 genes se expresaron diferencialmente en condiciones de acidez comparada con la condición neutra. En contraste, solo 11 genes fueron DEGs en el choque por acidez (tabla 4 y tabla S1 en la sección 6).

Todos los DEGs se categorizaron por función (Figura 5 en sección 6) y en esta categorización encontramos genes asociados con el transporte de metales, transportadores tipo ABC, reguladores transcripcionales, hidrogenasas, sistemas de expulsión de protones (como la ATPasa), factores sigma y/o proteínas hipotéticas (figura 5 y tabla 4 de la sección 6). Diferentes estudios se han realizado con cada una de las categorías que nosotros encontramos, por ejemplo, en el caso de los transportadores de metales, se conoce que en los ambientes ácidos abundan altas concentraciones de metales pesados, por lo que se requiere de transportadores específicos necesarios para su eflujo y para evitar la toxicidad de los mismos (Montanini et al., 2007). Consideremos ahora otro tipo de transportadores (tipo ABC), los cuales se han relacionado con esta respuesta en *S. aureus*, dado que en un estudio hecho por Bore y colaboradores encontraron sobre expresados diferentes transportadores de este tipo (Bore et al., 2007). Existen otras proteínas que también expelen protones, tal es el caso del complejo ATPasa F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> o antiporters de cationes y/o protones; para el caso de la ATPasa, el cual es un complejo multiproteico formado por dos subunidades (F<sub>0</sub> y F<sub>1</sub>) que en condiciones normales cataliza la síntesis de ATP a ADP usando la energía liberada de un gradiente de protones electroquímico; en contraste, en condiciones de acidez la

hidrólisis del ATP puede ser usada para expeler protones del citoplasma a través de la subunidad F<sub>0</sub>. Con base en esto podríamos decir que este complejo contribuye a la homeostasis del pH tal como se ha observado en *E. coli* o *Corynebacterium glutamicum* (Barriuso-Iglesias et al., 2013; Diez et al., 2004). En nuestra cepa, encontramos que este complejo multiproteico se encuentra sobreexpresado mas de 4 veces a pH ácido comparado con la condición neutra. Por lo que se refiere a genes *hyc*, se ha encontrado en *E. coli* y *S. typhimurium* que estas hidrogenasas reducen los efectos del estrés por acidez por el consumo de protones y producción de H<sub>2</sub> (Hayes et al., 2006; Jia et al., 2017; Noguchi et al., 2010; Zbell & Maier, 2009).

De manera interesante, los genes necesarios para contender con la acidez están influenciados por uno o varios reguladores transcripcionales, entre los que se pueden citar diversos factores de transcripción, SDC y factores sigma. Estos reguladores de la transcripción podrían estar influenciando la expresión de los genes antes mencionados. Por ejemplo, se sabe que los reguladores transcripcionales de la familia TetR se han reportado que activan genes que codifican bombas de eflujo (Perrone et al., 2017). En nuestro estudio reportamos algunos genes que también pertenecen a esta familia como lo son RTCIAT899\_RS10760 y RTCIAT899\_RS28830. También identificamos algunos genes de otra familia como RTCIAT899\_RS29995 (DeoR) o RTCIAT899\_RS14585 (YebC/PmpR). Otros factores importantes en la transcripción son los factores sigma, que reconocen la región promotora de genes que pueden estar implicados en la respuesta a acidez y pueden hacerlo de manera global o local. Como se menciona al inicio de este escrito, pueden contribuir al estrés general o ser específicos de algún tipo de estrés (Paget, 2015). Por ejemplo, se ha reportado que el factor sigma E (SigE) de *M. tuberculosis* (Bansal et al., 2017) es sobre-expresado en condiciones de acidez, y que interactúa con PhoP para regular a otro complejo de genes necesarios para la respuesta a acidez. En este estudio encontramos 3 factores sigma sobreexpresados: RTCIAT899\_RS15835, RTCIAT899\_RS13855 y RTCIAT899\_RS12250, los cuales tienen un valor de log<sub>2</sub>FC de 3.3, 1.6 y 0.5, respectivamente; razón por la cual se infiere que estos reguladores podrían activar la expresión de los genes necesarios para que esta cepa resista a este tipo de estrés. También encontramos 40 proteínas hipotéticas expresadas en condiciones de acidez, que además tienen un log<sub>2</sub>FC muy alto, lo cual quiere decir que alguna



de estas proteínas esté muy implicada en dicha respuesta, tal es el caso de RTCIAT899\_RS13535, cuyo log2FC es de 6.1, mayor a cualquier otro gen DEG encontrado en este análisis. Sin embargo, para comprobar esto se requieren estudios para descifrar la posible función de estos genes en la respuesta a este tipo de estrés. Dentro del grupo de genes que se encuentran inducidos en el choque por acidez, hay algunos que también encontramos cuando se analizó el crecimiento a pH 4.5 (ver tabla ver tabla 4 de la sección 6), esto nos confirma el hecho de que estos genes son requeridos para el crecimiento en condiciones de acidez.

## 7. CONCLUSIONES

Combinando una mutagénesis por transposón (Tn5) y un análisis transcriptómico (mediante RNA-seq) logramos identificar el grupo de genes que están participando en la respuesta a acidez en *Rhizobium tropici* CIAT 899.

Se construyó una biblioteca de 18000 mutantes por inserción de un transposón (Tn5), las cuales se analizaron en medios a diferentes valores de pH (pH 4.5 y pH 6.8) para buscar el fenotipo de sensibilidad a acidez y medianamente sensible a acidez, de este análisis logramos aislar 26 mutantes que presentaban este fenotipo. Se identificaron los sitios de inserción de 17 mutantes a través de iPCR y secuenciación de fragmentos que contenían parte del Tn5.

En el análisis transcriptómico logramos identificar 351 DEGs sobre-expresados y 32 DEGs reprimidos durante el crecimiento de esta bacteria en condiciones de acidez comparada con un control a pH 6.8; 11 DEGs sobre-expresados durante un choque por acidez y ningún gen fue reprimido durante este choque de acidez. Los genes encontrados en este análisis se agruparon en diversas categorías funcionales, que comprenden en esencia, funciones necesarias para contender contra este tipo de estrés.

## 8. PERSPECTIVAS

Se determinará la red de regulación mediante Chip-Seq, tanto del sistema de dos componentes (encontrado en la mutagenesis por transposón) como de los reguladores transcripcionales (análisis transcriptómico). De estos genes encontrados a través de los dos enfoques pero sobre todo los del análisis transcriptómico, comprobar mediante qRT-PCR el nivel de expresión de algunos genes seleccionados. De los genes que se corrobore la expresión comprobar las funciones predichas de los genes con un mayor log<sub>2</sub>FC para detallar los mecanismos moleculares de la resistencia a acidez en CIAT 899 y a su vez comprobar si estas funciones pueden contribuir a una mayor resistencia a acidez que podrían extrapolarse a otras rizobia que sean resistentes como la cepa hermana PRF81. Analizar la posible función del gen que obtuvo mayor expresión diferencial (RTCIAT899\_RS13535) anotado como proteína hipotética, generando una mutación por delección para comprobar en que pudiera estar implicado dicho gen y por último dado que los genes que constituyen las diferentes subunidades de la ATPasa F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> también presentaron un nivel alto de log<sub>2</sub>FC, se propone construir mutantes en alguno de los genes que la constituyen para determinar si esta enzima contribuye a la homeóstasis de pH.

## 9. REFERENCIAS CITADAS

- Aarons, S. R., & Graham, P. H. (1991). Response of *Rhizobium leguminosarum* bv phaseoli to acidity. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/BF00010727>
- Alexandre, A., & Oliveira, S. (2013). Response to temperature stress in rhizobia. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.702097>
- Amundsen, S. K., Fero, J., Hansen, L. M., Cromie, G. A., Solnick, J. V., Smith, G. R., & Salama, N. R. (2008). *Helicobacter pylori* AddAB helicase-nuclease and RecA promote recombination-related DNA repair and survival during stomach colonization. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06336.x>
- Andrä, J., Goldmann, T., Ernst, C. M., Peschel, A., & Gutschmann, T. (2011). Multiple peptide resistance factor (MprF)-mediated resistance of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial peptides coincides with a modulated peptide interaction with artificial membranes comprising lysyl-phosphatidylglycerol. *Journal of Biological Chemistry*, 286(21), 18692–18700. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.226886>
- Andrews, M., & Andrews, M. E. (2017). Specificity in legume-rhizobia symbioses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4). <https://doi.org/10.3390/ijms18040705>
- Ang, S., Lee, C. Z., Peck, K., Sindici, M., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., & Wang, J. T. (2001). Acid-induced gene expression in *Helicobacter pylori*: Study in genomic scale by microarray. *Infection and Immunity*. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1679-1686.2001>
- Arendt, W., Hebecker, S., Jäger, S., Nimtz, M., & Moser, J. (2012). Resistance phenotypes mediated by aminoacyl-phosphatidylglycerol synthases. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.06576-11>
- Audia, J. P., Webb, C. C., & Foster, J. W. (2001). Breaking through the acid barrier: An orchestrated response to proton stress by enteric bacteria. *International Journal of Medical Microbiology*, 291(2), 97–106. <https://doi.org/10.1078/1438-4221-00106>

- Bansal, R., Anil Kumar, V., Sevalkar, R. R., Singh, P. R., & Sarkar, D. (2017). Mycobacterium tuberculosis virulence-regulator PhoP interacts with alternative sigma factor SigE during acid-stress response. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/mmi.13635>
- Barriuso-Iglesias, M., Barreiro, C., Sola-Landa, A., & Martín, J. F. (2013). Transcriptional control of the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase operon of *Corynebacterium glutamicum*: SigmaH factor binds to its promoter and regulates its expression at different pH values. *Microbial Biotechnology*. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12022>
- Booth, I. R., Cash, P., & O'Byrne, C. (2002). Sensing and adapting to acid stress. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 81(1–4), 33–42. <https://doi.org/10.1023/A:1020565206835>
- Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, Ø., Rode, T. M., & Holck, A. (2007). Acid-shock responses in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2007/005942-0>
- Brown, J. L., Ross, T., McMeekin, T. A., & Nichols, P. D. (1997). Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *International Journal of Food Microbiology*, 37(2–3), 163–173. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00068-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00068-8)
- Browne, N., & Dowds, B. C. (2001). Heat and salt stress in the food pathogen *Bacillus cereus*. *Journal of Applied Microbiology*, 91(6), 1085–1094.
- Carrareto Alves, L. M., De Souza, J. A. M., Varani, A. D. M., & Lemos, E. G. D. M. (2014). The family Rhizobiaceae. In *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1\\_297](https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_297)
- Castanie-Cornet, M.-P., Penfound, T. A., Smith, D., Elliott, J. F., & Foster, J. W. (1999). Control of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*
- Castanie-Cornet, M. P., & Foster, J. W. (2001). *Escherichia coli* acid resistance: CAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-147-3-709>

- Chen, H., Gartner, E., & Rolfe, B. G. (1993). Involvement of genes on a megaplasmid in the acid-tolerant phenotype of *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Chen, H., Richardson, A. E., & Rolfe, B. G. (1993). Studies of the Physiological and Genetic Basis of Acid Tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology*.
- Correa, O. S., & Barneix, A. J. (1997). Cellular mechanisms of pH tolerance in *Rhizobium loti*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*.  
<https://doi.org/10.1023/A:1018577411631>
- Correa, O. S., Rivas, E. A., & Barneix, A. J. (1999). Cellular envelopes and tolerance to acid pH in *Mesorhizobium loti*. *Current Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1007/PL00006812>
- Cotter, P. D., Ryan, S., Gahan, C. G. M., & Hill, C. (2005). Presence of GadD1 glutamate decarboxylase in selected listeria monocytogenes strains is associated with an ability to grow at low pH. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.2832-2839.2005>
- Cunningham, S. D., & Munns, D. N. (1984). The correlation between extracellular polysaccharide production and acid tolerance in *Rhizobium*. *Soil Science Society of America Journal*.  
<https://doi.org/10.2136/sssaj1984.03615995004800060014x>
- De Biase, D., & Lund., P. A. (2015). Chapter Two-The Escherichia coli Acid Stress Response and Its Significance for Pathogenesis. *Advances in Applied Microbiology*, 92, 49–88.  
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/bs.aambs.2015.03.002>
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F., & Visca, P. (1999). The response to stationary-phase stress conditions in Escherichia coli: Role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Molecular Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01430.x>
- Del Cerro, P., Pérez-Montaña, F., Gil-Serrano, A., López-Baena, F. J., Megías, M., Hungria, M., & Ollero, F. J. (2017). The *Rhizobium tropici* CIAT 899 NodD2

protein regulates the production of Nod factors under salt stress in a flavonoid-independent manner. *Scientific Reports*, 7(December 2016), 1–10.  
<https://doi.org/10.1038/srep46712>

Diez, M., Zimmermann, B., Börsch, M., König, M., Schweinberger, E., Steigmiller, S., ... Gräber, P. (2004). Proton-powered subunit rotation in single membrane-bound F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP synthase. *Nature Structural and Molecular Biology*.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb718>

Dilworth, M. J., Howieson, J. G., Reeve, W. G., Tiwari, R. P., & Glenn, A. R. (2001). Acid tolerance in legume root nodule bacteria and selecting for it. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. <https://doi.org/10.1071/EA99155>

Draghi, W. O., Del Papa, M. F., Pistorio, M., Lozano, M., De Los Ángeles Giusti, M., Torres Tejerizo, G. A., ... Lagares, A. (2010). Cultural conditions required for the induction of an adaptive acid-tolerance response (ATR) in *Sinorhizobium meliloti* and the question as to whether or not the ATR helps rhizobia improve their symbiosis with alfalfa at low pH. *FEMS Microbiology Letters*.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2009.01846.x>

Fernandez-Aunián, C., Hamouda, T. Ben, Iglesias-Guerra, F., Argandña, M., Reina-Bueno, M., Nieto, J. J., ... Vargas, C. (2010). Biosynthesis of compatible solutes in rhizobial strains isolated from *Phaseolus vulgaris* nodules in Tunisian fields. *BMC Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-192>

Ferreira, P. A. A., Bomfeti, C. A., Soares, B. L., & de Souza Moreira, F. M. (2012). Efficient nitrogen-fixing *Rhizobium* strains isolated from amazonian soils are highly tolerant to acidity and aluminium. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 1947–1959. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0997-7>

Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* acid resistance: Tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*, 2(11), 898–907.  
<https://doi.org/10.1038/nrmicro1021>

Foster, J. W., & Hall, H. K. (1990). Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 172(2), 771–778.  
<https://doi.org/10.1128/jb.172.2.771-778.1990>

- Foster, J. W., & Hall, H. K. (1991). Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, 173(16), 5129–5135. <https://doi.org/10.1128/jb.173.16.5129-5135.1991>
- Foy, C. D. (1988). Plant adaptation to acid aluminum-toxic soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*. <https://doi.org/10.1080/00103628809367988>
- Fozo, E. M., Kajfasz, J. K., & Quivey, R. G. (2004). Low pH-induced membrane fatty acid alterations in oral bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2004.07.047>
- Gage, D. J. (2004). Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. <https://doi.org/10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004>
- Gibson, K. E., Kobayashi, H., & Walker, G. C. (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091427>
- Glenn, A. R., Reeve, W. G., Tiwari, R. P., & Dilworth, M. J. (1999). Acid tolerance in root nodule bacteria. *Novartis Foundation Symposium*.
- Graham, P. H., Draeger, K. J., Ferrey, M. L., Conroy, M. J., Hammer, B. E., Martinez, E., ... Quinto, C. (1994). Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* Umr1899. *Canadian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1139/m94-033>
- Harrison, P. W., Lower, R. P. J., Kim, N. K. D., & Young, J. P. W. (2010). Introducing the bacterial “chromid”: Not a chromosome, not a plasmid. *Trends in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2009.12.010>
- Hayes, E. T., Wilks, J. C., Sanfilippo, P., Yohannes, E., Tate, D. P., Jones, B. D., ... Slonczewski, J. L. (2006). Oxygen limitation modulates pH regulation of catabolism and hydrogenases, multidrug transporters, and envelope composition in *Escherichia coli* K-12. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-89>



- Healy, C., Golby, P., MacHugh, D. E., & Gordon, S. V. (2016). The MarR family transcription factor Rv1404 coordinates adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acid stress via controlled expression of Rv1405c, a virulence-associated methyltransferase. *Tuberculosis*.  
<https://doi.org/10.1016/j.tube.2015.10.003>
- Hebecker, S., Arendt, W., Heinemann, I. U., Tiefenau, J. H. J., Nimtz, M., Rohde, M., ... Moser, J. (2011). Alanyl-phosphatidylglycerol synthase: Mechanism of substrate recognition during tRNA-dependent lipid modification in *Pseudomonas aeruginosa*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07621.x>
- Hellweg, C., Pühler, A., & Weidner, S. (2009). The time course of the transcriptomic response of *Sinorhizobium meliloti* 1021 following a shift to acidic pH. *BMC Microbiology*. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-37>
- Hinsinger, P., Plassard, C., Tang, C., & Jaillard, B. (2003). Origins of root-mediated pH changes in the rhizosphere and their responses to environmental constraints: A review. *Plant and Soil*, 248(1–2), 43–59.  
<https://doi.org/10.1023/A:1022371130939>
- Huang, G., Zhang, L., & Birch, R. G. (2000). Rapid amplification and cloning of Tn5 flanking fragments by inverse PCR. *Letters in Applied Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2000.00781.x>
- Hungria, M., Andrade, D. D. S., Chueire, L. M. D. O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F. J., & Megías, M. (2000a). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(11–12), 1515–1528.  
[https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00063-8)
- Hungria, M., Andrade, D. D. S., Chueire, L. M. D. O., Probanza, A., Guttierrez-Mañero, F. J., & Megías, M. (2000b). Isolation and characterization of new efficient and competitive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) rhizobia from Brazil. *Soil Biology and Biochemistry*. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00063-8](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00063-8)
- Inoue, Sakurai, T., Ujike, S., Tsuchiya, T., Murakami, H., & Y, H. K. Y. (1999).

Expression of functional Na<sup>+</sup> / H<sup>+</sup> antiporters of *Helicobacter pylori* in antiporter-deficient *Escherichia coli* mutants. *FEBS Letters*, 443, 11–16.

Jia, K., Wang, G., Liang, L., Wang, M., Wang, H., & Xu, X. (2017). Preliminary transcriptome analysis of mature biofilm and planktonic cells of *Salmonella* Enteritidis exposure to acid stress. *Frontiers in Microbiology*.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01861>

Kang, H. W., Wirawan, I. G., & Kojima, M. (1994). Cellular localization and functional analysis of the protein encoded by the chromosomal virulence gene (*acvB*) of *Agrobacterium tumefaciens*. *Biosci Biotechnol Biochem*.

Kanjee, U., & Houry, W. A. (2013). Mechanisms of Acid Resistance in *Escherichia coli*. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 65–81.  
<https://doi.org/10.1146/annurev-micro-092412-155708>

Kieboom, J., & Abee, T. (2006). Arginine-dependent acid resistance in *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Journal of Bacteriology*.  
<https://doi.org/10.1128/JB.00323-06>

Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Genes commonly involved in acid tolerance are not overexpressed in the plant microsymbiont *Mesorhizobium loti* MAFF303099 upon acidic shock. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(16), 7137–7147. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5875-4>

Liu, Y., Tang, H., Lin, Z., & Xu, P. (2015). Mechanisms of acid tolerance in bacteria and prospects in biotechnology and bioremediation. *Biotechnology Advances*, 33(7), 1484–1492. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.06.001>

López-Lara, I. M., & Geiger, O. (2017). Bacterial lipid diversity. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.10.007>

Lund, P., Tramonti, A., & De Biase, D. (2014). Coping with low pH: Molecular strategies in neutrophilic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*.  
<https://doi.org/10.1111/1574-6976.12076>

Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F. M., Franco, A. A., Graham, P., &

- Pardo, M. a. (1991). *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 41(3), 417–426. <https://doi.org/10.1099/00207713-41-3-417>
- Merrell, D. S., & Camilli, a. (1999). The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01650.x>
- Miller, S. I., Kukral, A. M., & Mekalanos, J. J. (1989). A two-component regulatory system (*phoP phoQ*) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(13), 5054–5058. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.13.5054>
- Montanini, B., Blaudez, D., Jeandroz, S., Sanders, D., & Chalot, M. (2007). Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: Improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-107>
- Moore, W. E. C., Stackebrandt, E., Kandler, O., Colwell, R. R., Krichevsky, M. I., Truper, H. G., ... Moore, L. H. (1987). Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00207713-37-4-463>
- Muglia, C. I., Grasso, D. H., & Aguilar, O. M. (2007). *Rhizobium tropici* response to acidity involves activation of glutathione synthesis. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2006/003483-0>
- Müller, S., Götz, M., & Beier, D. (2009). Histidine residue 94 is involved in pH sensing by histidine kinase *ArsS* of *Helicobacter pylori*. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006930>
- Neumann, G., & Martinoia, E. (2002). Cluster roots - An underground adaptation for survival in extreme environments. *Trends in Plant Science*. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02241-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02241-0)
- Noguchi, K., Riggins, D. P., Eldahan, K. C., Kitko, R. D., & Slonczewski, J. L. (2010). Hydrogenase-3 contributes to anaerobic acid resistance of *Escherichia coli*.

*PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010132>

Nye, P. H. (1981). Changes of pH across the rhizosphere induced by roots. *Plant and Soil*. <https://doi.org/10.1007/BF02277359>

Occhialini, A., Jiménez De Bagüés, M. P., Saadeh, B., Bastianelli, D., Hanna, N., De Biase, D., & Köhler, S. (2012). The glutamic acid decarboxylase system of the new species *Brucella microti* contributes to its acid resistance and to oral infection of mice. *Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis522>

Ormeño-Orrillo, E., Menna, P., Almeida, L. G. P., Ollero, F. J., Nicolás, M. F., Pains Rodrigues, E., ... Martínez-Romero, E. (2012). Genomic basis of broad host range and environmental adaptability of *Rhizobium tropici* CIAT 899 and *Rhizobium* sp. PRF 81 which are used in inoculants for common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-735>

Ormeño-Orrillo, E., Servín-Garcidueñas, L. E., Rogel, M. A., González, V., Peralta, H., Mora, J., ... Martínez-Romero, E. (2015). Taxonomy of rhizobia and agrobacteria from the Rhizobiaceae family in light of genomics. *Systematic and Applied Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2014.12.002>

Paget, M. S. (2015). Bacterial sigma factors and anti-sigma factors: Structure, function and distribution. *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom5031245>

Park, Y. K., Bearson, B., Bang, S. H., Bang, I. S., & Foster, J. W. (1996). Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.5441070.x>

Pérez-Montaña, F., del Cerro, P., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. J., Cubo, M. T., Hungria, M., ... Ollero, F. J. (2016). RNA-seq analysis of the *Rhizobium tropici* CIAT 899 transcriptome shows similarities in the activation patterns of symbiotic genes in the presence of apigenin and salt. *BMC Genomics*, *17*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2543-3>

Perrone, F., De Siena, B., Muscariello, L., Kendall, S. L., Waddell, S. J., & Sacco, M.

- (2017). A Novel TetR-like transcriptional regulator is induced in acid-nitrosative stress and controls expression of an efflux pump in mycobacteria. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02039>
- Pflock, M., Finsterer, N., Joseph, B., Mollenkopf, H., Meyer, T. F., & Beier, D. (2006). Characterization of the ArsRS regulon of *Helicobacter pylori*, involved in acid adaptation. *Journal of Bacteriology*. <https://doi.org/10.1128/JB.188.10.3449-3462.2006>
- Poole, P., Ramachandran, V., & Terpolilli, J. (2018). Rhizobia: From saprophytes to endosymbionts. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.171>
- Prost, L. R., Daley, M. E., Le Sage, V., Bader, M. W., Le Moual, H., Klevit, R. E., & Miller, S. I. (2007). Activation of the Bacterial Sensor Kinase PhoQ by Acidic pH. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.03.008>
- Reeve, W. G., Bräu, L., Castelli, J., Garau, G., Sohlenkamp, C., Geiger, O., ... Tiwari, R. P. (2006). The *Sinorhizobium medicae* WSM419 IpiA gene is transcriptionally activated by FsrR and required to enhance survival in lethal acid conditions. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28764-0>
- Reeve, W. G., Dilworth, M. J., Tiwari, R. P., & Glenn, A. R. (1997). Regulation of exopolysaccharide production in *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710 involves *exoR*. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-6-1951>
- Reeve, W. G., Tiwari, R. P., Wong, C. M., Dilworth, M. J., & Glenn, A. R. (1998). The transcriptional regulator gene *phrR* in *Sinorhizobium meliloti* WSM419 is regulated by low pH and other stresses. *Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-12-3335>
- Ribeiro, R. A., Barcellos, F. G., Thompson, F. L., & Hungria, M. (2009). Multilocus sequence analysis of Brazilian *Rhizobium* microsymbionts of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) reveals unexpected taxonomic diversity. *Research in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2009.03.009>
- Riccillo, P. M., Muglia, C. I., De Bruijn, F. J., Roe, A. J., Booth, I. R., & Aguilar, O. M.

- (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *Journal of Bacteriology*.  
<https://doi.org/10.1128/JB.182.6.1748-1753.2000>
- Richard, H., & Foster, J. W. (2004). *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *Journal of Bacteriology*.  
<https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6032-6041.2004>
- Rojas-Jiménez, K., Sohlenkamp, C., Geiger, O., Martínez-Romero, E., Werner, D., & Vinuesa, P. (2005). A ClC Chloride Channel Homolog and Ornithine-Containing Membrane Lipids of *Rhizobium tropici* CIAT899 Are Involved in Symbiotic Efficiency and Acid Tolerance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI-18-1175>
- Römheld, V., & Marschner, H. (1986). Evidence for a specific uptake system for iron phytosiderophores in roots of grasses. *Plant Physiology*.  
<https://doi.org/10.1104/pp.80.1.175>
- Rosenblueth, M., Hynes, M. F., & Martínez-Romero, E. (1998). *Rhizobium tropici* teu genes involved in specific uptake of Phaseolus vulgaris bean-exudate compounds. *Molecular and General Genetics*.  
<https://doi.org/10.1007/s004380050772>
- Rosenblueth, M., & Martínez-Romero, E. (2004). *Rhizobium etli* maize populations and their competitiveness for root colonization. *Archives of Microbiology*.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-004-0661-9>
- Rouquette, et al. (1998). The ClpC ATPase of *Listeria monocytogenes* is a general stress protein required for virulence and promoting early bacterial escape from the phagosome of macrophages. *Molecular Microbiology*, 27(6), 1235–1245.  
<https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00775.x>
- Smith, A. M., Harrison, J. S., Sprague, K. M., & Roy, H. (2013). A conserved hydrolase responsible for the cleavage of aminoacylphosphatidylglycerol in the membrane of *Enterococcus faecium*. *Journal of Biological Chemistry*.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.484402>

- Sohlenkamp, C., Galindo-Lagunas, K. A., Guan, Z., Vinuesa, P., Robinson, S., Thomas-Oates, J., ... Geiger, O. (2007). The Lipid Lysyl-Phosphatidylglycerol Is Present in Membranes of *Rhizobium tropici* CIAT899 and Confers Increased Resistance to Polymyxin B Under Acidic Growth Conditions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1421>
- Sohlenkamp, C., & Geiger, O. (2015). Bacterial membrane lipids: Diversity in structures and pathways. *FEMS Microbiology Reviews*. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv008>
- Somers, E., Vanderleyden, J., & Srinivasan, M. (2004). Rhizosphere bacterial signalling: A love parade beneath our feet. *Critical Reviews in Microbiology*. <https://doi.org/10.1080/10408410490468786>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., & Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual Review Of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Storz, G., & Hengge-Aronis, R. (2000). *Bacterial Stress Responses*. ASM Press. [https://doi.org/10.1002/1521-3773\(20010316\)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/1521-3773(20010316)40:6<9823::AID-ANIE9823>3.3.CO;2-C)
- Su, M. S., Schlicht, S., & Gänzle, M. G. (2011). Contribution of glutamate decarboxylase in *Lactobacillus reuteri* to acid resistance and persistence in sourdough fermentation. *Microbial Cell Factories*. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-10-S1-S8>
- Taylor, E. S., & Gale, E. F. (1945). Studies on bacterial amino-acid decarboxylases: 1. l(+)-lysine decarboxylase. *The Biochemical Journal*.
- Vences-Guzmán, M. Á., Guan, Z., Ormeño-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I. M., Martínez-Romero, E., ... Sohlenkamp, C. (2011). Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x>
- Vinuesa, P., Neumann-Silkow, F., Pacios-Bras, C., Spaink, H. P., Martínez-Romero, E., & Werner, D. (2003). Genetic Analysis of a pH-Regulated Operon from *Rhizobium tropici* CIAT899 Involved in Acid Tolerance and Nodulation

- Competitiveness. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(2), 159–168.  
<https://doi.org/10.1094/MPMI.2003.16.2.159>
- Waterman, S. R., & Small, P. L. C. (2003). The glutamate-dependent acid resistance system of *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* is inhibited in vitro by L-trans-pyrrolidine-2,4-dicarboxylic acid. *FEMS Microbiology Letters*.  
[https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00427-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00427-0)
- Wen, Y., Marcus, E. A., Matrubutham, U., Gleeson, M. A., Scott, D. R., & Sachs, G. (2003). Acid-adaptive genes of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity*.  
<https://doi.org/10.1128/IAI.71.10.5921-5939.2003>
- Wirawan, I. G., Kang, H. W., & Kojima, M. (1993). Isolation and characterization of a new chromosomal virulence gene of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*.
- Zanotti, G., & Cendron, L. (2010). Functional and structural aspects of *Helicobacter pylori* acidic stress response factors. *IUBMB Life*. <https://doi.org/10.1002/iub.382>
- Zbell, A. L., & Maier, R. J. (2009). Role of the Hya Hydrogenase in Recycling of Anaerobically Produced H<sub>2</sub> in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02064-08>
- Zipser, D. (1969). Polar mutations and operon function. *Nature*.  
<https://doi.org/10.1038/221021a0>



## 10. APÉNDICES

### 11.1 Medios de cultivo LB, PY, MM y MAM

Componente (g/L)	LB (Sambrook et al., 1989)	PY (Noel et al., 1984)
Peptona de caseína	10	5
Extracto de levadura	5	3
NaCl	10	0

Para preparar medios sólidos fueron gelificados adicionando 1.5% de agar antes de esterilizar en autoclave. El PY se complementa con 1 mL/100 mL de CaCl<sub>2</sub> 1 M.

#### MM o MAM (Kingsley y Bohlool., 1992) modificado

Componente	1 L	800 ml	500 ml	300 ml	100 ml
69 mM glycerol	5.17 ml	4.13 ml	2.6 ml	1.6 ml	0.52 ml
11 mM sodium glutamate	2.085 g	1.67 g	1 g	0.63 g	0.21 g
MgSO <sub>4</sub>	1.0 g	0.8 g	0.5 g	0.3 g	0-1 g
Homo-Pipes 50 mM (pH 4.5)	12.65 g	10.12 g	6.33 g	3.8 g	1.2 g
Hepes (pH 6.8)	9.53 g	7.62 g	4.77 g	2.86 g	0.95 g

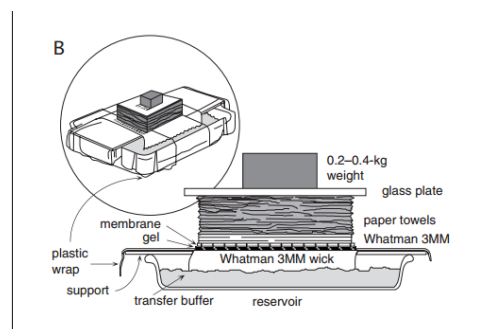
Mezclar completamente, ajustar pH a 6.8 (MM) con HCl 1 N y a pH 4.5 (MAM) con NaOH 1 N, esterilizar y agregar las siguientes soluciones (previamente esterilizadas):

Solución	1000X	1 L	800 ml	500 ml	300 ml	100 ml	
Sol. I (x 10)	1 mM MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O 460 µM CaCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O 1.5 mM (1.12 g) KCl	24.6 g 6.8 g 11.18 g	1 ml	0.8 ml	0.5 ml	0.3 ml	0.1 ml
Sol. II (x 100)	30 µM Fe-EDTA KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (5 µM P) 0.9 µM MnSO <sub>4</sub> - H <sub>2</sub> O	1.1 g 68 mg 15 mg	1 ml	0.8 ml	0.5 ml	0.3 ml	0.1 ml
Sol. III (x 1000)	0.4 µM ZnSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O 0.1 µM CuCl <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O 0.02 µM Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> - 2H <sub>2</sub> O 2.7 nM Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> - 2H <sub>2</sub> O	12 mg 1.7 mg 0.48 mg 0.08 mg	1 ml	0.8 ml	0.5 ml	0.3 ml	0.1 ml
Vitaminas (x 1000)	Pantotenato de sodio 8 µg/ml <sup>-1</sup> Tiamina - HCl 8 µg/ml <sup>-1</sup> Nicotinamida 8 µg/ml <sup>-1</sup>	0.8 mg/ml	100 µl	80 µl	50 µl	30 µl	10 µl

Las placas fueron solidificadas con 0.8% de gelrite (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) en sustitución de agar, dado que el gelrite se usa comúnmente para gelificar medios cuyo pH es ácido y en presencia de cationes, dándole rigidez al agar y estabilidad térmica (Shungu et al., 1983).

## 11.2 Southern blot

1. Depurinizar por 10 minutos, enjuagar con agua. Colocar el gel en agitación suave y constante.
2. Desnaturalizar por 15 minutos, enjuagar con agua destilada; desnaturalizar nuevamente 15 minutos y enjuagar (tiempo de desnaturalización 30 minutos).
3. Neutralizar 15 minutos, desechar la solución de neutralización; colocar nueva solución neutralizante por 15 minutos (tiempo de neutralización 30 minutos). Transcurrido el tiempo colocar el gel en 20XSSC.
4. Transferir el gel a una membrana de nylon cargada positivamente aproximadamente 18 horas (O/N) con 20X SSC como se muestra en la figura 9: puente (puede ser el molde donde se prepara el gel), papel whatman (del tamaño del gel), gel, membrana, 3 papel whatman, servitoallas, placa (servirá para colocar el peso) y un peso aproximado de 4-5 Kg (puede ser un libro).



Transferencia de ADN a la membrana de nitrocelulosa.

5. Colocar la membrana en solución 2X SSC, fijar el DNA transferido en la membrana con luz UV (UV crosslinking), dos veces (sobre un papel whatman). Meter la membrana enrollada en el tubo de hibridación.

6. Incubar la membrana en buffer de prehibridación (preparar al momento) a 68° C por 4 horas (20 minutos antes de que transcurra este tiempo desnaturalizar la sonda). La sonda se desnaturaliza añadiendo a 1 ml de buffer de prehibridación 40 ul de la sonda purificada y se incuba a 95 ° C por 15 minutos.
7. Añadir la sonda desnaturalizada al tubo que contiene buffer de hibridación (preparado en el punto 7) y la membrana e incubar por 14 horas a 68° C.
8. Lavar la membrana con 2X SSC/0.1 % SDS por 5 minutos a temperatura ambiente.
9. Lavar dos veces con 0.1X SSC/0.1% SDS por 15 minutos a 68° C (tiempo de exposición 30 minutos).
10. Lavar la membrana con washing buffer por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación constante.
11. Bloquear la membrana 30 minutos con Buffer blocking (la membrana se coloca en una bolsa de plástico y se sella perfectamente).
12. Incubar la membrana con el anticuerpo anti-digoxigenina: buffer blocking (4 ul de anticuerpo y 40 ml de blocking buffer).
13. Lavar la membrana con washing buffer por 15 minutos (dos veces) a temperatura ambiente.
14. Incubar la membrana por 5 minutos en buffer 3.
15. Incubar 5 minutos con CSPD en una bolsa. Eliminar el exceso de CSPD.
16. Incubar la membrana por 10 minutos a 37° C (este paso se hace para aumentar la luminiscencia).
17. Exponer la membrana en una película por 20-40 minutos, revelar con solución reveladora por 1-2 minutos enjuagar con agua de la llave y fijar 1-2 minutos con solución fijadora, enjuagar y dejar secando. Todo este último paso se hace en el cuarto oscuro.

### 11.3 Aislamiento de ADN genómico

1. Crecer un cultivo de 3 a 5 ml toda la noche.
2. Centrifugar a 13 000 rpm y desechar el sobrenadante (congelar si es necesario).
3. Resuspender las células en 450 µl del bufer de lisis. Homogenizar la suspensión con ayuda de una micropipeta y mantener 15 min a temperatura ambiente.
4. Agregar 30 µl de solución de proteinasa K (dilución 1:1000). Vortexear 1 min e incubar 1 hr a 65° C.
5. Dejar enfriar los tubos con la tapa abierta (aproximadamente 5 min.).
6. Agregar 5 µl de solución de RNAsa, vortexear 1 min e incubar de 30 a 60 min. A 37°C.
7. Agregar 180 µl de solución de precipitación de proteínas, vortexear 1 min, incubar en hielo por 15 minutos y luego centrifugar 20 minutos a 13000 rpm.
8. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (450 µl).
9. Agregar el mismo volumen de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico. Vortexear 1 min y centrifugar 10 min a 13 000 rpm.
10. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (400 µl) y agregar 400 µl de cloroformo, vortexear 1 min y centrifugar 10 minutos a 10 000 rpm.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo (300 µl) y agregar 0.7 partes de isopropanol (210 µl para 300 µl de muestra). Mezclar por inversión (20 veces).
12. Centrifugar 10 minutos a 13 000 rpm, desechar sobrenadante.
13. Lavar con etanol 70%, mezclar por inversión y centrifugar 5 minutos a 13 000 rpm.
14. Desechar sobrenadante y secar el pellet a temperatura ambiente.

15. Resuspender con 100  $\mu$ l de TE (1/10) pH 8.0 e incubar 10 minutos a 55° C.

#### 11.4 Purificación de ARN usando el mini kit (QIAGEN) modificado

1. Para cada muestra, pesar 25-50 mg de perlas de vidrio u óxido de zirconio (150-600  $\mu$ m de diámetro) esterilizadas en un tubo con seguro de 2 ml.
2. Cosechar las bacterias por centrifugación a 5000 g por 5 min a 4°C (no usar más de  $10^9$  bacterias). Decante el sobrenadante y remueva cuidadosamente todo el medio restante que haya quedado después de desechar sobrenadante.
3. Añada el volumen apropiado de buffer RLT (**700  $\mu$ l para 5 x 10<sup>9</sup> bacterias o 350  $\mu$ l si tiene menos de esta concentración de bacterias**). Vortexear vigorosamente durante 5-10 s.
4. Transferir la suspensión al tubo de 2 ml que contiene las perlas (preparado en paso 1). Colocar las muestras en el lisador de células (bullet blender storm 24 de Next Advance) por 5 min a máxima velocidad.
5. Centrifugar por 10 s a máxima velocidad. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
6. Determine el volumen del sobrenadante. Añadir un volumen igual de etanol (70%) y mezclar bien por pipeteo. No centrifugue.
7. Transferir hasta 700  $\mu$ l del lisado, incluyendo algún precipitado que pudo haberse formado a una columna (suplementada en el kit). **Cierre suavemente** la tapa y centrifugue 15 s a 10000 rpm. Desechar el flujo continuo.
8. Añadir 350  $\mu$ l de la solución RW1 a la columna. **Cierre suavemente** la tapa y centrifugue 15 s a 10000 rpm. Desechar el flujo.
9. Añada 70  $\mu$ l de buffer RDD al stock de 10  $\mu$ l de DNAsa I. Mezcle **suavemente** invirtiendo el tubo y centrifugue brevemente para coleccionar los residuos de la pared del tubo.
10. Añadir la DNAsa I (80  $\mu$ l) recién preparada directamente a la membrana de la columna e incube 15 min de 20 a 30 °C.
11. Añadir 350  $\mu$ l de la solución RW1 a la columna. **Cierre suavemente** la tapa y centrifugue 15 s a 10000 rpm. Deseche el flujo continuo.

12. Añadir 350 µl de la solución RPE a la columna. **Cierre suavemente** la tapa y centrifugue 15 s a 10000 rpm para lavar la membrana de la columna. Deseche el flujo continuo.
13. Añadir 350 µl de la solución RPE a la columna. **Cierre suavemente** la tapa y centrifugue 2 min a 10000 rpm para hacer un segundo lavado a la membrana de la columna. Deseche el flujo continuo.
14. Coloque la columna en un nuevo tubo de 2 ml, **cierre suavemente** la tapa y centrifugue a máxima velocidad durante 1 min.
15. Coloque la columna en otro tubo para coleccionar la muestra. Añada de 30-50 µl de agua libre de RNAsas directamente a la membrana de la columna. Cierre la tapa suavemente y centrifugue por 1 min a 10000 rpm para eluir el RNA.
16. Cuantifique la concentración de las muestras en el nanodrop.
17. Verifique la calidad de las muestras corriendo una electroforesis en gel de agarosa y por último determine la integridad de las mismas en el taping o bioanalizador.

**Puntos importantes antes de comenzar:**

- Las pastillas de las células pueden ser almacenadas a -70°C para usarlas después o usarlas directamente en el procedimiento. Alternativamente puede congelar las células en nitrógeno líquido o hielo seco. Las células pueden ser almacenadas hasta por un mes.
- Después de cosechar las células por centrifugación realice todos los pasos de centrifugación posteriores en una centrifuga estándar a temperatura ambiente (20-30°C). Asegúrese de que la centrifuga no baje de 20 °C.
- Añada 10 µl de β-mercapto etanol (β-ME) por cada ml de RLT y mezcle. Dispense en una campana de extracción y use la protección adecuada. El buffer que contiene RLT puede ser almacenado hasta por un mes.
- El buffer RPE viene como un concentrado, por lo tanto, antes de usar por primera vez, añada 4 volúmenes de etanol 100% como se indica en la botella para obtener una solución de trabajo.

- Si desea de manera opcional, hacer la digestión con DNAsa, prepare la solución stock de DNAsa I como se describe en el apéndice D (pag. 69) del RNeasy Mini Handbook.
- Prepare la solución stock de DNAsa usando DNAsa libre de RNAsa por primera vez. Disuelva el liofilizado en 550 µl de agua libre de RNAsas. Para evitar la pérdida de DNAsa, no abra el vial; inyecte el agua directo al tubo que contiene la DNAsa. Mezcle suavemente invirtiendo el vial, no vortexee. Para almacenar la DNAsa por largos periodos, remueva la solución stock, remueva la solución del vial y divida en alícuotas pequeñas (10 o 20 µl) y almacene a -20° C hasta por 9 meses. Las alícuotas descongeladas pueden ser almacenadas a 4° C hasta por 6 semanas. No re-congele las alícuotas después de descongelar.
- Si así conviene a sus intereses, resuspenda sus células con 200 µl de lisozima recién preparada (20 mg/mL in Tris/EDTA) e incube 2 minutos a temperatura ambiente.

**Todo el material puede o debe ser exclusivamente para extraer RNA.**