



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

**Análisis de la expresión de los genes del metabolismo de trehalosa de *Rhizobium etli* CFN 42 en condiciones de vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris***

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
**M A E S T R O**  
E N  
**B I O T E C N O L O G Í A**  
P R E S E N T A:

BIÓL. DANIEL RAMSSES CARLOS CARRILLO

**Director:**  
Dr. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO

CUERNAVACA, MORELOS

MARZO, 2022

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT (registro 1020417) por la beca que me fue otorgada para la realización del presente proyecto. A los integrantes de mi comité tutorial: mi director el Dr. José Augusto Ramírez Trujillo; los doctores Ramón Suárez Rodríguez, Verónica Obregón Barboza, Edgar Dantán González y Mario Ramírez Yáñez, por el aporte y sugerencias brindadas durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco inmensamente a mi esposa Jenifer quien me ha acompañado en este viaje desde hace tiempo y quien ha sido partícipe de este y muchos más logros. Mis padres Max y Leo quienes con su incansable esfuerzo y arduo trabajo me han apoyado en todo momento para lograr mis sueños. Mi hermano David, gracias por la actitud positiva que inyectas en momentos complicados.

De igual forma agradezco a quienes integran el Laboratorio de Fisiología Molecular de Plantas: a la M. en C. Nancy Hernández Bueno por el apoyo técnico brindado, a mis compañeros Uriel, Lupita, Itzel, Dayana, Oscar, Diego, Montse, Celina y Karina por hacer amena mi estancia en el laboratorio con buenas pláticas.

Finalmente, externo un agradecimiento especial a la UAEM por haberme abierto sus puertas desde mis estudios de licenciatura y ahora de posgrado; es un orgullo pertenecer a la máxima casa de estudios del estado de Morelos y ser parte de una generación que desea cambiar de manera positiva el rumbo de la sociedad actual.

# CONTENIDO

	Pág.
ÍNDICE DE TABLAS .....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
1. RESUMEN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 Fijación biológica de nitrógeno .....	3
2.2 Bacterias Rhizobiales fijadoras de nitrógeno .....	5
2.3 Simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias Rhizobiales .....	7
2.4 Factores que limitan la producción de alimentos derivados de cultivos .....	11
2.5 Mecanismos de defensa.....	12
2.6 Trehalosa .....	12
2.7 Vías de síntesis de trehalosa en Rhizobia.....	15
2.8 Vías de degradación de trehalosa .....	17
2.9 Genes de biosíntesis y degradación de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42.....	17
2.10 Regulación de la expresión génica en bacterias .....	19
2.11 Factores de transcripción en <i>R. etli</i> .....	20
2.12 Antecedentes directos .....	22
3. JUSTIFICACIÓN .....	25
4. HIPÓTESIS.....	25
5. OBJETIVOS.....	26
5.1 General.....	26
5.2 Específicos.....	26
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
7.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	28
7.2 Plásmidos.....	28
7.3 Análisis bioinformático de las posibles regiones promotoras de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42.....	30
7.4 Análisis filogenético de los genes del metabolismo de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42 .....	31
7.5 Construcción de fusiones transcripcionales promotor-GUS de los genes del metabolismo de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42 .....	32

7.5.1 Amplificación por PCR de las secuencias promotoras de los genes <i>otsAch</i> , <i>otsApa</i> , <i>otsB</i> , <i>treY</i> , <i>treZ</i> , <i>treSch</i> , <i>treSpf</i> y <i>thuApf</i> de <i>R. etli</i> CFN 42.....	32
7.5.2 Clonación de promotores en el vector pCR2.1-TOPO .....	33
7.5.3 Identificación de células TOP10f transformantes que contienen las clonas correctas de los promotores .....	34
7.5.4 Construcción de fusiones GFP::GUS-promotor mediante subclonación de las secuencias promotoras en el vector pCMJD .....	34
7.5.5 Transformación de la cepa <i>R. etli</i> CFN 42 con las construcciones pCMJD-promotor .....	34
7.6 Análisis cualitativo – Expresión mediante el ensayo de la $\beta$ -glucuronidasa .....	35
7.7 Análisis cuantitativo – Ensayo de la actividad $\beta$ -glucuronidasa .....	36
7.8 Análisis de la expresión de los genes de síntesis y degradación de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42 al ser inoculada en plantas de <i>P. vulgaris</i> .....	36
8. RESULTADOS .....	38
8.1 Análisis de la región promotora de los genes del catabolismo de trehalosa en <i>R. etli</i> mediante los programas BacPP, iPro54-PseKNC y BPRM1 .....	38
8.2 Análisis filogenético de las secuencias de los genes del metabolismo de trehalosa ....	44
8.3 Análisis de la expresión de los genes de síntesis de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42.....	49
8.3.1 Análisis cualitativo – Expresión mediante el ensayo de la $\beta$ -glucuronidasa .....	49
8.3.2 Análisis cuantitativo – Ensayo de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.....	52
8.4 Análisis de la expresión de los genes de síntesis y degradación de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42 al ser inoculada en raíces de <i>P. vulgaris</i> .....	54
9. DISCUSIÓN .....	60
10. CONCLUSIONES .....	67
11. PERSPECTIVAS .....	68
12. LITERATURA CONSULTADA.....	69
13. ANEXOS .....	78
13.1 Medios de cultivo y protocolos .....	78
13.2 Soluciones .....	80

## ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de la familia Fabaceae.....	5
Tabla 2. Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas pertenecientes al género <i>Rhizobium</i> .....	6
Tabla 3. Enzimas que participan en el metabolismo del disacárido trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42.....	18
Tabla 4. Factores $\sigma$ de <i>E. coli</i> .....	21
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar las secuencias promotoras de los genes del metabolismo de trehalosa en <i>R. etli</i> .....	32
Tabla 6. Condiciones de PCR para la amplificación de las secuencias promotoras.	33
Tabla 7. Regiones de reconocimiento para factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados en las secuencias promotoras de los genes de síntesis y degradación de trehalosa en <i>R. etli</i> CFN 42.....	39

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Mecanismo básico de nitrogenasa (MoFe). .....	4
Figura 2. Reducción de N <sub>2</sub> a NH <sub>3</sub> . .....	4
Figura 3. Esquema general de la simbiosis rizobio-leguminosa y formación de nódulos de fijación de nitrógeno. ....	7
Figura 4. Representación química de un factor Nod de <i>S. meliloti</i> . ....	8
Figura 5. Enrizamiento de pelos radiculares y formación del estado bacteroide. ....	9
Figura 6. Nódulo de fijación de nitrógeno formado por <i>Rhizobium</i> . ....	10
Figura 7. Estructura química de la trehalosa. ....	13
Figura 8. Funciones de la trehalosa como protector de membranas y proteínas. ....	14
Figura 9. Vías de síntesis de trehalosa. ....	15
Figura 10. Diagrama del diseño experimental. ....	27
Figura 11. Mapa del vector pCR2.1-TOPO. ....	29
Figura 12. Mapa del vector pCMJD. ....	30
Figura 13. Región promotora del gen <i>otsAch</i> . ....	39
Figura 14. Región promotora del gen <i>otsApa</i> . ....	40
Figura 15. Región promotora del gen <i>otsB</i> . ....	40
Figura 16. Región promotora del gen <i>treSch</i> . ....	41
Figura 17. Región promotora del gen <i>treSpf</i> . ....	42
Figura 18. Región promotora del gen <i>treY</i> . ....	42
Figura 19. Región promotora del gen <i>treZ</i> . ....	43
Figura 20. Región promotora del gen <i>thuApf</i> . ....	44
Figura 21. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen <i>otsA</i> en $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ y $\gamma$ -proteobacterias. ....	45
Figura 22. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen <i>otsB</i> en $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ y $\gamma$ -proteobacterias. ....	46
Figura 23. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen <i>treS</i> en $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ y $\gamma$ -proteobacterias. ....	47
Figura 24. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen <i>treY</i> en $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ y $\gamma$ -proteobacterias. ....	47

Figura 25. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen <i>treZ</i> en $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ y $\gamma$ -proteobacterias.....	48
Figura 26. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen <i>thuA</i> en $\alpha$ , $\beta$ , $\delta$ y $\gamma$ -proteobacterias.....	49
Figura 27. Análisis de la expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa bajo estrés salino. ....	50
Figura 28. Análisis de la expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa bajo estrés térmico.....	51
Figura 29. Análisis de la expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa bajo la inducción con trehalosa.....	52
Figura 30. Análisis de la cuantificación de la actividad enzimática de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa después de 24 h.....	52
Figura 31. Análisis de la cuantificación de la actividad enzimática de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa después de 48 h.....	53
Figura 32. Expresión en raíz de los genes <i>otsAch</i> y <i>otsApa</i> . ....	55
Figura 33. Expresión en raíz de los genes <i>treY</i> y <i>treZ</i> . ....	56
Figura 34. Expresión en raíz de los genes <i>treSch</i> y <i>treSpf</i> . ....	57
Figura 35. Expresión en raíz de los genes <i>otsB</i> y <i>thuApf</i> .....	58

## 1. RESUMEN

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la conversión del nitrógeno atmosférico en compuestos asimilables como el amonio y es realizado por algunos organismos procariontes; representa uno de los procesos más importantes en el planeta ya que proporciona alrededor del 70% de todo el nitrógeno requerido en los ecosistemas naturales y agroecosistemas. Dentro de los principales microorganismos fijadores de nitrógeno, *Rhizobium* es un género de bacterias Gram negativas ampliamente descrito por interactuar en simbiosis con plantas leguminosas y fijar nitrógeno atmosférico a través de estructuras conocidas como nódulos de fijación de nitrógeno (Moreira, 2011; Rees *et al.*, 2005).

Por otro lado, uno de los factores que limitan el adecuado crecimiento y rendimiento de cultivos son los factores abióticos como el estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas que provocan la deshidratación de los tejidos de las plantas, daño celular y eventualmente la muerte de cultivos; sin embargo, existen organismos denominados anhidrobióticos capaces de generar estrategias de adaptación en terrenos expuestos a factores abióticos desfavorables (Bartels y Sunkar, 2005; Clegg, 2001).

A través de diversas investigaciones se ha determinado que la característica común entre estos organismos para adaptarse a ciertos tipos de estrés es su capacidad de sintetizar y acumular cantidades importantes de trehalosa; la trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-[1,1]- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor encontrado en muchos grupos biológicos como animales, plantas, insectos, hongos y bacterias, el cual tiene funciones de molécula de reserva energética, estabilizador, protector estructural y osmoprotector. El metabolismo de la trehalosa es importante en plantas en aspectos del crecimiento, rendimiento y adaptación a algunos tipos de estrés abiótico y en bacterias que fijan nitrógeno, es clave en la respuesta a altas temperaturas y estrés por desecación (Reina-Bueno *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2008; Elbein *et al.*, 2003; Müller *et al.*, 2001).



*Rhizobium etli* CFN 42 cuenta con tres rutas de biosíntesis de trehalosa conocidas como OtsA-OtsB, TreY-TreZ y TreS; la vía de absorción y degradación comprende la participación del operón *thu* (ThuEFGK) y los genes *thuAB*; en este organismo estos genes están repartidos en su cromosoma y los plásmidos a, c, e y f (González *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2005).

En trabajos previos se ha demostrado que la sobre expresión de la vía de síntesis de trehalosa OtsA en *R. etli* confiere tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico; de igual forma se ha determinado que los genes de degradación de trehalosa, *thuA* y *thuB* en *Sinorhizobium meliloti* son importantes para la nodulación, así como en la colonización de la raíz (Suárez *et al.*, 2008; Jensen *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se analizó el patrón de expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa de *R. etli* empleando fusiones transcripcionales de los genes de síntesis (*otsA* del cromosoma y el plásmido a, *otsB*, *treS* de cromosoma y plásmido f, *treY*, *treZ*) y degradación (*thuApf*) de trehalosa en *R. etli* CFN 42; el análisis de su expresión se realizó: 1) cualitativamente, en vida libre (bajo condiciones de estrés salino, térmico y en medio mínimo M9 con trehalosa como única fuente de carbono), y durante la interacción de *R. etli* CFN 42 con raíces de plantas de frijol a los 7, 14 y 21 días posteriores a la infección; a través de estos ensayos observamos una expresión activa de las vías de síntesis de trehalosa bajo estrés térmico y osmótico, así como durante la formación de nódulos de fijación de nitrógeno. 2) cuantitativamente, a través de la medición de la actividad enzimática, mismo en el que observamos una expresión importante del gen *otsA*.

A través de un estudio bioinformático se identificó la región promotora, así como dos posibles reguladores (*rpoD* y *rpoN*) de los genes bajo estudio; finalmente se construyó la relación filogenética de los genes evaluados mediante árboles con el método Neighbour-Joining; de manera interesante, el par de los genes *treS* y *treZ* parecen no estar estrechamente relacionados, indicando un posible mecanismo de adquisición tal como fue reportado para el gen *otsA*.

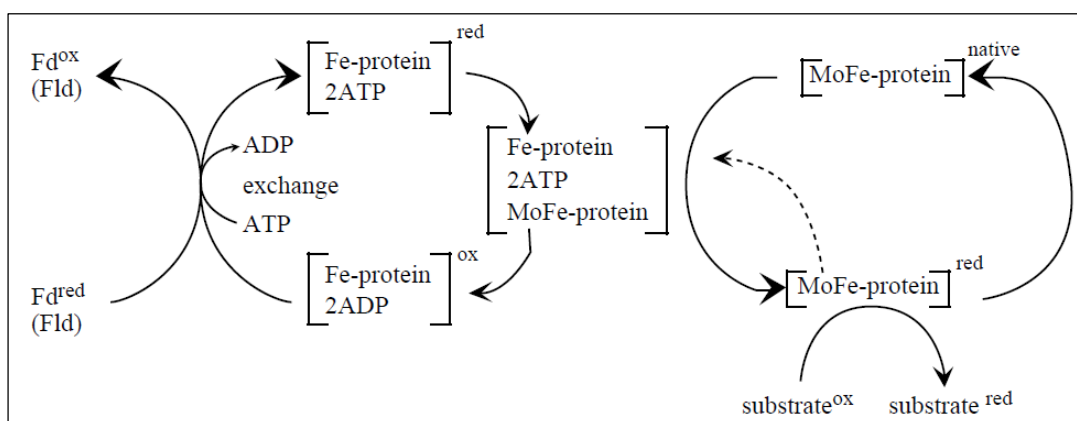
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Fijación biológica de nitrógeno

En su estado libre, el nitrógeno molecular es uno de los elementos más abundantes en la atmósfera, sin embargo, la mayoría de los organismos, en los que se incluyen plantas y animales, son incapaces de acceder al dinitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) para fines metabólicos, por lo que primeramente debe ser transformado en compuestos nitrogenados asimilables tales como amonio o nitrato ( $NO_3$ ) para poder ser consumido (Rees *et al.*, 2005).

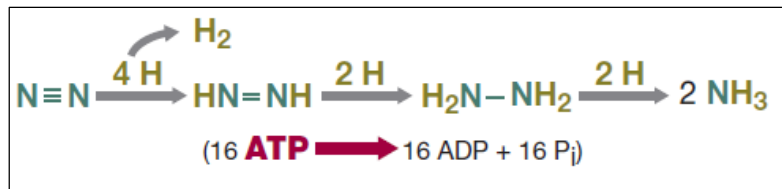
La conversión de nitrógeno atmosférico en compuestos asimilables como el amonio ocurre de dos formas: de manera abiótica o por acción de microorganismos (a través de la FBN) como arqueas y principalmente bacterias en vida libre y en asociación simbiótica; en términos generales la FBN, comprende la conversión de nitrógeno atmosférico a amonio ( $NH_3$ ) y representa tan solo una faceta del ciclo del nitrógeno, el cual engloba la interconversión completa de nitrógeno entre diferentes estados de oxidación (Rees *et al.*, 2005; Dixon y Kahn, 2004).

La capacidad de poder llevar a cabo la FBN en microorganismos como las bacterias reside en las nitrogenasas; estos complejos metaloenzimáticos están formados por las proteínas dinitrogenasa y nitrogenasa-reductasa en los que se lleva a cabo la catálisis de reducción biológica de  $N_2$  a  $NH_3$  (Dixon y Kahn, 2004) (fig. 1).



**Figura 1. Mecanismo básico de nitrogenasa (MoFe).** Se ilustra el flujo de electrones desde los acarreadores de electrones (Ferrodoxina, Fd o Flavodoxina, Fld) a la proteína Fe; en el centro: la transferencia de electrones de la proteína Fe a la proteína MoFe acoplada a la hidrólisis de ATP; (en la derecha) se muestra la reducción subsecuente de sustratos acoplada con el regreso de la proteína MoFe al estado redox (Tomado y modificado de Rees *et al.*, 2005).

Debido a la naturaleza del tripe enlace en el nitrógeno gaseoso, el proceso de reducción de N<sub>2</sub> precisa de una alta cantidad de energía; en la reacción general se consumen ocho electrones para reducir el N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub> y es requerido ATP para unirse a la dinitrogenasa-reductasa y tras su hidrólisis disminuir el potencial de reducción de la proteína. Las etapas de reducción sucesivas se realizan en el complejo nitrogenasa (Madigan *et al.*, 2015; Rees *et al.*, 2005) (fig. 2).



**Figura 2. Reducción de N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>.** Son requeridas 16 moléculas de ATP para reducir N<sub>2</sub> a 2 moléculas de NH<sub>3</sub> (Tomado y modificado de Madigan *et al.*, 2015).

La habilidad de los microorganismos de usar N<sub>2</sub> como único recurso de nitrógeno e involucrarse en simbiosis con plantas hospederas confiere muchas ventajas tanto para la planta, como para el microorganismo puesto que en la interacción simbiote-huésped la planta obtiene el nitrógeno derivado de la FBN y a cambio el simbiote obtiene fuentes de carbono en formas de ácidos dicarboxílicos. Uno de los grupos de bacterias que fijan nitrógeno es el de los Rhizobios dentro de los que se encuentran modelos ampliamente estudiados de microorganismos que se asocian en simbiosis con algunas plantas (Masson-Boivin y Sachs, 2018; Dixon y Kahn, 2004; Djordjevic, 2004).

## 2.2 Bacterias Rhizobiales fijadoras de nitrógeno

Como se mencionó anteriormente, la FBN es un proceso realizado por organismos en vida libre (bacterias de los géneros *Azotobacter*, *Beijerinckia*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Klebsiella*, entre otros) así como aquellos que pueden formar asociaciones simbióticas con otros organismos como las plantas (Garg y Renseigné, 2006).

El grupo de las bacterias rhizobiales está conformado por los géneros *Allorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Rhizobium*, de manera general son bacterias caracterizadas principalmente por establecer una relación simbiótica con plantas de la familia de las leguminosas (Fabaceae) a través nódulos en dichas plantas (Moreira, 2011; Sessitsch *et al.*, 2002).

Desde hace unos años, la interacción entre bacterias fijadoras de nitrógeno con plantas de la familia Leguminosae ha sido ampliamente estudiada por lo que existen modelos de estudio bien establecidos como el caso de *Sinorhizobium meliloti* la cual es una bacteria Gram negativa simbiote de *Medicago sativa* (alfalfa) y de *Medicago truncatula*; *Mesorhizobium loti*, un simbiote de *Lotus japonicus*, es otro caso de asociación ampliamente estudiado, así como *Rhizobium tropici* simbiote de plantas leguminosas como *Phaseolus vulgaris* (Pérez-Montaña *et al.*, 2016; Ampomah y Jensen, 2014; Jensen *et al.*, 2005) (tabla 1).

**Tabla 1. Bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de la familia Fabaceae.** Tomado y modificado de Madigan *et al.*, 2015.

Leguminosa	Bacteria
Soya ( <i>Glycine max</i> )	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> y <i>Sinorhizobium fredii</i>
Chícharo ( <i>Pisum sativum</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>
Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>R. etli</i> y <i>R. tropici</i>
Trébol ( <i>Trifolium repens</i> )	<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>
Alfalfa ( <i>Medicago sativa</i> )	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>Medicago truncatula</i>	

Particularmente, dentro del género *Rhizobium* se encuentran al menos 27 especies asociadas con interacciones simbióticas con plantas leguminosas (tabla 2) (Moreira, 2011).

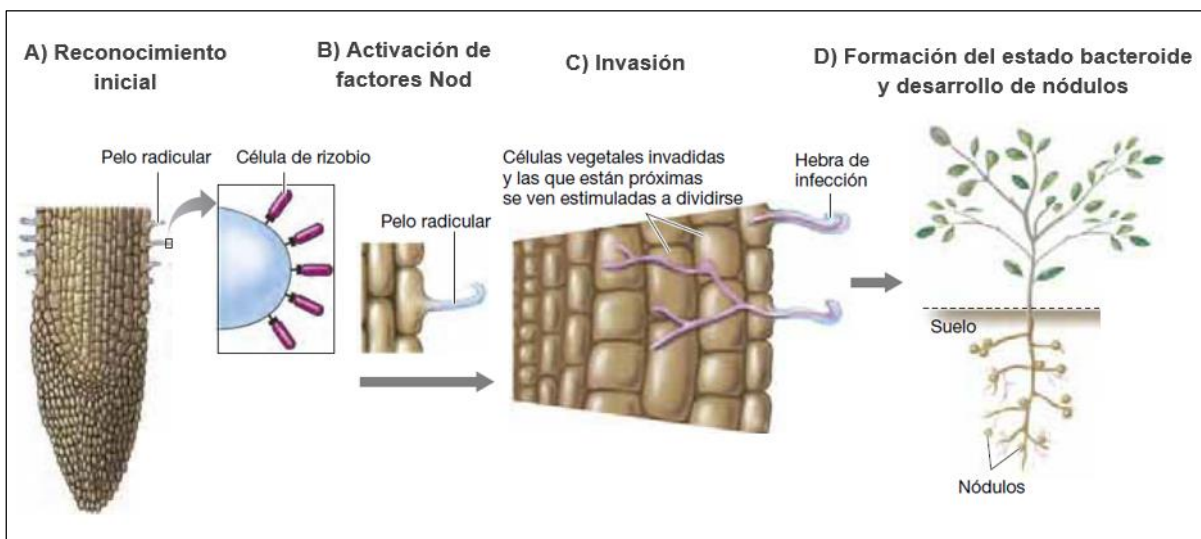
**Tabla 2. Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas pertenecientes al género *Rhizobium*.** Tomado y modificado de Moreira, 2011.

<b>α-Proteobacterias-</b>	
<b>Orden Rhizobiales;</b>	<b>Especie</b>
<b>género <i>Rhizobium</i></b>	
<b><i>Rhizobium</i></b>	<i>R. leguminosarum</i> biovars <i>phaseoli</i> , <i>trifolii</i> , <i>viceae</i>
	<i>R. galegae</i>
	<i>R. tropici</i>
	<i>R. etli</i>
	<i>R. giardinii</i> bv. <i>phaseoli</i> , <i>giardinii</i>
	<i>R. gallicum</i>
	<i>R. hainanense</i>
	<i>R. huautlense</i>
	<i>R. etli</i> bv. <i>mimosae</i>
	<i>R. yanglinense</i>
	<i>R. sullae</i>
	<i>R. indigoferae</i>
	<i>R. loessense</i>
	<i>R. daejeonense</i>
	<i>R. lusitanum</i>
	<i>R. selenireducens</i>
	<i>R. miluonense</i>
	<i>R. multihospitium</i>
	<i>R. oryzae</i>
	<i>R. pisi</i>
	<i>R. alamii</i>
	<i>R. tibeticum</i>
	<i>R. alkalisoli</i>
	<i>R. mesosinicum</i>
	<i>R. fabae</i>
	<i>R. vignae</i>
	<i>R. tubonense</i>

### 2.3 Simbiosis entre plantas leguminosas y bacterias Rhizobiales

Si bien la simbiosis entre plantas leguminosas y Rhizobios es considerada uno de los procesos ecológicos más importantes debido al aporte de nitrógeno derivado de esta, su realización requiere una serie de ajustes fisiológicos en la bacteria ya que existe evidencia que demuestra que los nódulos de fijación de nitrógeno se encuentran bajo condiciones de estrés en los tejidos de las plantas (Djordjevic, 2004).

En la figura 3 se esquematiza de manera general el proceso de la simbiosis y formación de nódulos el cual se revisa con más detalle a continuación.



**Figura 3. Esquema general de la simbiosis rhizobio-leguminosa y formación de nódulos de fijación de nitrógeno.** La asociación entre la raíz de la planta y la bacteria involucra A) una señalización química, B) activación de factores Nod, C) invasión celular y D) formación del estado bacteroide y formación de nódulos (Tomado y modificado de Madigan *et al.*, 2015).

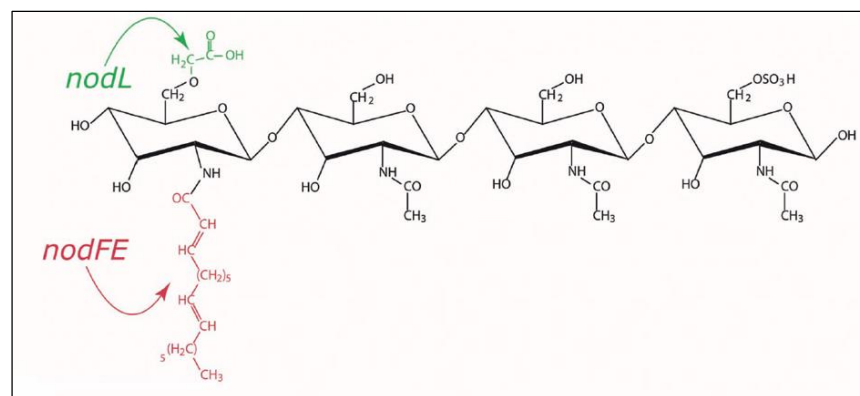
#### ***Reconocimiento inicial e infección de la planta***

Las estructuras denominadas pelos radiculares de las plantas juegan un papel importante en el reconocimiento inicial debido a que comúnmente son colonizadas por microorganismos del suelo incluyendo aquellas bacterias que fijan nitrógeno (Perret *et al.*, 2000).

La mayoría de las asociaciones simbióticas entre plantas leguminosas con bacterias Rhizobiales (de tipo mutualista) inicia cuando la bacteria produce polisacáridos de superficie que son reconocidos por receptores específicos en los pelos radiculares de las plantas (fig. 3 A) (Masson-Boivin y Sachs, 2018; Broughton *et al.*, 2000).

### **Inducción de los factores de nodulación y formación de hilos de infección**

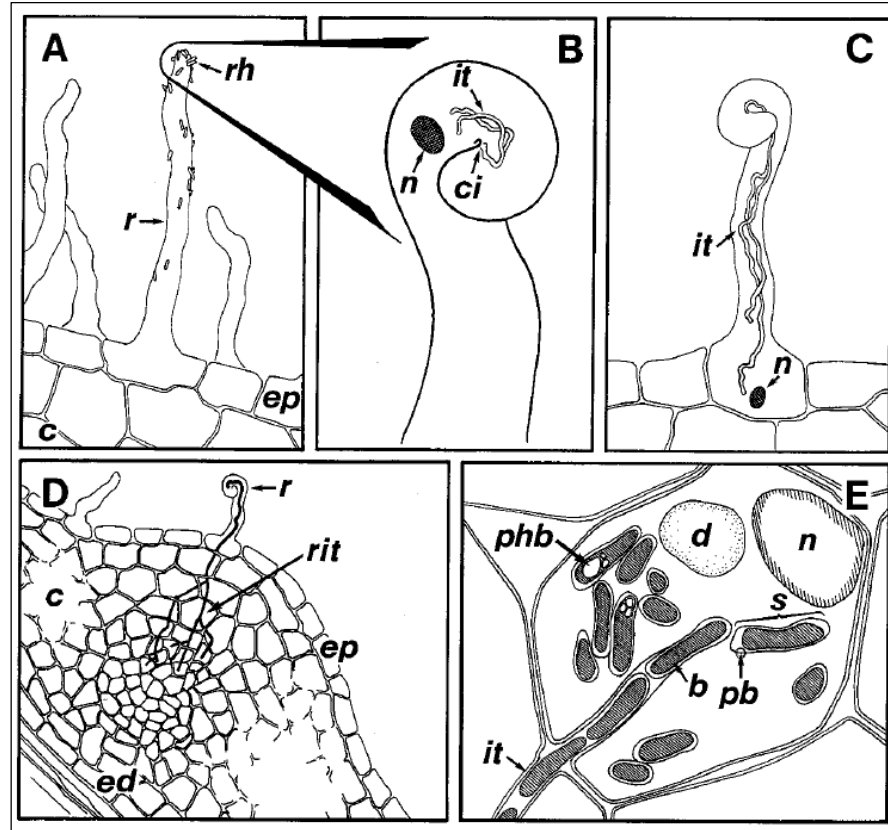
El intercambio de señales continúa cuando el rhizobio detecta ciertos compuestos como flavonoides y betaínas secretados por la planta y responde activando la expresión de un conjunto de genes denominados *nod*; este grupo de genes codifica para 25 proteínas requeridas para la síntesis y exporte de los factores Nod los cuales son señales químicas de lipooligosacáridos (fig. 4) (Gage, 2004).



**Figura 4. Representación química de un factor Nod de *S. meliloti*.** Los factores Nod son lipooligosacáridos conformados por una estructura central de quitina, 4 o 5 unidades de *N-acetilglucosamina* un lípido adjunto al extremo no reductor y modificaciones específicas del hospedero (Tomado y modificado de Gage, 2004).

Con la activación de los factores Nod se inicia una vía compleja de señal a partir de la cual se ven reflejados los siguientes cambios en el desarrollo: la deformación de la raíz en la planta, la despolarización de la membrana, oscilaciones en las concentraciones de calcio intracelular y el inicio de la división celular en la corteza de

la raíz, lo cual establece un meristemo y un primordio nodular en etapas subsecuentes (fig. 5 A y B) (Madigan *et al.*, 2015; Garg y Renseigné, 2006; Gage, 2004).



**Figura 5. Enrizamiento de pelos radiculares y formación del estado bacteroide.** (A) *Rhizobium* (*rh*) coloniza la rizosfera y se ubica en los pelos radiculares (*r*). (B) los factores Nod inducen el enrizamiento de los pelos radiculares y permiten la penetración de la bacteria al centro de la infección (*ci*); el núcleo de la planta (*n*) precede el crecimiento de los hilos de infección (*it*). (C) El hilo de infección acompañado por el núcleo alcanza la base de la célula de la raíz. (D) El hilo de infección desarrollado se ramifica (*rit*) cerca del nódulo nacido formado por células corticales en división. (E) Formación del estado bacteroide (*b*) (Tomado y modificado de Perret *et al.*, 2000).

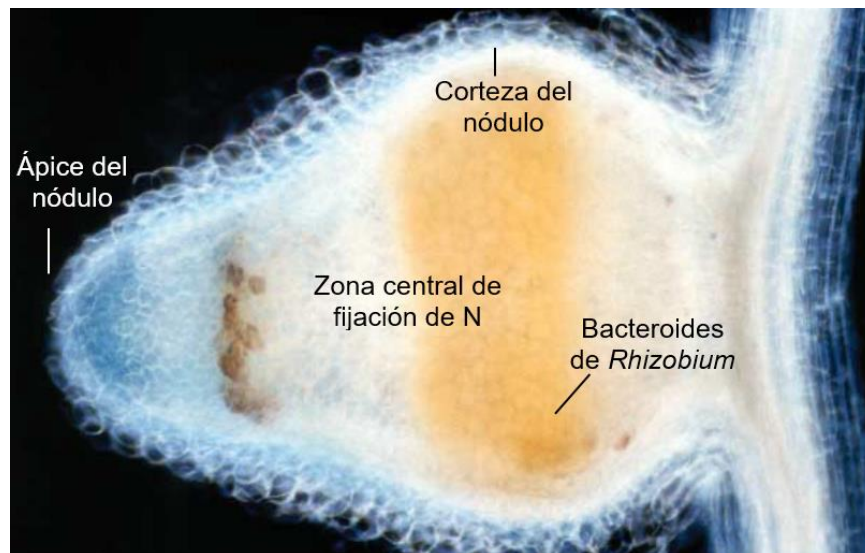
A continuación, el rhizobio se traslada desde la superficie de la raíz hasta el tejido de esta para poder multiplicarse en el primordio del nódulo; para lograrlo el rhizobio crece y se divide dentro de estructuras tubulares denominadas hebras o hilos de infección. Estos conductos se forman cuando el rhizobio queda atrapado entre dos



paredes celulares de la planta y posteriormente ocurre la invaginación de la pared celular vegetal que crece por el interior del pelo de la raíz (fig. 5 C) (Gage, 2004; Broughton *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2000).

### ***Desarrollo de los primordios nodulares***

Dentro de los hilos infectivos la bacteria continúa propagándose hacia el interior de la raíz de manera que los hilos de infección continúan desarrollándose y se ramifican cerca del nódulo naciente formado por células corticales en división (fig. 5 D); las bacterias internalizadas en los hilos infectivos eventualmente salen para situarse en las células del nódulo; una vez dentro, la bacteria continúa diferenciándose e inicia la síntesis de las proteínas requeridas para la fijación biológica de nitrógeno y para el mantenimiento de la asociación mutualista (fig. 5 E) (fig. 6) (Garg y Renseigné, 2006; Broughton *et al.*, 2000; Gage, 2004).



**Figura 6. Nódulo de fijación de nitrógeno formado por *Rhizobium*.** Se muestra la estructura de un nódulo en donde se realiza la FBN (Tomado y modificado de Dixon y Kahn, 2004).

Dentro de los modelos de estudio de la asociación simbiótica rizobio-leguminosa encontramos el caso de *R. etli* CFN 42 reconocida por ser el simbiote de la planta de frijol *P. vulgaris*; esta es una bacteria aerobia Gram negativa cuyo genoma consta de 6.53 Mb distribuidos en un cromosoma (4.38 Mb) y seis plásmidos denominados a, b, c, d, e y f (Sessitsch *et al.*, 2002; González *et al.*, 2006).

## **2.4 Factores que limitan la producción de alimentos derivados de cultivos**

### ***Disponibilidad de Nitrógeno***

La disponibilidad de nitrógeno en el suelo es a menudo el factor limitante para la productividad del cultivo, haciendo demanda a la agricultura global para proporcionar seguridad alimentaria a medida que aumenta la población mundial en el siglo XXI. Aunado a ello, uno de los factores que amenazan a la agricultura actual es el aumento en la utilización de fertilizantes químicos, los cuales constituyen una importante interferencia en el ciclo del nitrógeno y que aumenta seriamente las emisiones de óxidos de nitrógeno, la acidificación de los suelos y la eutricación del agua (Dixon y Kahn, 2004).

### ***Estrés abiótico en plantas***

Dentro de la agricultura global actual, uno de los factores que limitan el adecuado crecimiento y rendimiento de cultivos son las condiciones ambientales como la salinidad, el estrés por sequía y temperaturas extremas provocando la deshidratación de los tejidos de las plantas, daño celular y eventualmente la muerte del cultivo. La alta salinidad de los suelos es uno de los factores que principalmente limita la productividad de cultivos como el frijol debido a que afecta el crecimiento y desarrollo de la planta y por ende la capacidad de fijación de nitrógeno. El estrés por sequía es uno de los factores ambientales principales que afectan mayormente la germinación

y rendimiento de cultivos provocando una limitación en la producción de granos a nivel mundial (Bartels y Sunkar, 2005).

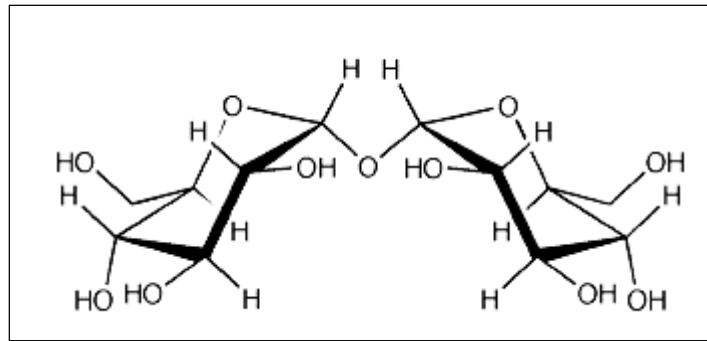
## **2.5 Mecanismos de defensa**

En respuesta ante los factores abióticos que afectan los suelos, es importante señalar que los organismos vulnerables como las plantas han desarrollado estrategias fisiológicas para hacer frente a estos tipos de estrés; algunas de estas son: el transporte de iones, la compartimentalización celular y la síntesis y acumulación de solutos compatibles u osmolitos; estos últimos pueden provenir de manera exógena (absorción de elementos del ambiente) o endógena (a través de biosíntesis *de novo*) tal como ocurre en organismos anhidrobióticos como *S. lepidophylla* (capaz de tolerar estados prolongados de deshidratación) (McIntyre *et al.*, 2007; Shamseldin *et al.*, 2006; Bartels y Sunkar, 2005; Clegg, 2001).

La principal característica común entre organismos anhidrobióticos para adaptarse al estrés es su capacidad de sintetizar y acumular cantidades importantes de un disacárido conocido como trehalosa; a partir de ello, la comprensión de la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés como sequía y salinidad es un tópico de investigación fundamental (Bartels y Sunkar, 2005; Elbein *et al.*, 2003).

## **2.6 Trehalosa**

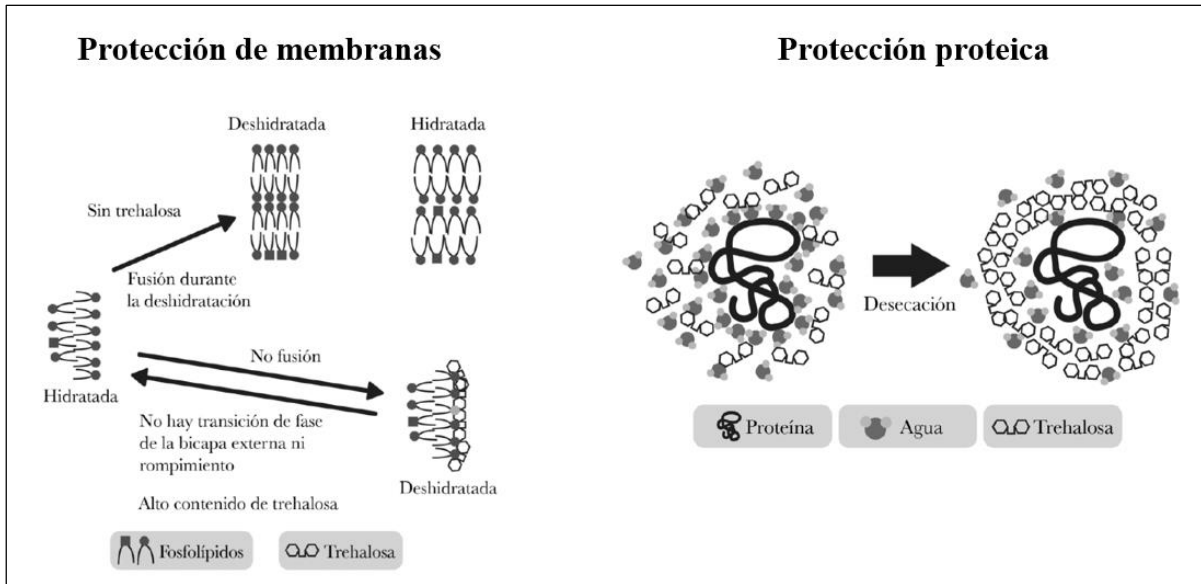
La trehalosa ( $\alpha$ -D-glucopiranosil-[1,1]- $\alpha$ -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor encontrado en bacterias, hongos, invertebrados y plantas. Su estructura química está constituida por dos moléculas de glucosa que se unen a través de carbonos anoméricos por un enlace glicosídico  $\alpha,\alpha$ -1,1 (fig. 7) (Elbein *et al.*, 2003).



**Figura 7. Estructura química de la trehalosa.** La trehalosa está formada por dos moléculas de glucosa unidas a través de carbonos anoméricos (Tomado de Elbein *et al.*, 2003).

Las funciones de este disacárido van desde ser una fuente de energía a participar en la protección ante el estrés abiótico; en organismos como plantas y hongos, este disacárido tiene funciones de protección proteica y de membranas celulares durante la desnaturalización provocada por una variedad de condiciones de estrés, como desecación, deshidratación, calor, frío y oxidación; para el caso de microorganismos, la trehalosa actúa como un importante recurso de energía durante ciertos estados del desarrollo así como en la respuesta al estrés osmótico, térmico y por desecación (Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009; McIntyre *et al.*, 2007; Cytryn *et al.*, 2007; Elbein *et al.*, 2003).

La trehalosa tiene la capacidad de proteger las membranas celulares durante estados de deshidratación al interactuar con estas favoreciendo la permanencia del estado fluido de los lípidos evitando así la fusión, separación de fases y ruptura de membranas; en cuanto a su función de protección proteica, gracias a su estructura química este disacárido interactúa con moléculas de agua formando una cápsula de protección alrededor de la proteína manteniendo su estructura y función (fig. 8) (Suárez *et al.*, 2015; Crowe *et al.*, 2001).



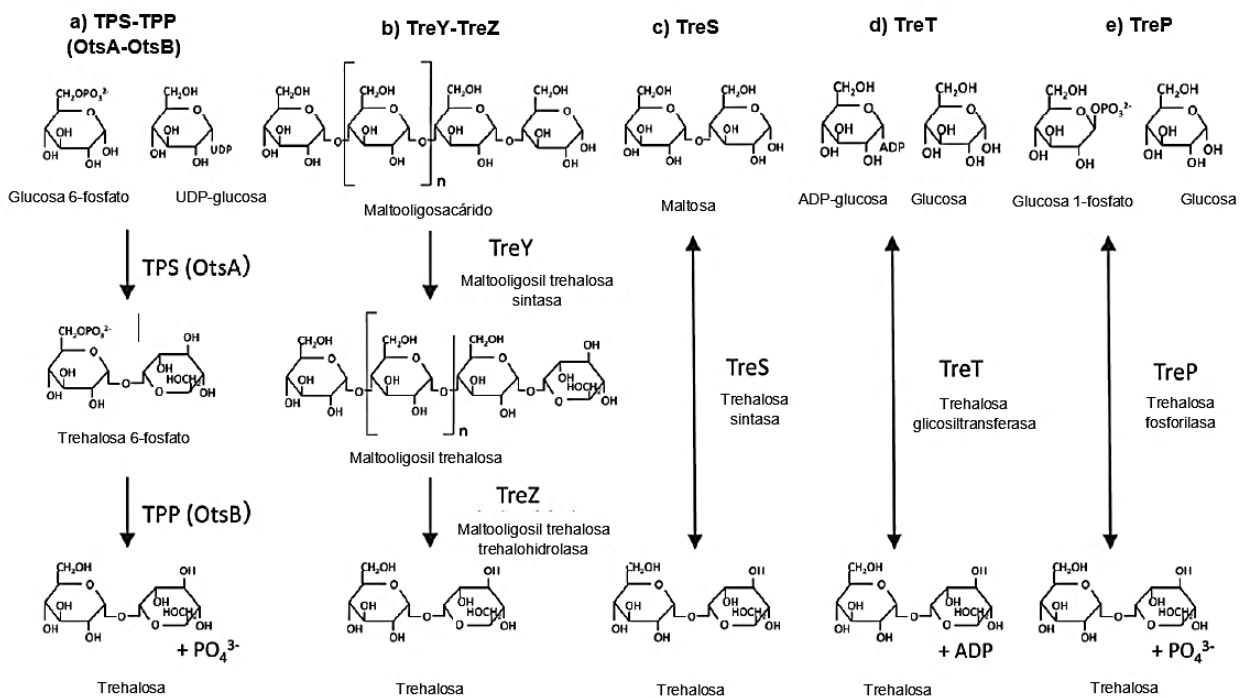
**Figura 8. Funciones de la trehalosa como protector de membranas y proteínas.** Debido a su naturaleza química la trehalosa puede interactuar con la membrana celular evitando su ruptura y forma cápsulas de protección alrededor de proteínas (Tomado y modificado de Suárez *et al.*, 2015).

Al ser un importante recurso frente al estrés abiótico, se ha determinado que el metabolismo de este disacárido es clave en aspectos del crecimiento, rendimiento y adaptación de las plantas al estrés abiótico, tal como ocurre con la planta *S. lepidophylla* en la que la trehalosa se acumula en altas cantidades para hacer frente a estados prolongados de deshidratación (Shanker y Venkateswarlu, 2011; Suárez *et al.*, 2008; Clegg, 2001); es por ello que se ha documentado que la síntesis de trehalosa se da en respuesta a condiciones de estrés como calor, sequía y estrés oxidativo; en la interacción entre un rhizobio y una planta hospedera debido a que existe un estado de estrés para la bacteria, se ha evidenciado cantidades importantes de trehalosa en nódulos de fijación de nitrógeno a partir de la simbiosis entre bacterias Rhizobiales y plantas leguminosas (Müller *et al.*, 2001; Streeter, 1985).

Actualmente se conocen cinco vías de síntesis de trehalosa distribuidas en organismos como plantas, hongos y bacterias (Shanker y Venkateswarlu, 2011; Elbein *et al.*, 2003).

## 2.7 Vías de síntesis de trehalosa en Rhizobia

Las principales vías de síntesis de este disacárido se han descrito en organismos como bacterias, hongos y plantas; en bacterias del orden Rhizobiales existen tres vías de síntesis de trehalosa. Dichas rutas de síntesis principalmente involucran vías de síntesis en dos pasos tal como la vía TPS-TPP (en bacterias se conoce como OtsA-OtsB) (Shanker y Venkateswarlu, 2011) (fig. 9).



**Figura 9. Vías de síntesis de trehalosa.** Se ilustran las cinco rutas de síntesis de trehalosa distribuidas en organismos como plantas, hongos y bacterias; en Rhizobios solo están presentes las vías OtsA-OtsB, TreY-TreZ y TreS. (Tomado y modificado de Shanker y Venkateswarlu, 2011).

### Vía TPS-TPP (OtsA-OtsB)

La vía TPS-TPP (OtsA-OtsB) es considerada la principal vía de síntesis de trehalosa e involucra un proceso en dos pasos; la primera reacción en esta vía es catalizada por la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS u OtsA) la cual cataliza la síntesis del intermediario trehalosa 6-fosfato a partir de glucosa 6-fosfato y Uridina Difosfato

(UDP-Glucosa); posteriormente la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP, u OtsB) cataliza la desfosforilación de trehalosa 6-fosfato a trehalosa (fig. 9a) (Shanker y Venkateswarlu, 2011).

### **Vía TreY-TreZ**

Comprende una vía de dos pasos, la cual involucra la conversión de maltodextrinas (maltooligosacáridos, glucógeno y almidón) a trehalosa. En el primer paso, la enzima Maltooligosil trehalosa sintasa (TreY) cataliza la conversión de maltopentosa a Maltooligosil trehalosa a través de una reacción molecular de transglicosilación; en el segundo paso la enzima Maltooligosil trehalohidrolasa (TreZ) cataliza la hidrólisis del Maltooligosil trehalosa liberando trehalosa. Esta ruta ha sido descrita tanto en *Rhizobium* como en *Bradyrhizobium japonicum* (fig. 9b) (Shanker y Venkateswarlu, 2011; Maruta *et al.*, 1995).

### **Vía Trehalosa sintasa (TreS)**

La vía denominada TreS involucra una reacción de transglicosilación reversible en la cual la enzima trehalosa sintasa o TreS convierte la maltosa (un disacárido con conexión  $\alpha,\alpha$ -1,4 entre sus dos moléculas de glucosa) a trehalosa; debido a la capacidad de catálisis reversible de esta enzima la ruta TreS se ha descrito por contribuir en la síntesis de trehalosa durante el estrés osmótico en *Pseudomonas syringae* (fig. 9c) (Shanker y Venkateswarlu, 2011; Freeman *et al.*, 2010).

### **Vías TreT y TreP**

La vía TreT involucra la formación reversible de trehalosa a partir de ADP-glucosa y glucosa (fig. 9d); en la vía de síntesis TreP la enzima trehalosa fosforilasa cataliza la reacción reversible que convierte glucosa-1-fosfato (G1P) y glucosa a trehalosa (fig. 9e) (Paul *et al.*, 2008; Qu *et al.*, 2004).

## 2.8 Vías de degradación de trehalosa

En cuanto al catabolismo de este disacárido, se conocen algunas vías de degradación de trehalosa para microorganismos: una de las rutas más comunes de degradación involucra la participación de enzimas denominadas trehalasas ( $\alpha,\alpha,1,1$ -glucosil hidrolasa) la cual cataliza la hidrólisis de trehalosa a dos moléculas de glucosa; de acuerdo a la base de datos Carbohydrate-Active enZyme (Cazy <http://www.cazy.org>) existen dos familias de enzimas trehalasa: Glicosido hidrolasas 37 y 15 (GH37 y GH15). Dicha clasificación está basada en la presencia de distintos dominios catalíticos (Sakaguchi, 2020; Boss *et al.*, 1987).

En otra de las vías catabólicas, la trehalosa es transportada a través de membranas ya sea por una permeasa o por un sistema de fototransferasa (PTS), una vía en la que la trehalosa puede no sufrir modificaciones o ser fosforilada como trehalosa 6-fosfato (T6P) dentro de la célula; al exterior de la célula la trehalosa o T6P es degradada por acción de trehalasas, T6P-hidrolasas, fosfo-(1-1)-glucosidasas o fosfotrehalasas (Jensen *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2001).

Otra de las vías también involucra la participación del sistema PTS en la que la trehalosa es modificada a T6P; a continuación, la enzima trehalosa-6-fosfato fosforilasa, fosforila T6P obteniendo como producto  $\beta$ -glucosa-1-fosfato y glucosa-6-fosfato; debido a que en bacterias Rhizobiales no existe la presencia de un sistema PTS completo se considera que en estos organismos la vía de degradación de trehalosa es por acción de enzimas con actividad de trehalasa (Ampomah *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2005; Andersson *et al.*, 2001).

## 2.9 Genes de biosíntesis y degradación de trehalosa en *R. etli* CFN 42

Como se mencionó anteriormente, en *R. etli* las vías de síntesis de trehalosa son OtsA-OtsB, TreY-TreZ y TreS; la vía de absorción y degradación de este disacárido involucra la participación de enzimas ThuEFGK y ThuAB, respectivamente (Jensen *et al.*, 2005). En la tabla 3 se enlistan los genes del metabolismo de trehalosa en *R. etli* CFN 42.



**Tabla 3. Enzimas que participan en el metabolismo del disacárido trehalosa en *R. etli* CFN 42.**

Gen	Proteína	Cromosoma	Plásmido a	Plásmido c	Plásmido e	Plásmido f
Síntesis de trehalosa						
<i>otsA</i>	Trehalosa 6-fosfato sintasa	RHE_CH00476	RHE_PA00087			
<i>otsB</i>	Trehalosa 6-fosfato fosfatasa			RHE_PC00228		
<i>treS</i>	Trehalosa sintasa	RHE_CH02260				RHE_PF00276
<i>treZ</i>	Maltooligosil-trehalosa trehalohidrolasa	RHE_CH03279				RHE_PF00263
<i>treY</i>	Maltooligosil-trehalosa sintasa				RHE_PE000008	
Absorción de trehalosa/maltosa						
<i>thuE</i>	Transportador ABC, proteína de unión a azúcar					RHE_PF00210
<i>thuF</i>	Transportador ABC, proteína permeasa					RHE_PF00209
<i>thuG</i>	Transportador ABC, proteína permeasa					RHE_PF00208
<i>thuK</i>	Transportador ABC, proteína de unión a ATP					RHE_PF00207
Degradación de trehalosa						
<i>thuA</i>		RHE_CH03256				RHE_PF00206
<i>thuB</i>		RHE_CH03255				RHE_PF00205

Tabla 3. Tomado y modificado de Reina-Bueno *et al.*, 2012.

### ***otsA* y *otsB***

En *R. etli* se encuentran dos genes *otsA*, uno en el cromosoma y uno más en el plásmido a. Este gen codifica para la proteína trehalosa 6-fosfato sintasa (OtsA); el gen *otsA* del cromosoma consta de 1407 pb y la proteína para la que codifica es de 468 aa; el gen en el plásmido a consta de 1479 pb y la proteína para la que codifica es de 492 aa. El gen *otsB* está ubicado en el plásmido c y codifica para la enzima trehalosa 6-fosfato fosfatasa (OtsB); su secuencia génica consta de 723 pb y la proteína es de 240 aa (KEGG, 2020).

### ***treY* y *treZ***

En *R. etli* el gen *treY* está ubicado en el plásmido e y codifica para la proteína maltooligosil trehalosa sintasa (TreY); su secuencia génica consta de 2604 pb y la proteína para la que codifica es de 867 aa. El gen *treZ* codifica para la proteína maltooligosil trehalo hidrolasa o TreZ; la secuencia de este gen ubicada en el plásmido f consta de 1794 nt, la secuencia en aminoácidos es de 597 (KEGG, 2020).

### ***treS***

*R. etli* CFN 42 cuenta con dos copias del gen *treS*, el cual codifica para la proteína trehalosa sintasa o TreS; la secuencia ubicada en el cromosoma consta de 1662 nt y la proteína para la que codifica consta de 553 aa. La otra copia está ubicada en el plásmido f, cuya secuencia de nucleótidos es de 3282 nt y su secuencia de aa es de 1093 (KEGG, 2020).

### **Sistema de absorción (ThuEFGK) y degradación (ThuAB) de trehalosa**

*R. etli* CFN 42 cuenta con un operón involucrado en la absorción de trehalosa y maltosa, ubicado en el cromosoma (*aglEFGK*) y otro más ubicado en el plásmido f (*thuEFGK*) cuya función está implicada en el transporte de trehalosa. Adyacente a este grupo, se ubican los genes *thuAB* los cuales participan en la vía principal de degradación de trehalosa en esta bacteria. Una copia de los genes *thuAB* se encuentra ubicada también en el cromosoma. *thuA* codifica para la proteína de utilización de trehalosa-maltosa, *thuB* codifica para la proteína mio-inositol 2-deshidrogenasa de ~346 aa (KEGG, 2020).

## **2.10 Regulación de la expresión génica en bacterias**

La regulación de la expresión de genes en particular en bacterias, juega un papel muy importante pues permite a estos microorganismos ajustar su maquinaria

enzimática, así como los componentes estructurales en respuesta al cambio nutricional y al ambiente físico. La decisión de transcribir o no el gen que codifica para una determinada proteína es el principal mecanismo para controlar la producción de una determinada proteína. La importancia de lo anterior es que a través del control de la transcripción una célula puede regular qué proteínas producir y a qué velocidad. En la mayoría de las bacterias la expresión génica está altamente regulada de acuerdo con el ajuste entre la maquinaria enzimática y componentes estructurales con cambios en los nutrientes y el ambiente físico. El inicio de la transcripción es el paso más importante en la regulación de la expresión génica y en esta intervienen elementos como los factores de transcripción y los reguladores (Campbell *et al.*, 2008; Wosten, 1998).

### **2.11 Factores de transcripción en *R. etli***

Los factores de transcripción son enzimas con dominios catalíticos de reconocimiento de secuencias específicas del DNA. Su función es determinar el inicio de la transcripción y de manera general, en bacterias existen dos clases: principales y de mantenimiento (del inglés *housekeeping*) también conocido como factor sigma 70 ( $\sigma^{70}$ ), el cual controla la expresión de la mayoría de los genes; otros factores de transcripción conocidos son sigma S, H, E, F, Fecl y N; la mayoría de las bacterias sintetizan diferentes factores  $\sigma$ , los cuales dirigen la holoenzima RNA polimerasa a distintas clases de promotores con diversas secuencias consenso (tabla 4). Esta variedad en factores sigma proporciona a la bacteria la oportunidad de mantener la expresión de genes basales, así como la regulación de la expresión de genes en respuesta a estímulos ambientales específicos (Lonetto *et al.*, 1992; Wosten, 1998).

Se ha terminado que en *E. coli* y *Bacillus subtilis* el factor  $\sigma^{70}$  reconoce dos tipos de secuencias promotoras: una vía canónica que consiste en dos secuencias de hexámeros (TTGACA y TATAAT) ubicadas respectivamente en las posiciones -10 y -35 relativas al inicio de la transcripción y otra denominada secuencia -10 extendida

que consiste en un elemento TATAAT más dos nucleótidos TG localizada en las posiciones -15 y -14 (tabla 4) (Kumar *et al.*, 1993; Harley y Reynolds, 1987).

**Tabla 4. Factores  $\sigma$  de *E. coli*.**

Factor $\sigma$	Promotores reconocidos	Promotor consenso	
		Región -35	Región -10
$\sigma^{70}$ ( $\sigma^D$ )	Genes "housekeeping"; mayoría de genes de células en replicación	TTGACA	TATAAT
$\sigma^S$ ( $\sigma^{38}$ )	Genes de fase estacionaria y respuesta a el estrés	TTGACA	TATAAT
$\sigma^{32}$ ( $\sigma^H$ )	Inducidos por proteínas desplegadas en el citoplasma; genes que codifican para chaperonas que repliegan proteínas desplegadas y sistemas de proteasas	TCTCNCCTTGAA	CCCCATNTA
$\sigma^E$ ( $\sigma^{24}$ )	Activados por proteínas desplegadas en el espacio periplásmico y la membrana celular; genes que codifican proteínas que restauran la integridad del desarrollo celular	GAAGTT	TCTGA
$\sigma^F$ ( $\sigma^{24}$ )	Genes involucrados en el ensamble del flagelo	CTAAA	CCGATAT
Fecl ( $\sigma^{18}$ )	Genes necesarios para la absorción de hierro	TTGGAAA	GTAATG
		<b>Región -24</b>	<b>Región -12</b>
$\sigma^{54}$ ( $\sigma^N$ )	Genes para el metabolismo del nitrógeno y otras funciones	CTGGNA	TTGCA

Tabla 4. Tomado de Gruber y Gross, 2003.

Como previamente se había indicado, el genoma de *R. etli* CFN 42 ha sido completamente secuenciado por lo que se ha determinado que contiene los siguientes factores sigma: un gen *rpoD* "housekeeping"  $\sigma^{70}$ , dos copias del factor *rpoN*  $\sigma^{54}$  (responsables de la simbiosis y asimilación de nitrógeno), dos copias del gen *rpoH*  $\sigma^{32}$  (estrés oxidativo y por temperaturas), y 18 genes de un grupo de factores extracitoplasmicos (González *et al.*, 2006).

## 2.12 Antecedentes directos

Hasta hace unos años el estudio de la trehalosa como mecanismos de defensa en respuesta al estrés se enfocaba principalmente en bacterias en vida libre por lo que a partir de entonces se inició con una investigación más detallada sobre la participación de este azúcar en la interacción planta-bacteria (Jensen *et al.*, 2005).

La trehalosa ha sido ampliamente encontrada como el principal soluto compatible en casi cualquier rhizobio descrito a la fecha; su acumulación se ha detectado en bacterias en vida libre, bacteroides y nódulos de fijación de nitrógeno y su acumulación en bacterias se ve influenciada por factores como el tipo de estrés, la especie rhizobial y el genotipo hospedero (Reina-Bueno *et al.*, 2012; Welsh, 1999).

En cuanto al tipo de estrés, en *S. meliloti* y *B. japonicum* la vía OtsA-OtsB ha sido descrita por tener un rol importante en la acumulación de trehalosa bajo estrés osmótico y ser la principal ruta de osmoadaptación; tanto en *B. japonicum* como *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, esta vía participa en el estrés por desecación; en *B. japonicum* la acumulación de trehalosa está relacionada con el desarrollo de nódulos de fijación de nitrógeno; no obstante, en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y *S. meliloti* la acumulación de trehalosa determina la competitividad por la nodulación (Reina-Bueno *et al.*, 2012; Domínguez-Ferreras *et al.*, 2009; McIntyre *et al.*, 2007; Cytryn *et al.*, 2007).

Previamente se demostró que la expresión de los genes *otsA* y *treY* se da de manera constitutiva en *R. leguminosarum* bv. *trifolii* contra el estrés por desecación. En *R. etli* CE3 se demostró que la sobreexpresión de la vía OtsA-OtsB provocaba un aumento en la concentración intracelular de trehalosa evidenciando además una mayor tolerancia al estrés osmótico en vida libre. Posteriormente, al inocular plantas de frijol con esta cepa se obtuvo una mayor nodulación, fijación de nitrógeno y una mayor tolerancia al estrés hídrico. En esta misma bacteria se demostró también que la trehalosa tiene un papel importante en la termoprotección y estrés por desecación (Reina-Bueno *et al.*, 2012; Suárez *et al.*, 2008; McIntyre *et al.*, 2007).

En *S. meliloti* se demostró que los genes *thuAB* participan en la vía principal del catabolismo de la trehalosa; para entonces se había evidenciado que la proteína ThuA mostraba homología con proteínas de función desconocida en *Mesorhizobium loti*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Brucella melitensis*. También determinaron que estos genes son expresados en las etapas de infección y formación de hilos infectivos en la simbiosis rizobio-leguminosa y que su delección aumentaba la colonización de raíces de *M. sativa* (Jensen *et al.*, 2005).

Posteriormente, en un trabajo publicado en el 2008 estos mismos investigadores determinaron el papel del genotipo hospedero sobre la competitividad de colonización de raíces. Realizando mutagénesis de ambos genes en *S. meliloti* y *S. medicae* observaron diferencias en la formación de nódulos y colonización de raíces de alfalfa por lo que concluyeron que la importancia de ser efectiva la colonización de las raíces radica en la habilidad de manejar adecuadamente el estrés que pueden sufrir las bacterias durante las etapas iniciales de una asociación simbiótica rizobio-leguminosa (Ampomah *et al.*, 2008).

Más tarde en un trabajo en el que mutaron un ortólogo de *thuA* en *M. loti*, determinaron que en este rizobio el gen no es expresado durante las etapas de infección y colonización de las raíces a diferencia de lo que observaron en su trabajo inicial con *S. meliloti* (Ampomah y Jensen 2014).

En un análisis generalizado sobre la presencia de los genes *thuAB* en concreto del posible operón *thuEFGKAB* se demostró que algunas bacterias Rhizobiales y *Agrobacterium* poseen la batería de genes en orden similar, aunque en algunas de ellas están ausentes los genes *thuEFGK*; reportaron además, que las funciones de este operón se centran en el transporte y asimilación del maltitol e isómeros de sacarosa; a partir de estudios bioquímicos determinaron también que las funciones de los genes *thuAB* son similares en *S. meliloti*, *M. loti* y *A. tumefaciens* (Ampomah *et al.*, 2013); finalmente, en un análisis del transcriptoma de *R. tropici* CIAT 899 se demostró una sobre expresión de los genes *thuAB* al ser inducidos bajo condiciones de estrés salino indicando una posible estrategia que emplea esta cepa para

sobreponerse al estrés abiótico activando la vía de degradación de trehalosa (Pérez-Montaña *et al.*, 2016).

Sobre la influencia del genotipo hospedero en la interacción rizobio-leguminosa, recientemente se elaboró un estudio sobre el transcriptoma de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en interacción con plantas de chícharo y lenteja; en este trabajo se observó que existe una respuesta diferencial específica con el hospedero la cual afecta proteínas de bacteroides entre las que destacan proteínas de respuesta a estrés, reguladores transcripcionales y proteínas del metabolismo del nitrógeno y carbono; uno de los genes que mostró expresión diferencial fue *otsA* (Durán *et al.*, 2021).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El consumo de frijol es clave en la alimentación de las sociedades actuales por lo que el mejoramiento de cultivo a partir de herramientas de biotecnología surge como una oportunidad alternativa y amigable con el ambiente; en este sentido, el estudio metabólico del disacárido trehalosa representa un campo de análisis bastante interesante para resolver aspectos de la respuesta al estrés abiótico en organismos como plantas o bacterias rizobiales.

Debido a que se ha demostrado que los genes de síntesis de trehalosa en bacterias rizobiales como *S. meliloti*, *B japonicum*, *R. leguminosarum* y *R. etli* desempeñan un papel importante en la tolerancia al estrés osmótico, por sequía y desecación, así como los genes de degradación de trehalosa son importantes en la colonización de la raíz y nodulación, en el presente estudio consideramos analizar el patrón de expresión de las vías de síntesis y degradación de trehalosa en *R. etli* en vida libre y en interacción con frijol bajo condiciones de estrés y en simbiosis con frijol de manera que sea posible una visualización general sobre el metabolismo de este disacárido.

### 4. HIPÓTESIS

La expresión de los genes que participan en la síntesis y degradación de trehalosa está activa durante condiciones de estrés osmótico y térmico, así como en las etapas de simbiosis *P. vulgaris-R. etli*.



## 5. OBJETIVOS

### 5.1 General

- Analizar la expresión de los genes de biosíntesis y degradación del disacárido trehalosa de *R. etli* en vida libre y en simbiosis con *P. vulgaris*.

### 5.2 Específicos

- Determinar por métodos bioinformáticos si los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa de *R. etli* CFN 42 están regulados por factores de transcripción de respuesta al estrés a través de un análisis de las secuencias promotoras.
- Realizar un análisis filogenético de los genes del metabolismo de trehalosa para conocer su distribución dentro y fuera del grupo de bacterias Rhizobiales.
- Evaluar la expresión de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa de *R. etli* en vida libre bajo condiciones de estrés osmótico, térmico y en presencia de trehalosa.
- Analizar la expresión de genes de biosíntesis y degradación de trehalosa de *R. etli* durante las etapas de simbiosis leguminosa-rhizobio.

## 6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La realización del presente trabajo se basó en la estrategia experimental mostrada en la figura 10.

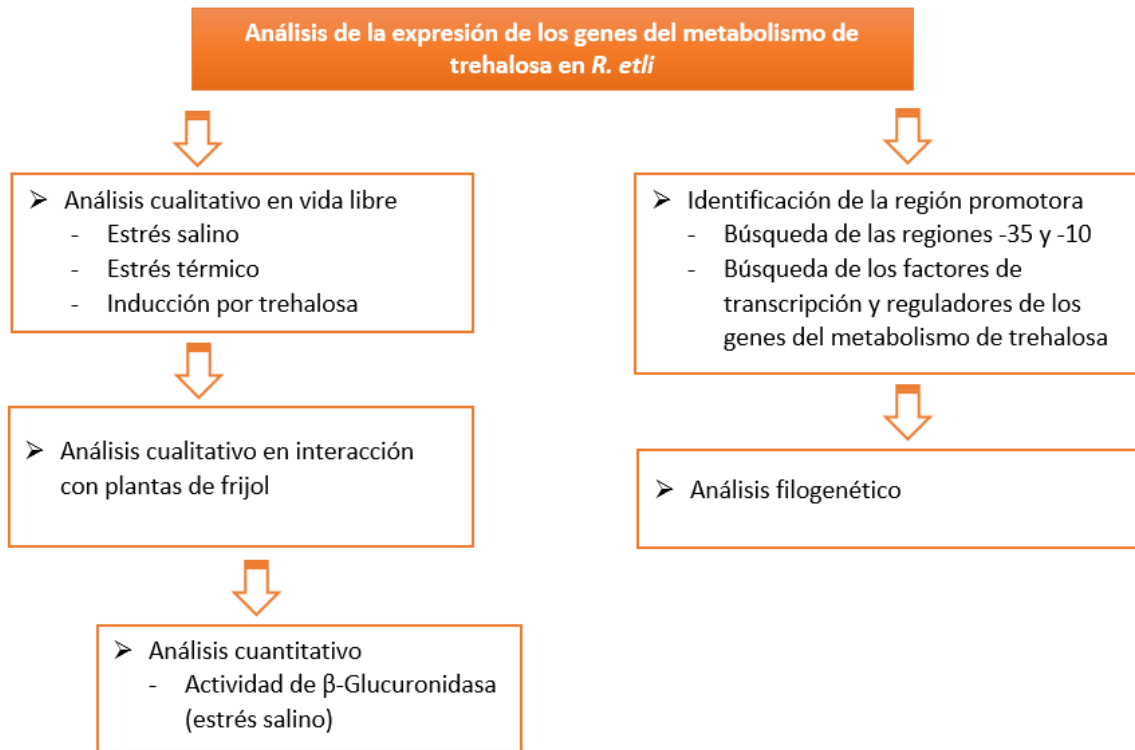


Figura 10. Diagrama del diseño experimental.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material biológico, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

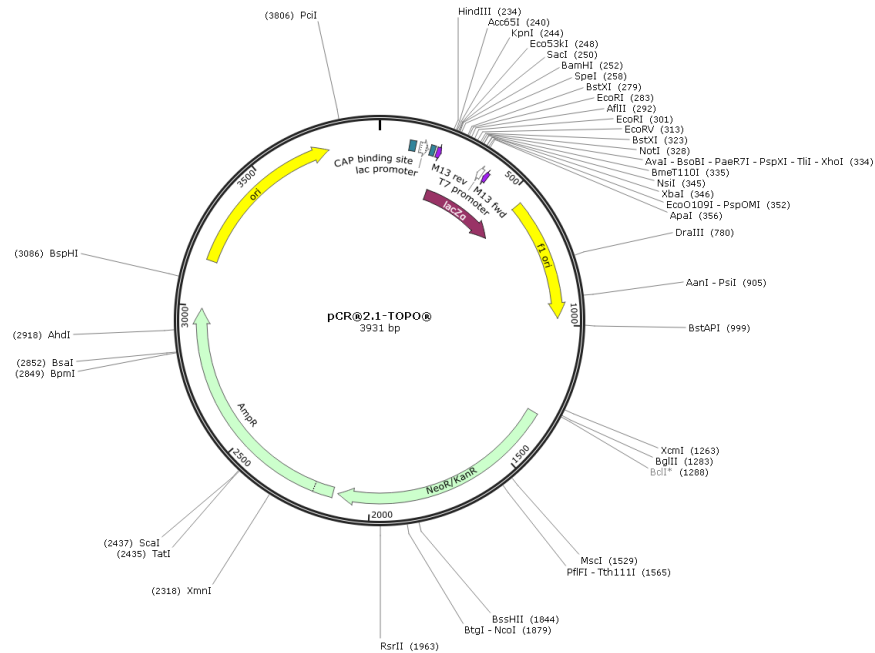
Para todos los ensayos fue empleado como cepa silvestre (WT) a *R. etli* CFN 42; se utilizaron semillas de plantas de *P. vulgaris* var. Negro Jamapa para los ensayos de nodulación en plantas de frijol. Se emplearon además cepas de *R. etli* que albergan la secuencia promotora de los genes *otsAch*, *otsApa*, *treY*, *treZ*, *treSch*, *treSpf* y *thuApf* fusionada al gen reportero GUS. *R. etli* fue crecida en medio Peptona Extracto de levadura adicionado con Calcio (PYCa) a 28°C y Medio Mínimo M9 suplementado con ácido succínico como fuente de carbono y trehalosa para un ensayo. *E. coli* fue crecida en medio Luria Bertani (LB) a 37°C. Se emplearon los siguientes antibióticos según fue el caso: ácido nalidíxico (20 µg/ml), gentamicina (20 µg /ml) y kanamicina (50 µg /ml).

Para la construcción de las fusiones transcripcionales en el siguiente trabajo se emplearon las cepas de *E. coli* TOP10f (para la transformación de las clonas con los promotores) y DH5α (para la transformación del plásmido pCMJD), además de los plásmidos pCR2.1-TOPO y pCMJD.

### 7.2 Plásmidos

#### pCR2.1-TOPO (Invitrogen)

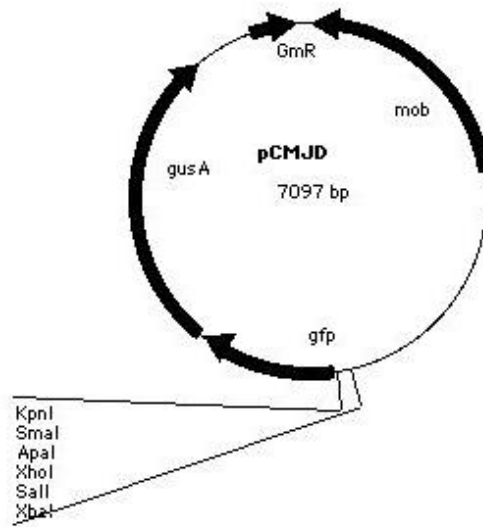
Es un plásmido utilizado en la clonación de fragmentos de DNA amplificados por PCR; permite la expresión bacteriana del fragmento *lacZ* para la α-complementación (fig. 11).



**Figura 11. Mapa del vector pCR2.1-TOPO.** Diseñado para clonar fragmentos de DNA amplificados por PCR; contiene un gen de resistencia a kanamicina y un gen de resistencia a ampicilina, codifica para la  $\beta$ -Galactosidasa.

## pCMJD

El plásmido pCMJD cuenta con la fusión transcripcional de los genes que codifican para las enzimas  $\beta$ -Glucuronidasa (GUS) y proteína verde fluorescente (GFP, *del inglés Green Fluorescent Protein*), un polilinker que contiene los sitios de reconocimiento para las enzimas *XhoI* y *Sall* y un casete de resistencia a gentamicina; dicho vector fue utilizado para el clonado de los promotores para la construcción de la fusión promotor-GUS mediante la subclonación de estos (fig. 12) (Metcalf y Wanner, 1993).



**Figura 12. Mapa del vector pCMJD.** Cuenta con la fusión transcripcional de los genes que codifican para las enzimas  $\beta$ -Glucuronidasa y proteína verde fluorescente.

### 7.3 Análisis bioinformático de las posibles regiones promotoras de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa en *R. etli* CFN 42

Con el objetivo de determinar si la región promotora de los genes *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*, *treS* y *thuApf* está regulada por factores de transcripción conocidos de respuesta a estrés, realizamos el análisis de las secuencias intergénicas de dichos genes para la identificación de su región promotora y de los posibles factores de transcripción y reguladores de los genes.

Las secuencias de nucleótidos fueron obtenidas de la base de datos KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) y GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)). Posteriormente las secuencias fueron analizadas usando los siguientes programas:

- BacPP (Bacterial Promoter Prediction) (<http://www.bacpp.bioinfocps.com/home>). Herramienta para la identificación de los factores sigma  $\sigma^{24}$ ,  $\sigma^{28}$ ,  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{38}$ ,  $\sigma^{54}$  y  $\sigma^{70}$  en enterobacterias con un porcentaje de 84-97% de exactitud (de Ávila *et al.*, 2011).

- iPro54-PseKNC. Predictor basado en secuencias para la identificación de promotores  $\sigma^{54}$  en procariontes (Lin *et al.*, 2014).
- BPROM, Softberry (Predictions of bacterial promoters). Programa de reconocimiento del promotor  $\sigma^{70}$  con alrededor de un 80% de exactitud (Solovyev y Salamov, 2011).

#### **7.4 Análisis filogenético de los genes del metabolismo de trehalosa en *R. etli* CFN 42**

Las secuencias de los genes de las vías de síntesis y degradación de trehalosa en *R. etli* fueron analizadas a partir de un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) mediante el portal NCBI. Con el fin de analizar la relación filogenética de estos genes dentro y fuera del orden de bacterias Rhizobiales en el presente trabajo se elaboró la construcción filogenética de las secuencias en aminoácidos de los genes *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*, *treS* y *thuA* de *R. etli* CFN 42 con secuencias con homología en bacterias pertenecientes a las clases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -proteobacterias.

Las secuencias se obtuvieron de los portales KEGG y Gene Bank; el análisis filogenético se elaboró con el programa MEGA\_X\_10.1.1\_win64\_beta; el alineamiento de secuencias se hizo mediante ClustalW (1.6) con la matriz BLOSUM62. La construcción de árboles filogenéticos se realizó tomando en cuenta los siguientes aspectos: bajo el método Neighbour-Joining, las distancias evolutivas fueron procesadas usando el método de corrección Poisson, el índice de variación entre sitios fue modelado con una distribución Gamma (parámetro de forma = 1), todas las posiciones con gaps fueron manualmente removidas, la robustez de la fuerza de las ramas fue realizada mediante un análisis bootstrap de la base de datos Neighbour-Joining con 1,000 repeticiones (Saitou y Nei, 1987; Felsenstein, 1985).

## 7.5 Construcción de fusiones transcripcionales promotor-GUS de los genes del metabolismo de trehalosa en *R. etli* CFN 42

Si bien la realización de las fusiones transcripcionales ensayadas en este estudio no fueron parte del diseño experimental del presente trabajo, a continuación, se describe el protocolo para obtener dichas construcciones.

### 7.5.1 Amplificación por PCR de las secuencias promotoras de los genes *otsAch*, *otsApa*, *otsB*, *treY*, *treZ*, *treSch*, *treSpf* y *thuApf* de *R. etli* CFN 42

Se extrajo DNA (de cromosoma y plásmido) a partir de cultivos líquidos de *R. etli* mediante el protocolo convencional por lisis alcalina y se realizó una reacción de PCR para la amplificación de las secuencias.

Para la reacción de PCR se emplearon los oligonucleótidos que se enlistan en la Tabla 5; las condiciones de amplificación se detallan en la Tabla 6; los productos de PCR se analizaron en gel de agarosa al 1% y posteriormente se purificaron del gel mediante el protocolo de extracción de gel de agarosa QIAGEN con especificaciones del proveedor.

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para amplificar las secuencias promotoras de los genes del metabolismo de trehalosa en *R. etli*.** En color verde se indica la secuencia de reconocimiento para la enzima *SalI* y en rojo la enzima *XhoI*.

Primer Forward	Secuencia	Tm (°C)	Primer Reverse	Secuencia	Tm (°C)
<b>otsAchUP</b>	CGT CGA CCG CAT CAA CTC CTT CGA CCA G	74	<b>otsAchLW</b>	GCT CGA GGC GAT TGG AAA CGA CGA TAA G	71.61
<b>otsAaUP</b>	CGT CGA CTT TGG CTG TCG ATA ATC CCT G	71.61	<b>otsAaLW</b>	GCT CGA GTA GAA ACT CAT GCT CCG TCA G	71.61
<b>otsBUP</b>	CGT CGA CGG TCT TCT TGT TGG CGT TGT C	72.82	<b>otsBLW</b>	GCT CGA GGA AGT GCT TCG GGA ACC TCG A	74.04
<b>rhe_ch02260UP</b>	CGT CGA CGC CGT CCG CCC TTT TTT GCA G	75.25	<b>rhe_ch02260LW</b>	GCT CGA GCC GTC GCC GTT CGC ATC CAT G	76.46

<b>rhe_pf00276UP</b>	CGT CGA C GGT GCT TAT CAG GTG TCG AGC G	74.04	<b>rhe_pf00276LW</b>	GCT CGA G GTC GAT GCC TTG GAG AAG TAG C	72.82
<b>rhe_pe00008UP</b>	CGT CGA C GGC AGC AAT GGC AGC CCG ATG	75.54	<b>rhe_pe00008LW</b>	GCT CGA G GT TGA GCC GCT GAC GGC GGT G	77.68
<b>rhe_pf00263UP</b>	CGT CGA C CCG AAG CCG TTC ACG CAA GAG C	75.25	<b>rhe_pf00263LW</b>	GCT CGA G GTT CAT GCA GAG GAG CCC AAA G	72.82
<b>thuAfUP</b>	CGT CGA C GGT TTG GAG CCG CAC GGT CAT C	75.25	<b>thuAfLW</b>	GCT CGA G CA AGG CGG GCT TCG CTC AAT C	75.25

**Tabla 6. Condiciones de PCR para la amplificación de las secuencias promotoras.**

Secuencias promotoras	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	elongación	Elongación final
	1 ciclo		30 ciclos		1 ciclo
<b>otsAch, otsB, rhe_ch02260, rhe_pf00276, rhe_pe00008, rhe_pf00263 y thuAF</b>	3 min a 94°C	45 seg a 94°C	45 seg a 60°C	40 seg a 72°C	7 min a 72°C
<b>otsAa</b>	3 min a 94°C	45 seg a 94°C	45 seg a 60°C	2 min a 72°C	7 min a 72°C

### 7.5.2 Clonación de promotores en el vector pCR2.1-TOPO

Las secuencias promotoras fueron clonadas en el vector pCR2.1-TOPO; posteriormente se transformaron células químicamente competentes TOP10f con las construcciones pCR2.1-TOPO-promotor con el protocolo recomendado por el proveedor (Invitrogen). Las transformantes se seleccionaron en medio LB adicionado con Km<sup>50</sup>.



### **7.5.3 Identificación de células TOP10f transformantes que contienen las clonas correctas de los promotores**

Se extrajo DNA plasmídico de las clonas seleccionadas en LB adicionado con Km<sup>50</sup> mediante el kit *Gene JET plasmid miniprep*; mediante la digestión con la enzima de restricción *EcoRI* se identificaron las clonas que llevaban el inserto de los promotores.

### **7.5.4 Construcción de fusiones GFP::*GUS*-promotor mediante subclonación de las secuencias promotoras en el vector pCMJD**

El vector pCMJD y las ocho construcciones pCR2.1-TOPO-promotores se digirieron con las enzimas *Sall* y *XhoI*; posteriormente, fueron sometidas a electroforesis en agarosa 1% y las bandas correspondientes a las secuencias promotoras se cortaron y purificaron mediante el protocolo de extracción de gel de agarosa QIAGEN.

Los fragmentos purificados se ligaron al vector pCMJD digerido entre los sitios *Sall* y *XhoI*. Las células de *E. coli* DH5 $\alpha$  electrocompetentes se transformaron con cada una de las construcciones pCMJD-promotor por electroporación. Las transformantes se seleccionaron en medio LB adicionado con Gm<sup>20</sup>. Posteriormente, se identificaron las clonas transformantes que adquirieron los insertos de las secuencias promotoras ligadas en la misma orientación que la fusión transcripcional GFP::*GUS* mediante digestión con enzimas y análisis de los tamaños de los fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.

### **7.5.5 Transformación de la cepa *R. etli* CFN 42 con las construcciones pCMJD-promotor**

Se extrajo DNA plasmídico de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  mediante *Gene JET plasmid miniprep Kit*. Posteriormente, la cepa *R. etli* CFN 42 se transformó por electroporación con cada una de las construcciones pCMJD-promotor. Finalmente, las clonas transformantes se seleccionaron en medio PYCa adicionado con Gm<sup>20</sup>.

Cada una de las transformantes se comprobó con análisis mediante el patrón con enzimas de restricción.

## **7.6 Análisis cualitativo – Expresión mediante el ensayo de la $\beta$ -glucuronidasa**

Se realizó un análisis cualitativo para evaluar la expresión de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa (*otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*, *treS* y *thuA*) en *R. etli*; cada cultivo se ajustó a una densidad óptica (DO) de 0.2<sub>600</sub> y se sembraron 20  $\mu$ l por goteo en cajas con 25 ml de medio mínimo M9 adicionado con 0.2 mg de X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -D-glucoronido) diluido en 50  $\mu$ l de DMSO esto bajo condiciones de estrés salino, estrés térmico e inducción por trehalosa. La cepa de *R. etli* CFN 42 fue utilizada como control.

### ***Estrés salino***

Los ensayos en estrés salino se realizaron empleando diferentes concentraciones de NaCl (0, 100 y 200 mM) evaluando cualitativamente la expresión a las 24, 48, 72 y 96 horas.

### ***Estrés térmico***

Para los tratamientos con calor y frío, las células transformadas con fusiones transcripcionales se incubaron a 4 y 37°C tomando en cuenta que el crecimiento óptimo para *R. etli* es de 27°C.

### ***Inducción por trehalosa***

Cultivos con las fusiones transcripcionales se inocularon en una placa con medio mínimo M9 en el que se agregó como única fuente de carbono trehalosa y se incubó a 27°C.

### **7.7 Análisis cuantitativo – Ensayo de la actividad $\beta$ -glucuronidasa**

Para el análisis cuantitativo se realizó un precultivo en 5 ml de medio PYCa adicionado con Gm<sup>20</sup> y se incubó en agitación (200 rpm) a 30°C durante 24 h para posteriormente centrifugar todo el cultivo a 11 mil rpm. Se lavó la pastilla celular con 1 ml de una solución de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y se inoculó en 20 ml de medio PYCa para ajustar una DO de 0.5<sub>595</sub>.

#### ***Estrés salino***

Los ensayos de estrés salino se realizaron en medio mínimo M9 utilizando diferentes concentraciones de NaCl (0, 50 y 100 mM). Las muestras de cultivo de cada experimento se tomaron a las 24 y 48 h de crecimiento.

La cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa se realizó de acuerdo con el método reportado por Jefferson y colaboradores (1986), utilizando p-nitrofenil- $\beta$ -*o*-glucuronido (PNPG) como sustrato; la actividad enzimática fue normalizada de acuerdo con la cantidad de proteína total en los cultivos celulares, determinada por el método de Bradford (1976). Se tomaron 2 ml de muestra para cada tiempo, 1 ml para la actividad enzimática y 1 ml para la cuantificación de proteína.

### **7.8 Análisis de la expresión de los genes de síntesis y degradación de trehalosa en *R. etli* CFN 42 al ser inoculada en plantas de *P. vulgaris***

Para evaluar la expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa durante la interacción de *R. etli* con raíces de frijol se esterilizaron las semillas en una solución al 25% de cloro comercial (Cloralex®; 6% de hipoclorito de sodio) durante 25 min;

posteriormente se enjuagaron cuatro veces con agua destilada estéril. Se germinaron las semillas en agar agua (0.75%) durante 48 h a 30°C; una vez transcurrido el tiempo las semillas germinadas se inocularon con 1 ml de un cultivo de *R. etli* ajustado a una DO<sub>600</sub> 0.2. Posteriormente las semillas fueron trasplantadas en matraces estériles con solución de Fahraeus (ver apartado de Anexos) y agar al 0.75%. Las plantas inoculadas se mantuvieron en cuarto de cultivo para evaluar la interacción y formación de nódulos (7, 14 y 21 días posteriores a la inoculación).

Transcurrido el tiempo de incubación las raíces se cortaron y fueron incubadas en una solución con el sustrato cromogénico X-Gluc durante 1 noche a 30°C; posteriormente se realizaron cortes en las raíces y se fotografiaron para documentar el experimento.

(Gao *et al.*, 2019; Suárez *et al.*, 2008; Ramírez-Trujillo *et al.*, 2007; Fahraeus, 1957).

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Análisis de la región promotora de los genes del catabolismo de trehalosa en *R. etli* mediante los programas BacPP, iPro54-PseKNC y BPR0M1

Se realizó un análisis de las regiones promotoras de los genes *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*, *treS* y *thuApf* mediante tres bases de datos: BacPP, iPro54-PseKNC y BPR0M1 con el objetivo de identificar la región promotora, secuencias consenso reconocidas por diversos factores de transcripción y secuencias de reconocimiento por reguladores.

#### **Análisis mediante el programa BacPP**

Mediante este programa obtuvimos un porcentaje de identificación estimado de los factores  $\sigma^{24}$ ,  $\sigma^{32}$ ,  $\sigma^{38}$ ,  $\sigma^{54}$  y  $\sigma^{70}$ . La secuencia promotora del gen *otsA* arrojó una predicción del factor  $\sigma^{70}$  del 40%. La secuencia de este mismo gen, pero ubicada en el plásmido arrojó una predicción del 59 y 99% con los factores  $\sigma^{32}$  y  $\sigma^{70}$ , respectivamente. La secuencia del gen *otsB* tuvo un porcentaje de predicción del factor  $\sigma^{70}$  del 40%. La secuencia del gen *treSch* y *treSpf* obtuvo en ambos casos un porcentaje de predicción del 50% con el factor  $\sigma^{32}$ . La secuencia del gen *treY* obtuvo porcentajes de predicción bajos para los factores  $\sigma^{32}$  y  $\sigma^{38}$ . La secuencia génica de *treZ* obtuvo porcentajes de predicción mayores del 50% para los factores  $\sigma^{38}$  y  $\sigma^{70}$ . Finalmente, el gen *thuApf* tuvo un porcentaje bajo de predicción con el factor  $\sigma^{38}$ .

#### **Análisis mediante iPro54-PseKNC y BPR0M1**

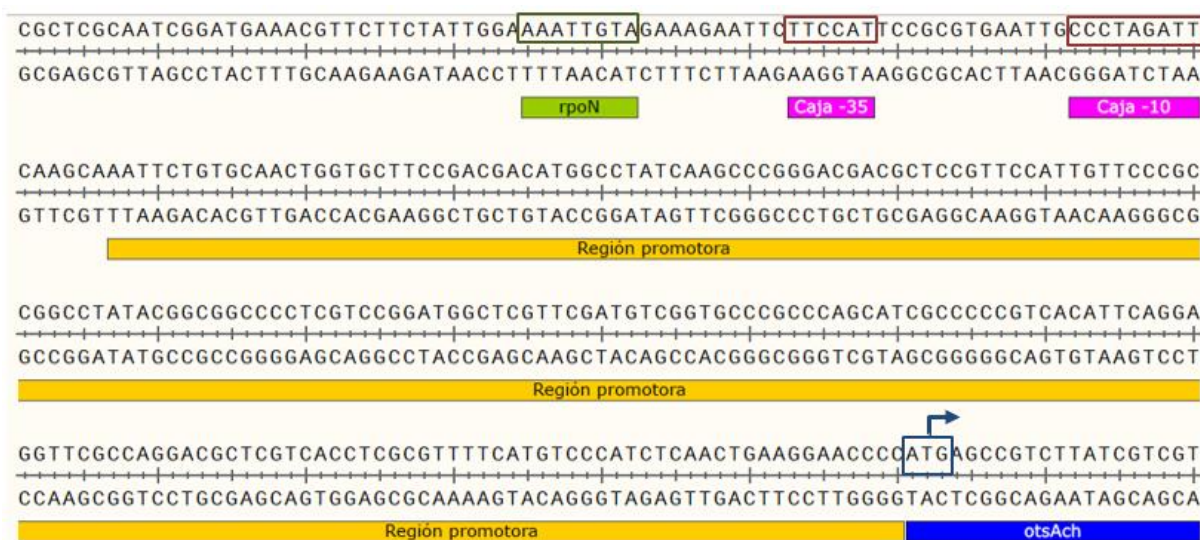
Con ayuda del programa BPR0M1 fue posible identificar la secuencia de reconocimiento de ciertos factores de transcripción y reguladores, y con el programa iPro54-PseKNC identificamos probables sitios de reconocimiento para el factor  $\sigma^{54}$ ; todo ello se resume en la tabla 7. En las figuras 13-20 se esquematizan las regiones identificadas a partir de ambos programas.

**Tabla 7. Regiones de reconocimiento para factores de transcripción y reguladores transcripcionales identificados en las secuencias promotoras de los genes de síntesis y degradación de trehalosa en *R. etli* CFN 42.**

Gen	BPROM1		iPro54-PseKNC
	Factor de transcripción	Regulador	Factor $\sigma^{54}$
<i>otsAch</i>	<i>rpoN</i>		
<i>otsApa</i>	<i>rpoD16</i> y <i>rpoD17</i>	LexA; Fnr	
<i>otsB</i>		Ihf	3 probables $\sigma^{54}$
<i>treSch</i>	<i>rpoD15</i>	Fis	2 probables $\sigma^{54}$
<i>treSpf</i>			1 probable $\sigma^{54}$
<i>treY</i>			1 probable $\sigma^{54}$
<i>treZ</i>	<i>rpoD18</i>		1 probable $\sigma^{54}$
<i>thuApf</i>			1 probable $\sigma^{54}$

- Promotor del gen *otsAch*

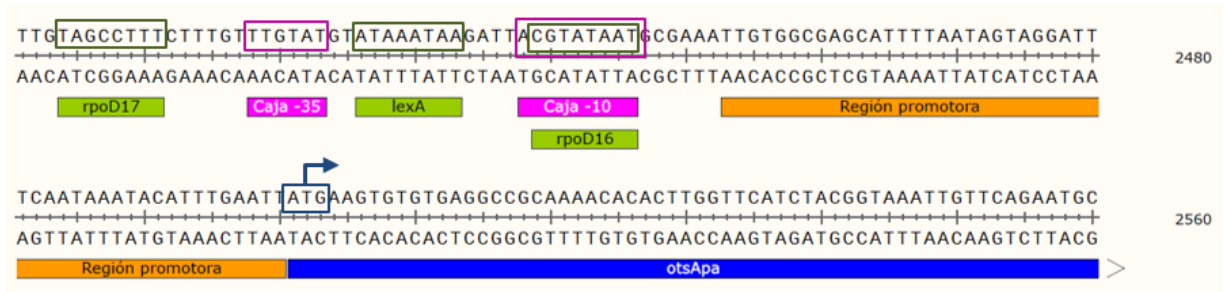
De manera destacada se identificó una probable secuencia para el promotor RpoN el cual está involucrado en la regulación de genes del metabolismo de nitrógeno (tabla 4, fig. 13).



**Figura 13. Región promotora del gen *otsAch*.** Se indica la probable secuencia de unión del factor de transcripción RpoN en verde y las regiones -35 y -10 en recuadros color rosa. En un recuadro azul se señala el codón de inicio.

- Promotor del gen *otsApa*

En la región del promotor del gen *otsApa* se identificaron dos secuencias probables para los factores *rpoD17* y *rpoD16*, además del regulador *lexA* (fig. 14).



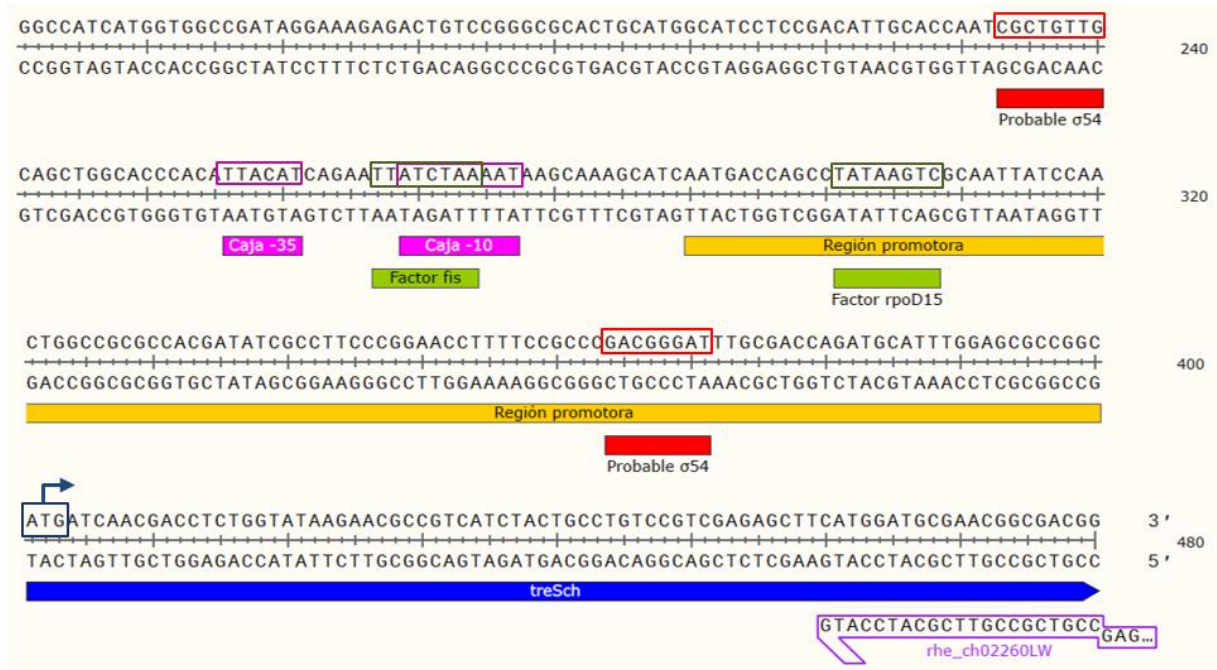
**Figura 14. Región promotora del gen *otsApa*.** Se indica la probable secuencia de unión de los factores de transcripción RpoD17 y RpoD16 y el regulador *lexA* en verde, las regiones -35 y -10 en recuadros color rosa. En un recuadro azul se señala el codón de inicio.

- Promotor del gen *otsB*



**Figura 15. Región promotora del gen *otsB*.** Se indica la probable secuencia de unión del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  en rojo y el regulador *ihf* en verde; las regiones -35 y -10 en recuadros color rosa y en un recuadro azul se señala el codón de inicio.

- Promotor gen *treSch*



**Figura 16. Región promotora del gen *treSch*.** Se indica la probable secuencia de unión del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  en rojo, el sitio de unión del factor RpoD15 y el regulador fis en verde; las regiones -35 y -10 en recuadros color rosa y en un recuadro azul se señala el codón de inicio; se muestra además la secuencia de nt del primer rhe\_ch02260LW empleado para la amplificación de la región promotora de *treSch*.

- Promotor gen *treSpf*

Solo se obtuvo dos probables sitios de reconocimiento del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  (fig. 17).





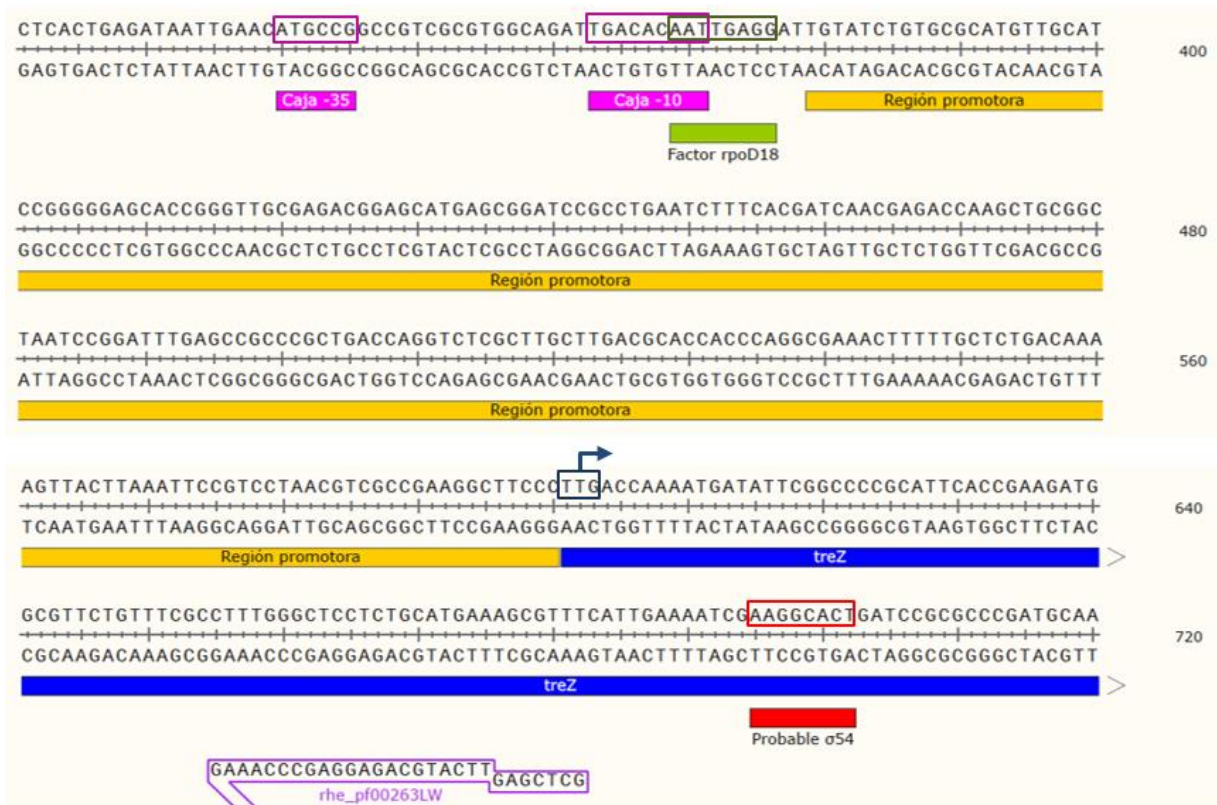
**Figura 17. Región promotora del gen *treSpf*.** Se indica la probable secuencia de unión del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  en rojo, las regiones -35 y -10 en recuadros color rosa y la secuencia del primer *rhe\_pf00276LW* empleado para la amplificación de la región promotora de *treSpf*.

- Promotor gen *treY*



**Figura 18. Región promotora del gen *treY*.** Se indica la probable secuencia de unión del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  en rojo, el codón de inicio en recuadro azul y la secuencia del primer *rhe\_pe00008UP*.

- Promotor gen *treZ*



**Figura 19. Región promotora del gen *treZ*.** Se indica la probable secuencia de unión del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  en rojo, el sitio de unión del factor RpoD18 en verde, las regiones -35 y -10 en recuadros color rosa y en un recuadro azul se señala el codón de inicio; se muestra además la secuencia de nt del primer *rhe\_pf00263LW* empleado para la amplificación de la región promotora de *treZ*.

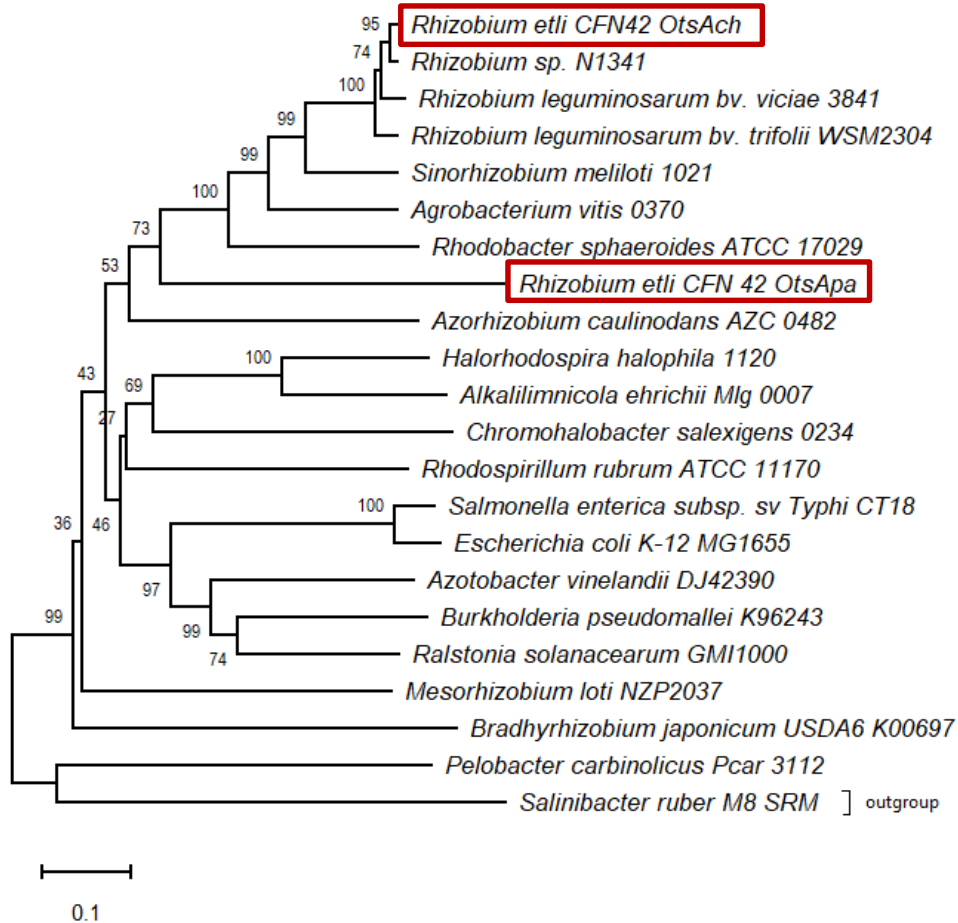
- Promotor gen *thuApf*



**Figura 20. Región promotora del gen *thuApf*.** Se indica la probable secuencia de unión del factor de transcripción  $\sigma^{54}$  en rojo, las regiones -35 y -10 en recuadros color rosa y en un recuadro azul se señala el codón de inicio; se muestra además la secuencia del primer *thuAfUP* empleado para la amplificación de la región promotora de *thuApf*.

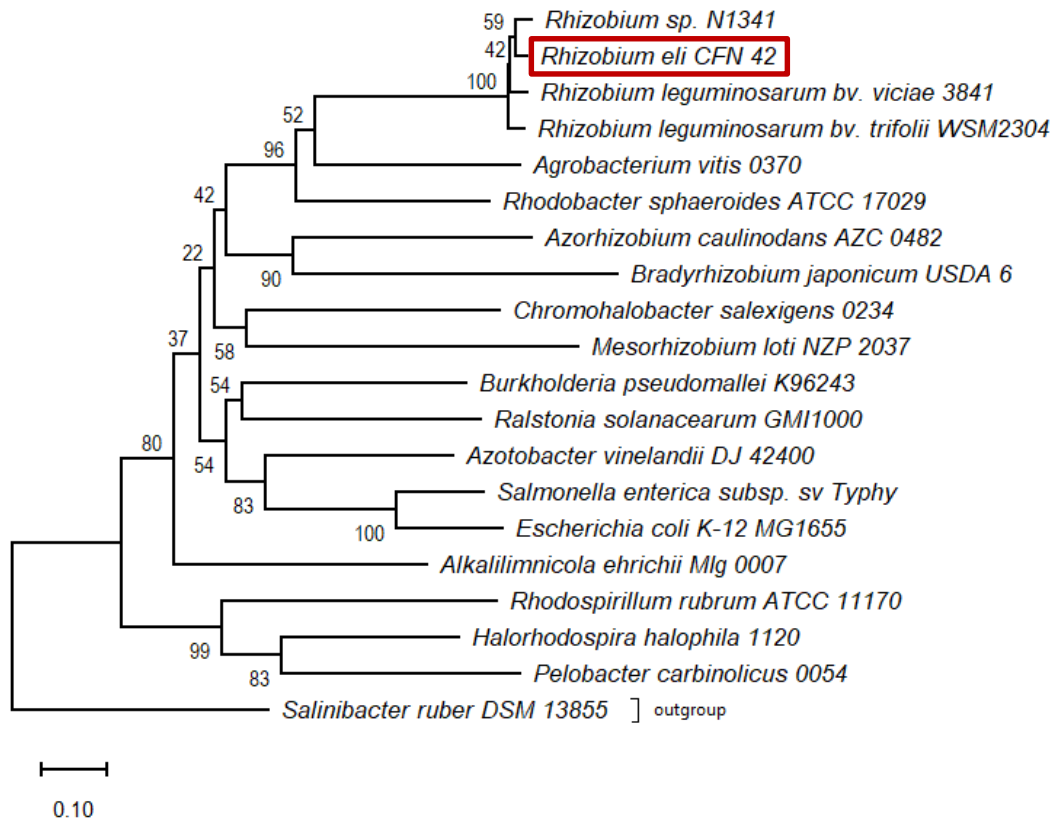
## 8.2 Análisis filogenético de las secuencias de los genes del metabolismo de trehalosa

A través de las bases de datos en donde se encuentran depositadas las secuencias de los genes del regulón de trehalosa hemos observado que microorganismos externos al orden Rhizobia poseen secuencias con homología de estos genes. Con el fin de analizar la relación filogenética de estos genes dentro y fuera del orden de bacterias Rhizobiales en el presente trabajo se elaboró la construcción filogenética de las secuencias en aminoácidos de *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*, *treS* y *thuA* incluyendo bacterias de las clases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ -proteobacterias. Las secuencias se obtuvieron de los portales de GenBank y KEGG; el alineamiento de secuencias se hizo mediante el programa MEGA\_X\_10.1.1\_win64\_beta y finalmente la construcción de árboles filogenéticos se obtuvo bajo el criterio de Neighbour-Joining.



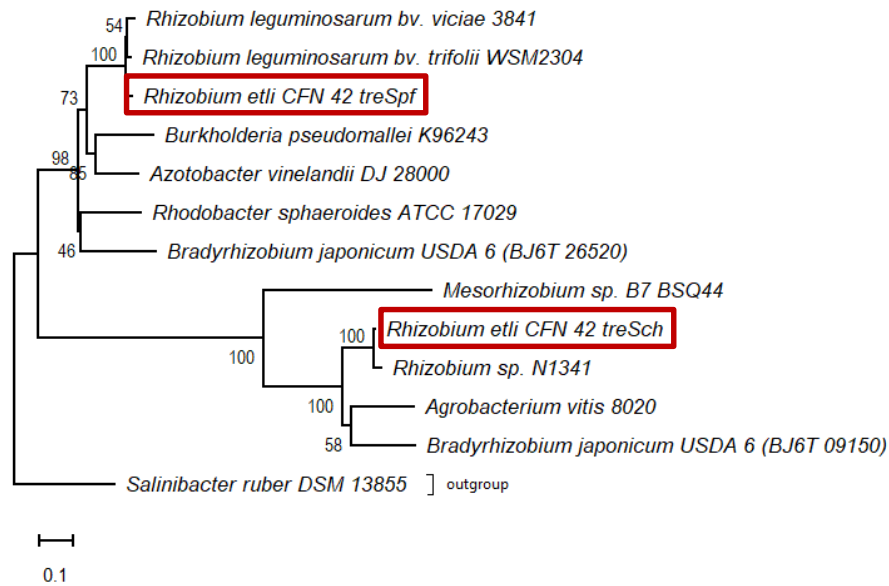
**Figura 21. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen *otsA* en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -proteobacterias.** Se indica enmarcada en rojo la ubicación en el árbol de las dos copias del gen *otsA* de *R. etli* CFN 42 las cuales no están relacionadas filogenéticamente; como grupo externo se consideró la secuencia del gen de *Salinibacter ruber*.

El gen *otsA* se encuentra ampliamente distribuido dentro del filo de las proteobacterias; tal como previamente se había reportado, las dos copias de este gen de *R. etli* se encuentran alejadas en la relación filogenética, lo que supone que la copia del gen en el plásmido a pudo haber sido obtenida por transferencia horizontal de genes (fig. 21) (Reina-Bueno *et al.*, 2012). Al realizar un alineamiento de ambas secuencias, estas mostraron un porcentaje de identidad del 50.11%. El gen *otsB* resulto ser cercano a la secuencia de este en *Rhizobium* sp. N1341 (fig. 22).

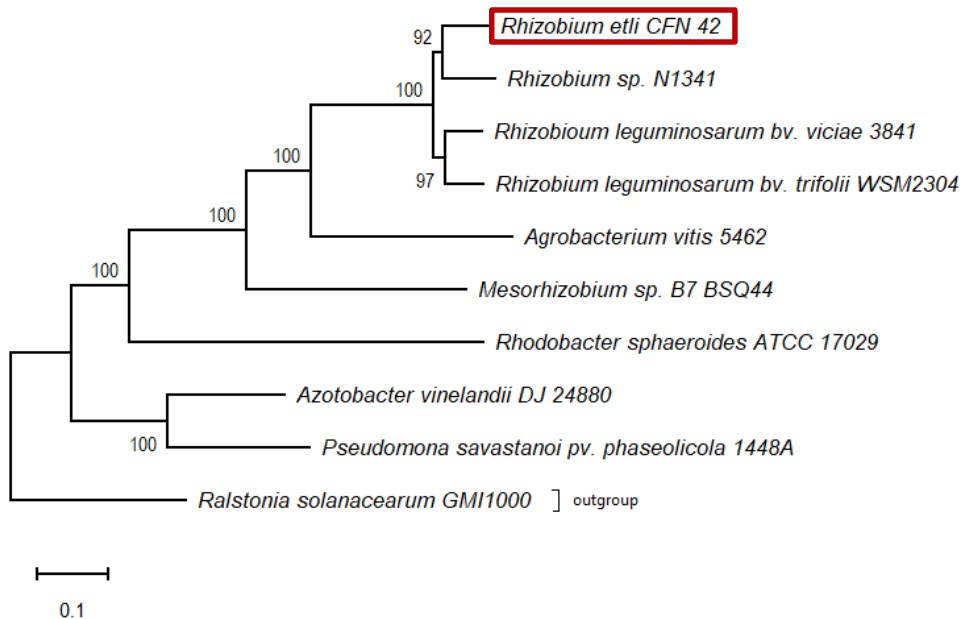


**Figura 22. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen *otsB* en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -proteobacterias. Enmarcada en rojo se indica la ubicación de la copia del gen en *R. etli* CFN 42.**

Las dos copias del gen *treS* en *R. etli* CFN 42 de manera interesante resultaron filogenéticamente alejadas; tal como el caso del gen *otsA*, lo anterior podría indicar que alguna de las dos copias haya sido adquirida a través de un movimiento horizontal de genes (fig. 23). Al realizar el alineamiento de las copias del gen *treS* estas mostraron un porcentaje de identidad del 44.63%.

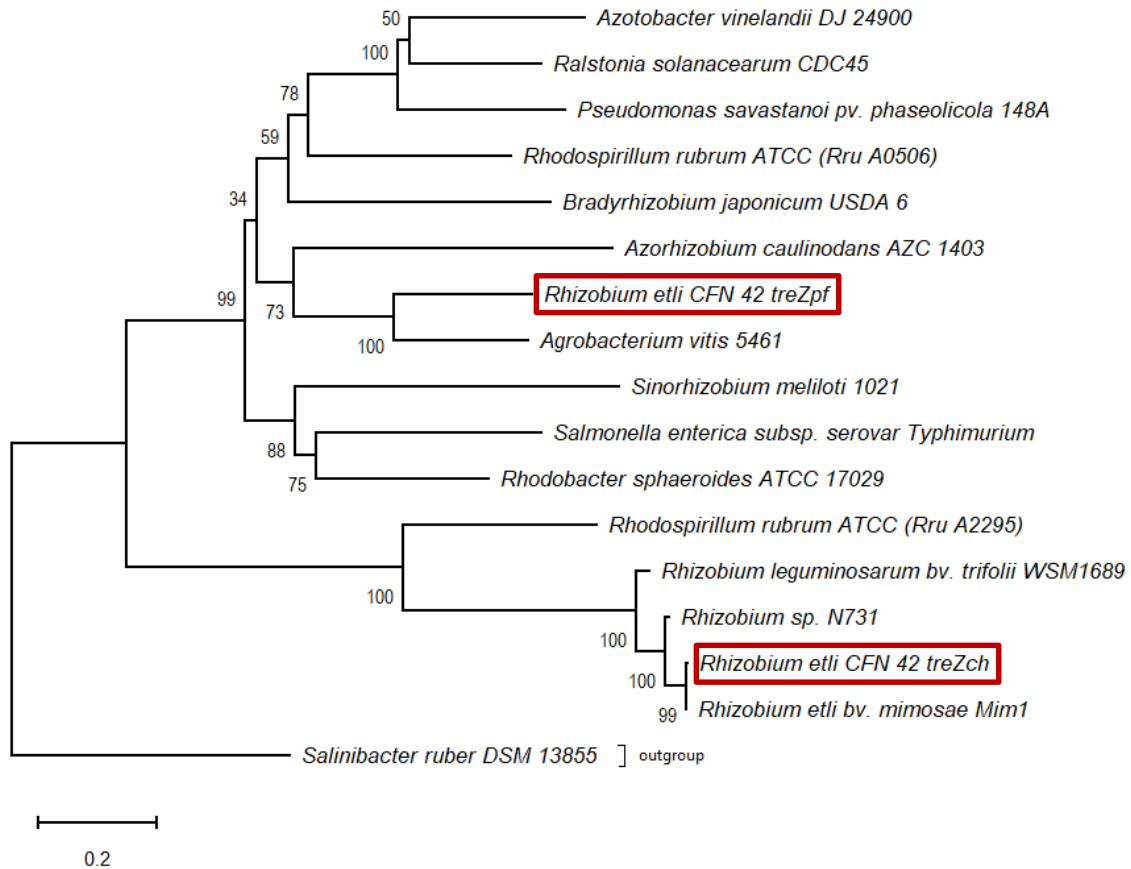


**Figura 23. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen *treS* en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -proteobacterias.** Se indica enmarcada en rojo la ubicación en el árbol de las dos copias del gen *treS* de *R. etli* CFN 42 las cuales no están relacionadas filogenéticamente; como grupo externo se consideró la secuencia del gen de *Salinibacter ruber*.



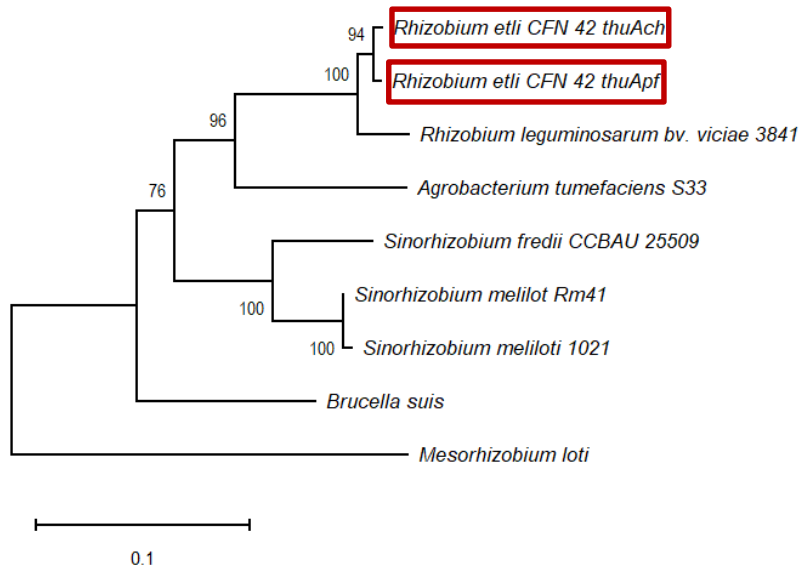
**Figura 24. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen *treY* en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -proteobacterias.** Enmarcada en rojo se indica la ubicación del gen en *R. etli* CFN 42; como grupo externo se consideró la copia del gen en *Ralstonia solanacearum*.

Al igual que el caso de los genes *otsA* y *treS*, las dos copias del gen *treZ* de *R. etli* CFN 42 resultaron no agrupadas en la relación filogenética (fig. 25). Del alineamiento entre ambas secuencias obtuvimos un porcentaje bajo de identidad del 39.92% entre ambas secuencias.



**Figura 25. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen *treZ* en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -proteobacterias.** Enmarcada en un rectángulo rojo se indica la ubicación de las dos copias del gen en *R. etli* CFN 42.

El gen *thuA* se encuentra distribuido dentro y fuera de las bacterias rizobiales, sin embargo, solo incluimos las secuencias del gen en rizobios. Las dos copias del gen resultaron estrechamente relacionadas por lo cual se descarta la idea de que alguna de ellas haya sido adquirida por un método de transferencia horizontal de genes (fig. 26).



**Figura 26. Árbol filogenético basado en el método Neighbour-Joining del gen *thuA* en  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -proteobacterias.** Enmarcada en rojo se indica la ubicación filogenética de las dos copias de este gen en *R. etli* CFN 42; como grupo externo se tomó la secuencia de *M. loti*.

### 8.3 Análisis de la expresión de los genes de síntesis de trehalosa en *R. etli* CFN 42

#### 8.3.1 Análisis cualitativo – Expresión mediante el ensayo de la $\beta$ -glucuronidasa

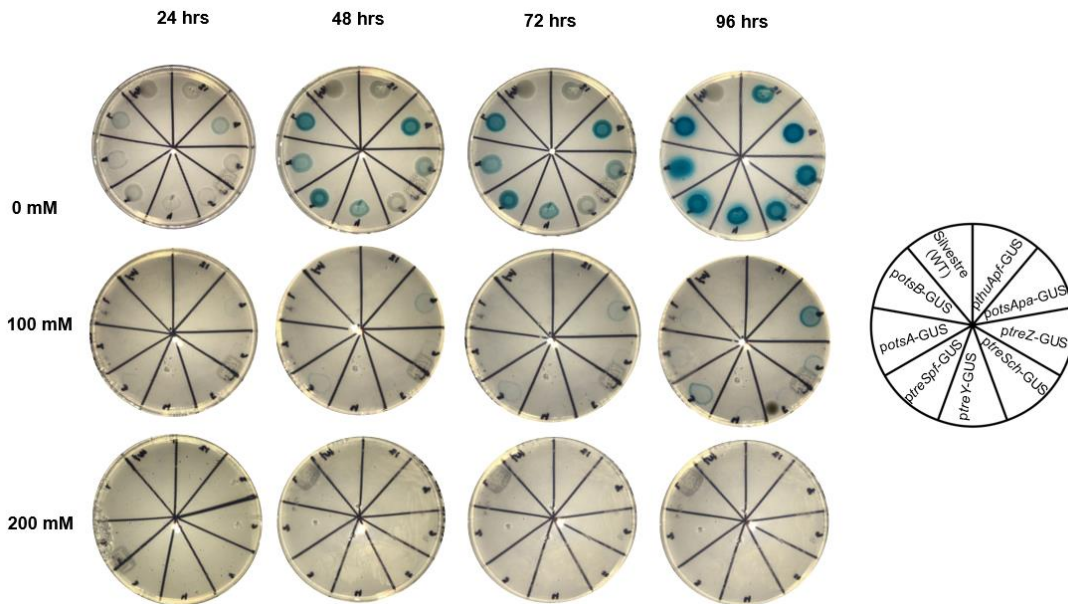
Las cepas de *R. etli* con fusiones transcripcionales en los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa visualmente mostraron una expresión diferencial al ser sometidas a estrés salino y térmico.

#### ***Estrés salino***

La expresión de los genes del metabolismo de trehalosa en general no fue evidente bajo condiciones de estrés osmótico puesto que solo se observó una expresión tenue de los genes *otsApa* y *treSpf* a 100 mM a las 96 h. Se observó una clara expresión



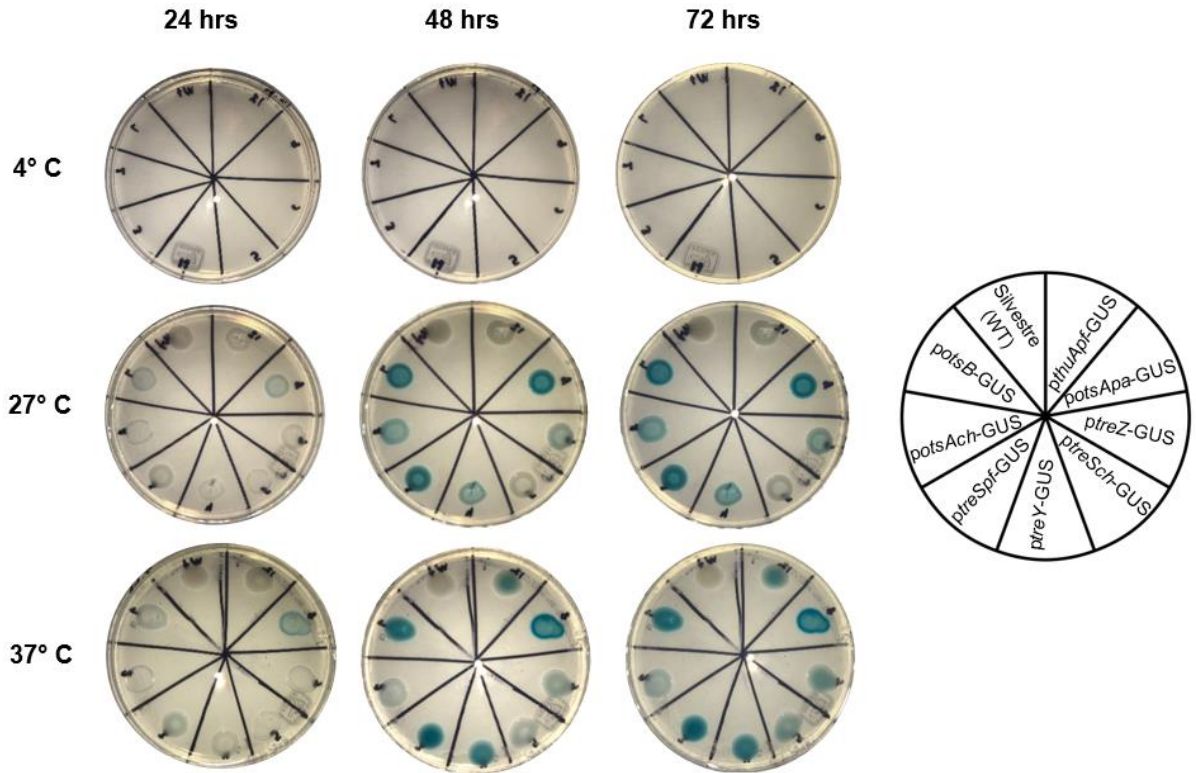
de los genes *otsB*, *treSpf* y *otsApa* y una baja inducción de los genes *otsAch*, *treY* y *treZ* en la condición sin estrés (0 mM de NaCl) a partir de las 48 h (fig. 27).



**Figura 27. Análisis de la expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa bajo estrés salino.** Expresión de los genes de síntesis de trehalosa en 0, 100 y 200 mM de NaCl después de 24, 48, 72 y 96 h.

### **Estrés térmico**

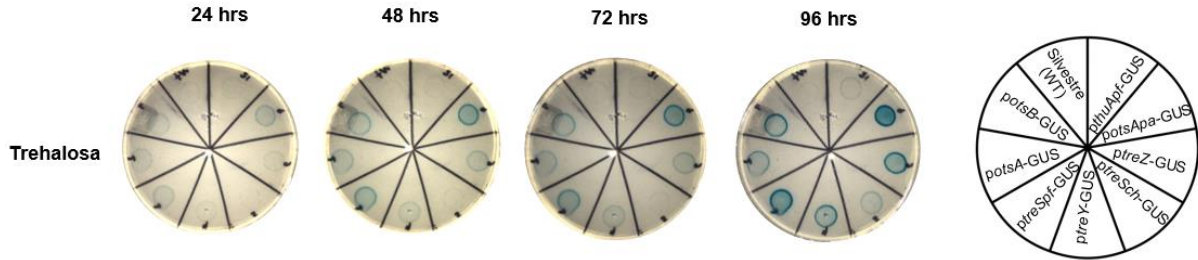
No se observó la expresión de ningún gen a baja temperatura (4°C). A una alta temperatura (37°C) a las 24 h solo se evidencio la expresión del gen *otsApa*; sin embargo, a las 48 h se observó una expresión notoria de los genes *otsB*, *treSpf*, *treY*, *otsApa* y *thuApf*. Para este ensayo se tomó en cuenta como control la expresión a 27°C (temperatura óptima de crecimiento para *R. etli*); si comparamos el control con la expresión a 37°C, resulta interesante que los genes *thuApf* y *treY* solamente se expresaron a 37°C (fig. 28).



**Figura 28. Análisis de la expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa bajo estrés térmico.** Expresión de los genes de síntesis de trehalosa a 4, 27 y 37°C después de 24, 48 y 72 h. Se utilizó como control las cajas incubadas a 27°C.

### ***Inducción por trehalosa***

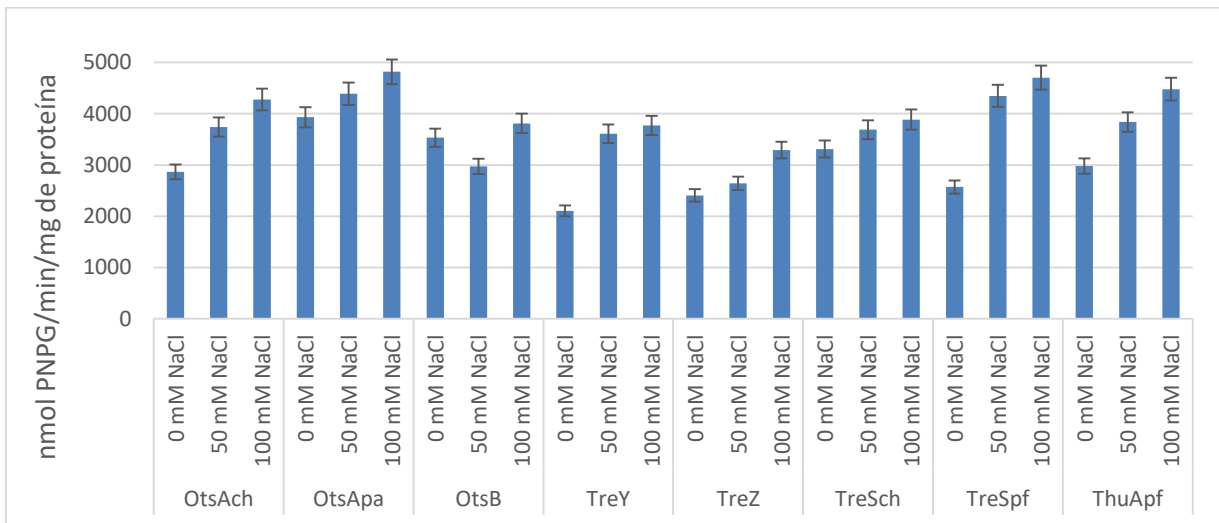
A las 24 h se obtuvo una baja expresión de los genes *otsB*, *treSpf* y *otsApa* y a partir de las 48 h se observó también la expresión de los genes *treY* y *treZ* lo cual es interesante puesto que indica que la presencia en el medio de trehalosa provoca una inducción de los genes de su biosíntesis. Es de destacar, además, que no hay una expresión del gen *thuApf* el cual codifica para la vía de degradación de trehalosa cuya actividad de degradación se esperarí fuera activa bajo condiciones de trehalosa. A 96 h se apreció una expresión notoria de todos los genes excepto *treSch* y el antes mencionado *thuApf* (fig. 29).



**Figura 29. Análisis de la expresión de los genes de biosíntesis de trehalosa bajo la inducción con trehalosa.** Expresión de los genes de síntesis y degradación de trehalosa en medio mínimo suplementado con el disacárido después de 24, 48, 72 y 96 h.

### 8.3.2 Análisis cuantitativo – Ensayo de la actividad $\beta$ -glucuronidasa

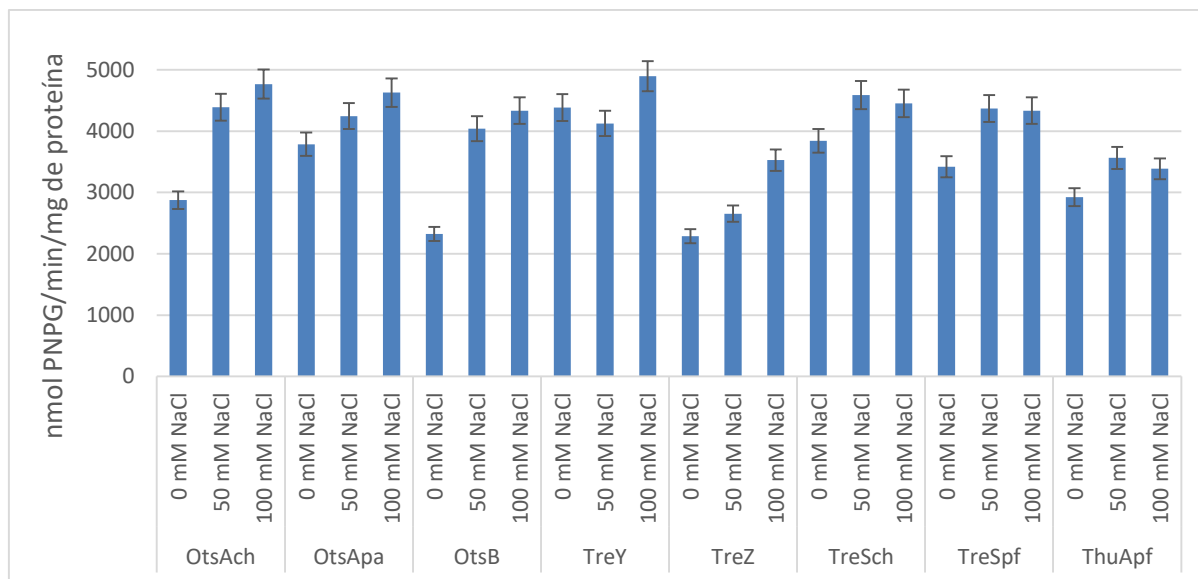
Debido a que cualitativamente no observamos una expresión de los genes bajo condiciones 200 y 400 mM de NaCl, optamos por medir la actividad  $\beta$ -glucuronidasa a 0, 50 y 100 mM de NaCl; a partir de este ensayo obtuvimos una expresión diferencial de los genes bajo concentraciones de NaCl. Las fusiones transcripcionales en los genes *otsApa*, *otsAch* y *treY*, en este ensayo, fueron las que mayor expresión mostraron en las tres concentraciones de NaCl. Por el contrario, *otsB* y *treZ* presentaron una baja expresión (figs. 30 y 31).



**Figura 30. Análisis de la cuantificación de la actividad enzimática de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa después de 24 h.** La expresión de los genes se

medió en unidades de nanomoles de PNPG degradado por minuto por miligramo de proteína; los valores son un promedio de tres replicas.

Así mismo, los genes *treS* de cromosoma y plásmido S mostraron un nivel de expresión importante. El gen *thuApf* a diferencia de los antes mencionados, mostró una disminución en su expresión. Con lo observado a partir del ensayo de expresión en caja, se puede corroborar que, el gen *otsA* está activo durante el crecimiento bacteriano bajo una condición de estrés salino, mismo que ha sido reportado en anteriores trabajos (Reina-Bueno *et al.*, 2012).

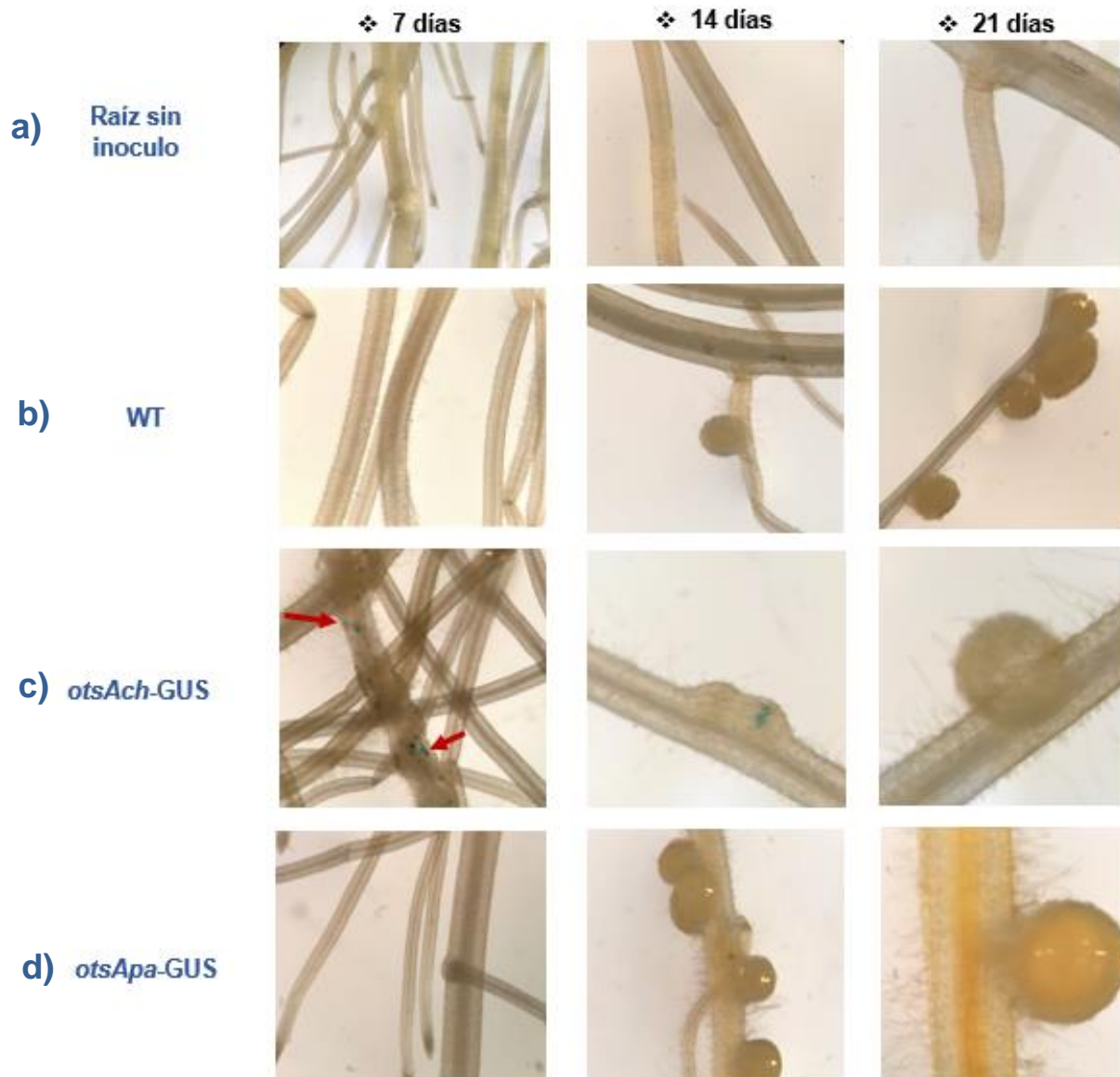


**Figura 31. Análisis de la cuantificación de la actividad enzimática de los genes de biosíntesis y degradación de trehalosa después de 48 h.** La expresión de los genes se midió en unidades de nanomoles de PNPG degradado por minuto por miligramo de proteína, los valores son un promedio de tres replicas.

#### **8.4 Análisis de la expresión de los genes de síntesis y degradación de trehalosa en *R. etli* CFN 42 al ser inoculada en raíces de *P. vulgaris***

Con el objetivo de determinar si las vías de síntesis y degradación de trehalosa están activas durante la interacción de *R. etli* con raíces de *P. vulgaris*, evaluamos la expresión de los genes *otsAch*, *otsApa*, *treY*, *treZ*, *treSch*, *treSpf*, *otsB* y *thuApf* mediante un ensayo histoquímico a partir de la degradación del sustrato cromogénico X-Gluc por la enzima  $\beta$ -Glucuronidasa a los 7, 14 y 21 días posteriores a su inoculación; este ensayo se realizó en dos ocasiones obteniendo de ambas el mismo resultado, mismo que a continuación se muestra.

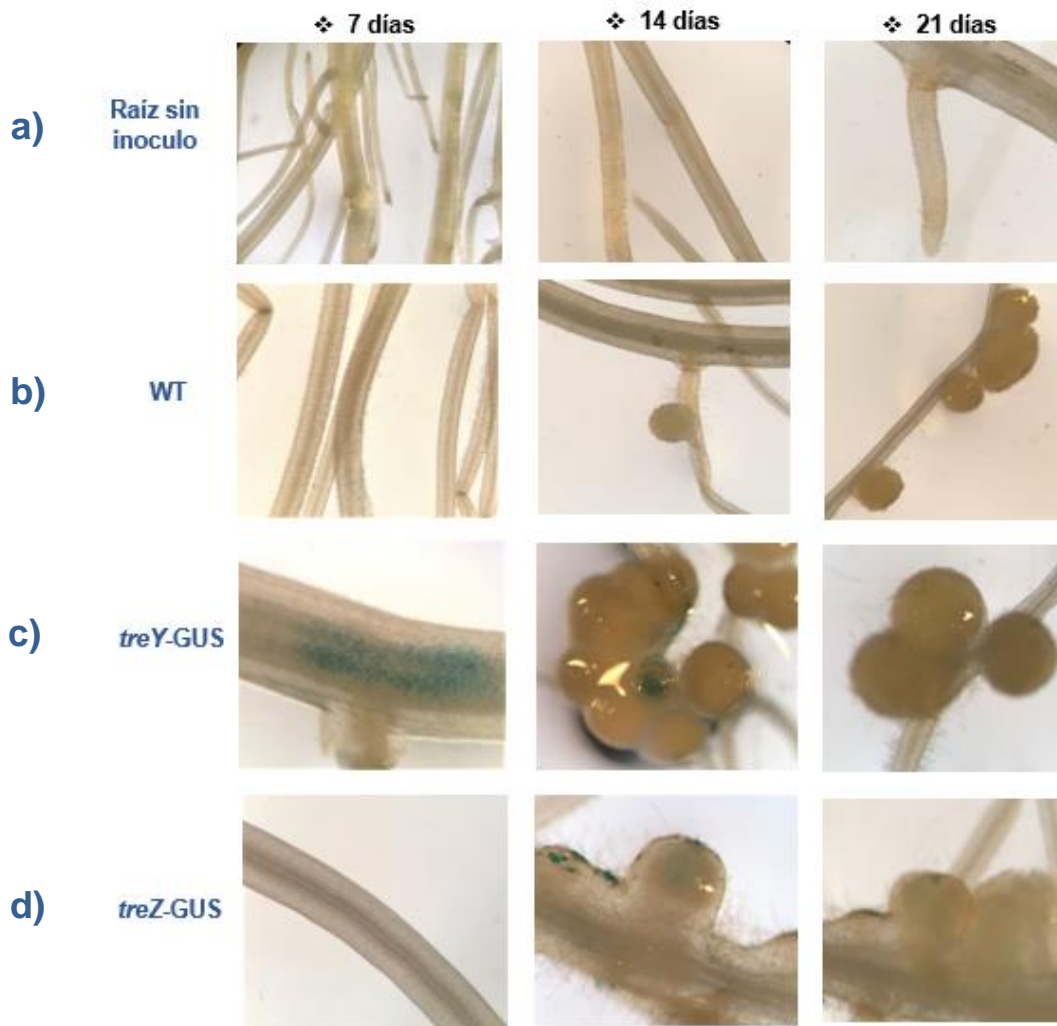
Desde los 7 días posteriores a la inoculación, pudimos observar cualitativamente la expresión de *otsAch*, *otsB*, *treSpf* y *treY*, notoriamente una expresión más marcada de *treY* y *treSpf*; la expresión del gen *treZ* fue visible a partir de los 14 días posteriores a la inoculación; la tinción de estos genes se observó desde los 7 días en zonas del tallo, raíces secundarias, así como en el meristema apical de la raíz.



**Figura 32. Expresión en raíz de los genes *otsAch* y *otsApa*.** Se observa la expresión del gen *otsAch* producto de la reacción de la  $\beta$ -Glucuronidasa con el sustrato cromogénico X-Gluc. a) raíz sin inoculo, b) WT, c) *otsAch* y d) *otsApa*. A los 7 días posteriores a la inoculación se puede observar la expresión punteada de *otsAch*; desde los 14 días se observa la formación de primordios y nódulos de fijación de nitrógeno formados por *R. etli*.

El gen *otsAch* se expresó en zonas de la raíz secundaria en forma de puntos, así como en las zonas de los nódulos de fijación de nitrógeno. Contrariamente, no se observó la expresión de la copia del gen en el plásmido a (fig. 32, c y d). Los genes

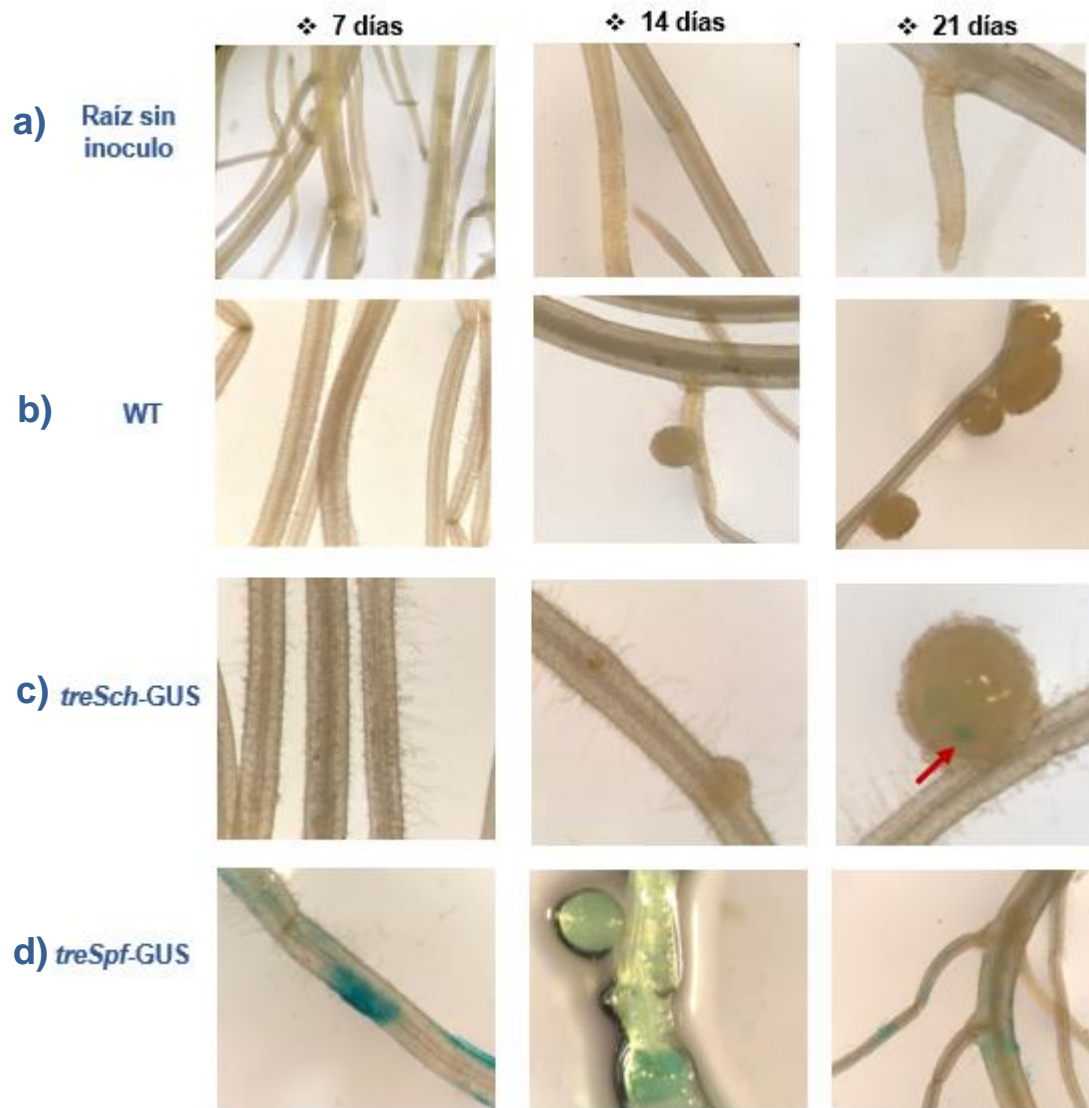
*treY* y *treZ*, de manera interesante, se expresaron en nódulos de fijación de nitrógeno en forma de puntos en los centros de esta estructura (fig. 33, c y d).



**Figura 33. Expresión en raíz de los genes *treY* y *treZ*.** Se observa la expresión de los genes *treY* y *treZ* producto de la reacción de la  $\beta$ -Glucuronidasa con el sustrato cromogénico X-Gluc. a) raíz sin inoculo, b) WT, c) *treY* y d) *treZ*. A los 7 días posteriores a la inoculación se puede observar solo la expresión de *treY* a lo largo de la raíz; a los 14 días se observa la formación de nódulos en los que ambos genes se expresan en forma de puntos en el centro de esta estructura.

La expresión del gen *treSpf* fue evidente desde los 7 días. La expresión de *treSch* solo pudo ser visible hasta los 21 días posteriores a la infección con las cepas de *R*.

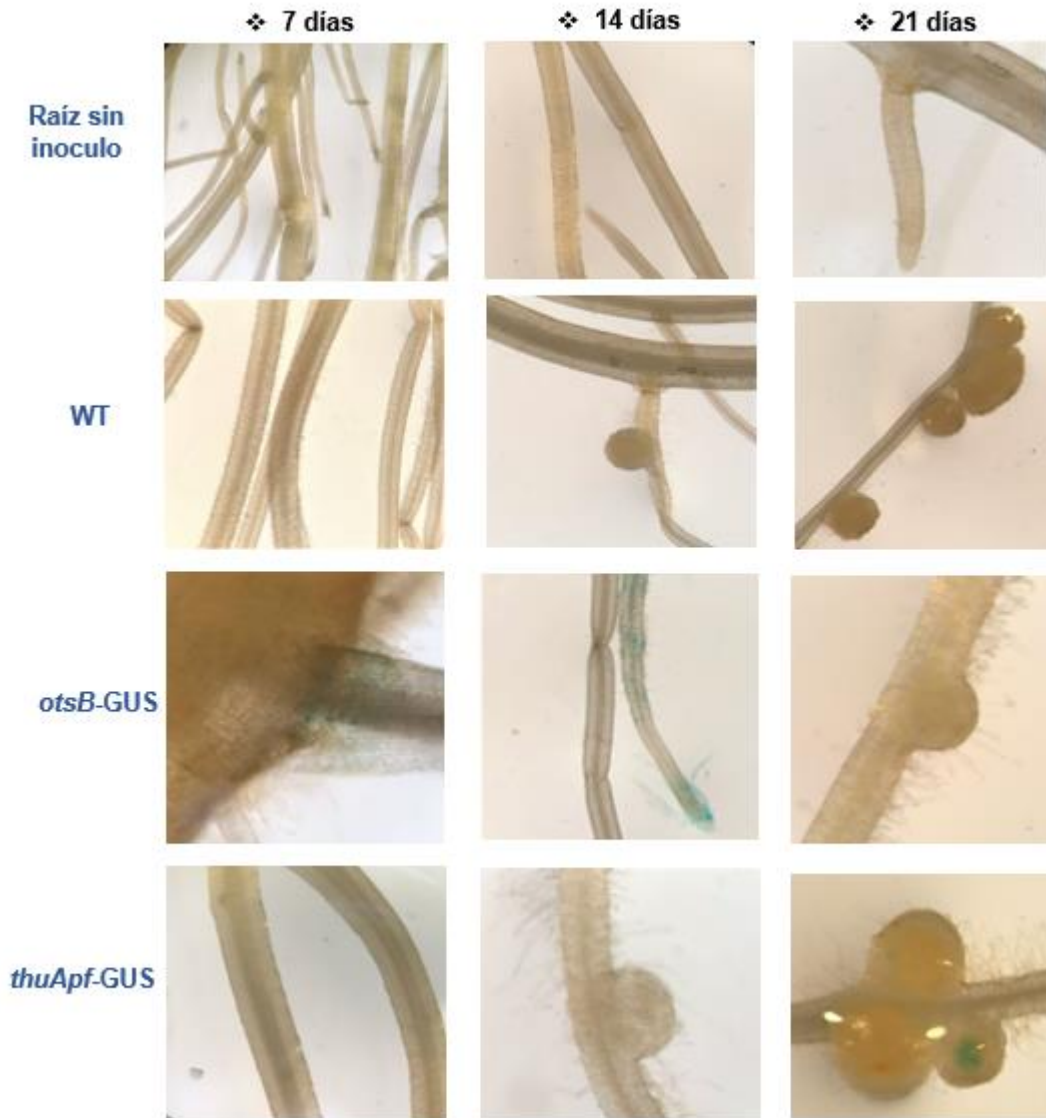
*etli*. Cabe destacar que la expresión de *treSpf* fue la más notoria de todos los genes ensayados en este estudio, pues a los 14 días hubo expresión de este a lo largo de la raíz primaria, raíces secundarias y en zonas de nódulos, sin embargo, su expresión disminuyó a los 21 días. En este periodo ambos genes mostraron expresión en nódulos (fig. 34, c y d).



**Figura 34. Expresión en raíz de los genes *treSch* y *treSpf*.** Se observa la expresión de los genes *treSch* y *treSpf* producto de la reacción de la  $\beta$ -Glucuronidasa con el sustrato cromogénico X-Gluc. a) raíz sin inoculo, b) WT, c) *treSch* y d) *treSpf*. A los 7 días posteriores a la inoculación se puede observar solo la expresión de *treSpf* a lo largo de la raíz; a los 14 días se observa la formación de nódulos en los que solo *treSpf* se expresó a lo largo de las



raíces y en nódulos. A los 21 días la expresión de *treSpf* disminuyó y pudo observarse hasta entonces la expresión de *treSch*.



**Figura 35. Expresión en raíz de los genes *otsB* y *thuApf*.** a) raíz sin inoculo, b) WT, c) *otsB* y d) *thuApf*. A los 7 días posteriores a la inoculación puede observarse la expresión de *otsB* en zonas adyacentes al tallo. A los 14 días se observa la formación de nódulos en los que solo *otsB* se expresó. A los 21 días la expresión de este último disminuyó y pudo observarse la expresión de *thuApf* en forma de puntos en los centros de los nódulos.

Finalmente, el gen *otsB* se expresó en zonas adyacentes al tallo y a lo largo de las raíces secundarias y en las zonas apicales de estas. No se observó expresión de

este gen en zonas de nódulos; a diferencia de este, la expresión del gen *thuApf* solo fue observada a partir de los 21 días posteriores a la infección y esto ocurrió en zonas del nódulo, en forma de puntos (fig. 35, c y d).

A diferencia de lo que había sido reportado en microorganismos como *M. loti*, *A. tumefaciens* y *B. melitensis*, en la interacción de *R. etli*-*P. vulgaris*, el gen *thuApf* no se expresa en las etapas de infección y formación de hilos infectivos en la simbiosis rizobio-leguminosa sino una vez que el nódulo ha sido formado.

## 9. DISCUSIÓN

Ha sido bien documentado que bacterias del suelo como *R. etli* están expuestas a una serie de factores abióticos como la desecación, salinidad y altas temperaturas, además de que el disacárido trehalosa es utilizado como un mecanismo de respuesta al estrés, por lo que en el presente trabajo analizamos el patrón de expresión de los genes del metabolismo de trehalosa de *R. etli* CFN 42, particularmente los genes *otsA* del cromosoma y el plásmido a, *otsB*, *treS* de cromosoma y plásmido f, *treY*, *treZ* y *thuApf*; el análisis de su expresión se realizó, cualitativamente (en vida libre bajo condiciones de estrés salino y térmico y en interacción con raíces de plantas de frijol) y cuantitativamente (midiendo la actividad enzimática frente a condiciones de estrés salino). A través de un estudio bioinformático se identificaron las regiones promotoras, así como los posibles reguladores y factores de transcripción de estos genes; finalmente se construyó la relación filogenética mediante árboles con el método Neighbour-Joining.

### - *Análisis cualitativo en vida libre*

Tan solo en cultivos bacterianos con la fusión GUS en los genes *otsApa* y *treSpf* se observó la coloración azul producto de la expresión de los mismos bajo estrés osmótico (100 mM de NaCl); cabe destacar que los cultivos sembrados bajo esta condición apenas mostraron crecimiento. Bajo la condición de estrés a baja temperatura no hubo expresión de ningún gen. Derivado de los casos anteriores es importante señalar que durante la deshidratación osmótica y a bajas temperaturas el daño a nivel celular puede deberse ya sea a la deshidratación o a las altas concentraciones intracelulares de solutos (Welsh, 1999) razón por la cual muy probablemente no observamos el crecimiento bacteriano para el análisis de la expresión. En organismos como levaduras, se sabe que la tolerancia a bajas temperaturas depende principalmente del contenido inicial de trehalosa (Hino *et al.*, 1990), y dado que en el medio mínimo utilizado para este ensayo la única fuente de

carbono para la bacteria fue ácido succínico, esta podría ser la razón en ambos casos de no haber observado primeramente un crecimiento bacteriano para el posterior análisis de la expresión de los genes bajo estudio.

Caso contrario, bajo la condición de estrés por temperatura (37°C) fue posible evidenciar una expresión muy marcada de *otsB*, *treSpf*, *treY*, *otsApa* y *thuApf*. Se sabe que altas temperaturas estimulan la biosíntesis de trehalosa (Welsh, 1999); aunado a ello, los resultados del presente trabajo concuerdan con lo reportado por Reina-Bueno (2012) en cuyo trabajo señalan que el estrés salino causaba un retraso en el crecimiento de *R. etli*, pero en crecimiento a una temperatura por arriba del promedio óptimo, esto no ocurría. Lo anterior puede significar que bajo una condición de estrés térmico la bacteria sintetice trehalosa como un método de defensa para contrarrestar el estrés, razón por la que observamos la reacción a través de la coloración en caja incubada a una temperatura mayor a la del crecimiento óptimo (fig. 28).

A partir de los resultados de la expresión bajo inducción por trehalosa es interesante que no observamos la expresión del gen *thuApf*, pero sí de los genes de las vías de síntesis de trehalosa. En trabajos previos en los que se cultivó a *Rhizobium* en condiciones de medio mínimo ha sido reportado que esta bacteria es capaz de utilizar trehalosa como única fuente de carbono, así como algunos isómeros de sacarosa (trehalulosa, maltitol, manitol, entre otros) (Ampomah *et al.*, 2013); de igual forma en organismos como *Ectothiorhodospira halochloris* (bacteria perteneciente a la clase de las gamma proteobacterias) durante su crecimiento bajo escasez de nitrógeno este organismo acumula trehalosa como único soluto compatible (Galinski y Herzog, 1990); derivado de lo anterior podríamos señalar que, *R. etli* CFN 42 al estar en una condición escasa de nutrientes y con trehalosa como única fuente energética, la bacteria va aprovechando el disacárido y a medida que pasa el tiempo y las reservas se van agotando, opta por la síntesis de trehalosa; por esta razón se observó una expresión activa de las vías de este disacárido.

- *Análisis cualitativo en interacción con plantas de frijol*

Como se sabe, la trehalosa está presente en nódulos de raíces de leguminosas y de igual forma está presente en altas concentraciones en bacteroides de fijación de nitrógeno (Müller *et al.*, 2001; Streeter, 1985); en este sentido es importante señalar que encontramos a partir de 7 días posteriores a la inoculación una expresión de los genes *treSpf*, *treY* y *otsB* y a los 14 días se observó también la expresión del gen *treZ*; en conjunto lo anterior nos indica que las vías de síntesis de trehalosa están activas durante la interacción de *R. etli* con raíces de *P. vulgaris*; como es ya conocido, durante la interacción simbiótica planta-rhizobio la bacteria requiere realizar ajustes fisiológicos como la adaptación de un ambiente bajo en oxígeno para el desarrollo óptimo de la FBN, lo cual puede significar que la bacteria utiliza este disacárido como un recurso energético (dada la demanda de una alta cantidad de ATP para la realización de la FBN) o como un osmolito protector.

A diferencia de lo anterior, la expresión de *thuApf* fue evidente solo después de 21 días posteriores a la infección, y adicionalmente, pudo observarse que la expresión de los genes de biosíntesis de este disacárido como *otsAch*, *treY* y *treZ* disminuyó tanto en raíces como en los nódulos por lo que, en este sentido, parece ser que una vez formada esta estructura en las raíces, la bacteria activa la vía de degradación de este disacárido probablemente para la obtención de energía proveniente de trehalosa.

Un punto importante a considerar es que, en el presente estudio, evaluamos cualitativamente la expresión durante la interacción en tiempos determinados (7, 14 y 21 días), por lo que no identificamos en qué etapa de la interacción se formaron los nódulos y por ende no sabíamos cuánto tiempo tenían de haberse formado, por lo cual será necesario como perspectivas, la determinación de formación de nódulos a los 7, 14 y 21 días y en qué etapa específica del proceso infectivo inicia la expresión de dichos genes, la cual podría realizarse a través de un ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

- *Análisis cuantitativo bajo condiciones de estrés osmótico*

Se obtuvo la cuantificación en unidades de nano moles de PNPG degradado por minuto por miligramo de proteína de cada una de las fusiones transcripcionales a 0, 50 y 100 mM de NaCl a las 24 y 48 h, de la cual se observó una expresión diferencial de cada uno de los genes. Particularmente el gen *otsA* de cromosoma y plásmido mostró la mayor expresión a las 24 y 48 h en cada una de las concentraciones de NaCl; *otsB* y *treZ*, por el contrario, mostraron una menor expresión en cada una de las condiciones probadas en el presente estudio; el gen *thuApf* mostró una expresión baja a una concentración de NaCl 100 mM (figs. 30 y 31).

Con lo observado a partir del ensayo de expresión en caja de Petri, se puede corroborar que, el gen *otsA* está activo durante el crecimiento bacteriano bajo una condición de estrés salino, mismo que ha sido reportado en anteriores trabajos (Reina-Bueno *et al.*, 2012); en *B. japonicum* a través de la mutación de los genes *otsAB* se determinó que la ruta OtsAB es la principal vía activa de biosíntesis de trehalosa cuando el rhizobio se encuentra bajo estrés salino (Sugawara *et al.*, 2010). Para el caso de *R. etli* CFN 42 de igual forma puede significar que al estar en una condición de estrés salino, el rhizobio activa preferentemente esta vía para la biosíntesis de trehalosa el cual funcionaría como un osmolito protector aunado al hecho de que el gen de degradación evaluado en este estudio (*thuApf*) no mostró una expresión activa (24 y 48 h).

En *R. tropici* CIAT 899 (una cepa rhizobial capaz de desarrollar factores de nodulación bajo condiciones de estrés salino) a través de un análisis transcriptómico por RNA-seq se observaron niveles de expresión altos de los genes *thuAB* cuando la bacteria fue sometida a estrés por sal señalando una posible estrategia que esta bacteria emplea para degradar trehalosa durante la interacción planta-rhizobio. Cabe destacar que en dicho estudio no se menciona una baja expresión de los genes de biosíntesis del disacárido trehalosa, pero sí de aquellos involucrados en el transporte a través de membranas y genes involucrados en el exporte de polisacáridos indicando que esta cepa disminuye drásticamente la utilización de moléculas para consumo de energía (Pérez-Montaña *et al.*, 2016). En un análisis transcriptómico

ahora en *R. etli* CE3 se mostró una sobre expresión de genes involucrados en el metabolismo de solutos compatibles durante crecimiento bajo estrés salino (López-Leal *et al.*, 2014). Recientemente, en un análisis proteómico, se reportó que el gen *otsA* presenta un nivel de expresión importante durante la interacción de *R. leguminosarum* bv *viciae* UPM791 con *Pisum sativum*; en dicho análisis únicamente se reporta la actividad de este gen (Durán *et al.*, 2021). Tomando a consideración lo que ha sido reportado para otros Rhizobios y los resultados obtenidos en el presente estudio, las estrategias que estas bacterias siguen para contrarrestar el estrés abiótico son muy diversas echando mano de la importante batería génica del regulón de trehalosa tanto en vida libre como en la interacción con las raíces de leguminosas.

#### - *Análisis filogenético*

Ha sido ampliamente descrito que el disacárido trehalosa es encontrado en muchos sistemas biológicos, desde bacterias, levaduras, plantas y animales; particularmente en bacterias se ha descrito por participar en la respuesta a distintos tipos de estrés, por lo que en el presente trabajo realizamos el análisis filogenético de los genes del metabolismo de trehalosa en bacterias de clases  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ -proteobacterias. *R. etli* CFN 42 cuenta con un par de algunos de los genes del regulón de trehalosa (*otsA*, *treS* y *treZ*); se ha propuesto que la diversificación y distribución de estos genes puede deberse a mecanismos como la transferencia horizontal de genes como fue reportado para el caso del gen *otsA* del plásmido a (Reina-Bueno *et al.*, 2012); en el presente trabajo encontramos algo similar para el par de copias de los genes *treS* y *treZ*, en el que en ambos casos los genes se encontraban alejados en la distribución filogenética. Si bien esto no es un indicio marcado de que alguna de las copias de ambos genes haya sido adquirida por un mecanismo de intercambio génico, sí es posible intuir sobre un origen de la adquisición distinto de estos genes en *R. etli* CFN 42.

- *Análisis de la región promotora*

El genoma de *R. etli* CFN 42 cuenta con un factor *rpoD* o  $\sigma^{70}$ , dos copias del factor *rpoN* ( $\sigma^{54}$ ), dos copias del factor *rpoH* ( $\sigma^{32}$ ) y 18 genes de un grupo de factores extracitoplasmicos (González *et al.*, 2006). Mediante el análisis de la región promotora de los genes evaluados en el presente trabajo, fue posible identificar bajo qué factor posiblemente se encuentran regulados los genes en estudio. En la región promotora de *otsApa*, *treSch* y *treZ* se identificó la secuencia de reconocimiento del factor *rpoD*, por lo que parece ser que estos genes están bajo el control de este factor. En el caso del gen *otsApa* esto resulta distinto a lo que fue reportado para el operón *otsAB* en *E. coli*, el cual está bajo el control de *rpoS* (Hengge-Aronis, *et al.*, 1991); parece ser que en *R. etli* CFN 42 dicho gen no está bajo el control del factor de respuesta a estrés; aunque esta idea no es del todo clara puesto que, bajo la condición de estrés térmico y osmótico, *otsApa* sí tuvo una expresión notoria (figs. 27, 28 y 30). En este sentido, es probable que, aunque el gen pueda ser expresado bajo condiciones de estrés, también está bajo el control de un factor de mantenimiento principal y que su función es activa aun cuando la bacteria no se encuentre sometida a estrés. Para el caso de *treSch* y *treZ* la idea de que estén bajo el control de *rpoD* sí concuerda con lo reportado en este estudio puesto que su expresión bajo condiciones de estrés no es marcada a diferencia de la expresión de otros genes (fig. 27).

La copia del gen *otsA* del cromosoma a diferencia del gen *otsApa*, parece estar regulada por el factor de transcripción *rpoN*, el cual se encarga de la regulación de genes del metabolismo de nitrógeno. Lo anterior resulta interesante puesto que como se ha indicado anteriormente, parece ser que ambos genes tienen un origen filogenético distinto lo cual podría suponer una función alterna dependiendo de las necesidades celulares según sea el ambiente en el que se encuentre la bacteria.

Uno de los reguladores identificados en la secuencia intergénica del gen *otsApa* fue *fnr* (FNR, regulación de nitrato y fumarato) el cual se ha descrito por ser un regulador transcripcional de respuesta al oxígeno, es decir es requerido para pasar de un metabolismo aeróbico a un anaeróbico (Unden y Schirawski, 1997); como se sabe,



para el adecuado funcionamiento de la nitrogenasa es necesario un ambiente anaeróbico, por lo que es probable que *otsApa* esté involucrado en la transición de un estado aeróbico a uno anaeróbico puesto que participa en una vía de síntesis de trehalosa (un disacárido de protección ante el estrés).

## 10. CONCLUSIONES

- La expresión de los genes de síntesis de trehalosa es activa cuando la bacteria es sometida a crecimiento a una temperatura más alta que la temperatura óptima.
- Bajo la condición de estrés salino (100 mM NaCl) solo los genes *otsApa* y *treSpf* presentan expresión.
- En medio mínimo, con trehalosa como única fuente de carbono, los genes de síntesis del disacárido se activan progresivamente.
- El gen *otsApa* se expresa de manera activa bajo estrés salino (100 mM de NaCl).
- Las vías de síntesis de trehalosa están activas en la interacción *Rhizobium etli*-*P. vulgaris*.
- *R. etli* CFN 42 cuenta un par de genes *otsA*, *treS* y *treZ*, los cuales no están relacionados filogenéticamente indicando un posible mecanismo de adquisición por transferencia horizontal de genes.
- Los genes del metabolismo de trehalosa en *R. etli* CFN 42 parecen estar bajo el control de factores de transcripción como *rpoD* y *rpoN*.

## 11. PERSPECTIVAS

- Realizar la mutación de los genes estudiados en el presente trabajo para analizar el efecto de su eliminación en la relación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa.
- Mediante búsqueda en bases de datos, identificar los posibles activadores y represores en la unidad promotora de los genes *otsA*, *otsB*, *treY*, *treZ*, *treS* y *thuA*.
- Determinar la formación de nódulos a los 7, 14 y 21 días y en qué etapa específica del proceso infectivo inicia la expresión de los genes evaluados en este trabajo a través de ensayos de qRT-PCR.

## 12. LITERATURA CONSULTADA

- Ampomah, O., Avestlsyan, A., Hansen, E., Svenson, J., Huser, T., Jensen, J. and Bhuvaneshwarl. (2013). The *thuEFGKAB* operon of *Rhizobia* and *Agrobacterium tumefaciens* codes for transport of trehalose, maltitol, and isomers of sucrose and their assimilation through the formation of their 3-keto derivatives. *Journal of bacteriology*, 195(17), 3797-3807. doi: 10.1128/0924-6460.00478-13.
- Ampomah, O. and Jensen, J. (2014). The Trehalose utilization gene *thuA* ortholog in *Mesorhizobium loti* does not influence competitiveness for nodulation on *Lotus* spp. *World Journal Microbiological Biotechnology*, 30, 1129-1134. doi: 10.1007/s11274-013-1527-6.
- Ampomah, O., Jensen, J. and Bhuvaneshwari, T. (2008). Lack of trehalose catabolism in *Sinorhizobium* species increases their nodulation competitiveness on certain host genotypes. *New Phytologist*, 179, 495-504.
- Andersson, U., Levander, F. and Radstrom, P. (2001). Trehalose-6-phosphate phosphorylase is part of a novel metabolic pathway for trehalose utilization in *Lactococcus lactis*. *Journal of biological chemistry*, 276, 42707-42713.
- Bartels, D. and Sunkar, R. (2005). Drought and salt tolerance in plants. *Critical reviews in Plant Science*, 24:23-28. doi: 10.1080/07352680590910410.
- Bignell, D., Huising, J. y Moreira, F. (2011). Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. En F. Moreira (Ed.), *Manual de biología de suelos tropicales* (177-216). México, D. F., México: Instituto Nacional de Ecología.
- Boss, W., Ehmann, U., Bremer, E., Middendorf, A. and Postma, P. (1987). Trehalase of *Escherichia coli*. Mapping and cloning of its structural gene and identification of the enzyme as a periplasmic protein induced under high

osmolarity growth conditions. *Journal of biological chemistry*, 264(27), 13212-13218.

- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248-254.
- Broughton, W., Jabbouri, S. and Perret, X. (2000). Keys to symbiotic harmony. *Journal of bacteriology*, 182(20), 5641-5652. doi: 0021-9193/00/\$04.00+0.
- Campbell, E., Westblade, L. and Darst, S. (2008). Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 11:121-127. doi: 10.1016/j.mib.2008.02.016.
- Clegg, J. (2001). Cryptobiosis – a peculiar state of biological organization. *Elsevier science Inc.*, 128(2001), 613-624.
- Crowe, J., Crowe, L., Oliver, A., Tsvetkova, N., Wolkers, W. and Tablin, F. (2001). The trehalose myth: Introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology*, 43, 89-105. doi: 10.1006/cryo.2001.2353.
- Cytryn, E., Sangurdekar, D., Streeter, J., Franck, W., Chang, W., Stacey, G., Emerich, D., Joshi, T., Xu, D. and Sadowsky, M. (2007). Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. *Journal of Bacteriology*, 189(19), 6751-6762. doi: 10.1128/JB.00533-07.
- de Ávila, S., Echeverrigaray, S. and Gergardt. (2011). BacPP: bacterial promoter prediction- A tool for accurate sigma-factor specific assignment in enterobacteria. *Journal of Theoretical Biology*, 287(2011), 92-99. doi: 10.1016/j.tbi.2011.07.017.

- Dixon, R. and Kahn, D. (2004). Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature reviews*, 2, 621-631. doi: 10.1038/nrmicro954.
- Djordjevic, M. (2004). *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: a proteomic perspective. *Proteomics*, 4, 1859-1872. doi: 10.1002/pmic.200300802.
- Domínguez-Ferreras, A., Soto, M., Pérez-Arnedo, R., Olivares, J. and Sanjuán, J. (2009). Importance of trehalose biosynthesis for *Sinorhizobium meliloti* osmotolerance and nodulation of Alfalfa roots. *Journal of Bacteriology*, 191(24), 7490-7499. doi: 10.1128/JB.00725-09.
- Durán, D., Albareda, M., García, C., Marina, A., Ruíz-Argüeso, T. and Palacios, J. (2021). Proteome analysis reveals a significant host-specific response in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* endosymbiotic cells. *Molecular Cell Proteomics*, 20(100009). doi: 10.1074/mpc.RA120.002276.
- Elbein, A., Pan, Y., Pastuszak, I. and Carroll, D. (2003). New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology*, 13(4), 17-27. doi: 10.1093/glycob/cwg047.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Fahraeus, B. (1957). The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by simple glass slide technique. *J. Gen Microbiolol*, 16, 374-381.
- Freeman, B., Chen, C. and Beattie, G. (2010). Identification of the trehalose biosynthetic loci of *Pseudomonas syringae* and their contribution to fitness in the phyllosphere. *Environmental microbiology*, 12(6), 1486-1497. doi: 10.1111/j1462-2920.2010.02171.x.

- Gage, D. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300. doi: 10.1128/MMBR.68.2.280-300.2004.
- Galinski, E. and Herzog, R. (1990). The role of trehalose as a substitute for nitrogen-containing compatible solutes (*Ecthioorhodospira halochloris*). *Archives of Microbiology*, 153, 607-613.
- Gao, M., Benge, A., Wu, T. and Javier, R. (2019). Use of plasmid pVMG to make transcriptional  $\beta$ -glucuronidase reporter gene fusions in the *Rhizobium* genome for monitoring the expression of Rhizobial genes in vivo. *Biological procedures online*, 21(8). doi: 10.1186/s12575-019-0096-y.
- Garg, N. and Renseigné, N. (2006). Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signalling. A review. *Agronomy for sustainable development*, 27, 59-68. doi: 10.1051/agro.2006030.
- González, V., Santamaría, R., Bustos, P., Hernández-González, I., Medrano-Soto, A., Moreno-Hagelsieb, G., Chandra, S., Ramírez, M., Jiménez-Jacinto, V., Collado-Vides, J. and Dávila, G. (2006). The partitioned *Rhizobium etli* genome: Genetic and metabolic redundancy in seven interaction replicons. *Protocols of National Academy of Sciences of the USA*, 103(10), 3834-3839. doi: 10.1073/pnas.0508502103.
- Gruber, T. and Gross, C. (2003). Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annual Reviews of Microbiology*, 57, 441-466. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090913.
- Harley, C. and Reynolds, R. (1987). Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Research*, 15(5), 2343-2361.

- Hengge-Aronis, R., Klein, W., Lange, R., Rimele, M. and Boos, W. (1991). Trehalose synthesis genes are controlled by the putative sigma factor encoded by *rpoS* and are involved in stationary-phase. *Journal of bacteriology*, 173(24), 7918-7924.
- Hino, A., Mihara, K., Nakashima, K. and Takano, H. (1990). Trehalose levels and survival ratio of freeze-tolerant versus freeze-sensitive yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5), 1386-1391.
- Jefferson, R., Burgess, S. and Hirsh, D. (1986).  $\beta$ -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8447-8451.
- Jensen, J., Ampomah, O., Darrah, R., Peters, N. and Bhuvaneswari, T. (2005). Role of Trehalose Transport and Utilization in *Sinorhizobium meliloti*-Alfalfa Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 18(7), 694-702. doi: 10.1094/MPMI-180694.
- Kumar, A. Malloch, R. Fujita, N., Smillie, D., Ishihama, A. and Hayward, R. (1993). The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is inessential for initiation of transcription at an 'Extended minus 10' promoter. *Journal of Molecular Biology*, 232, 406-418.
- Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG 2020. <https://www.genome.jp/kegg/>.
- Lin, H., Deng, E., Ding, H., Chen, W. and Chou, K. (2014). iPro54-PseKNC: a sequence-based predictor for identifying sigma-54 promoters in prokaryote with pseudo *k*-tuple nucleotide composition. *Nucleic Acids Research*, 42(21), 12961-12972. doi: 10.1093/nar/gku1019.



- Lonetto, M., Gribskov, M. and Gross, C. (1992). The  $\sigma^{70}$  family: sequence conservation and evolutionary relationships. *Journal of Bacteriology*, 174(12), 3843-3849.
- López-Leal, G., Tabche, M., Castillo-Ramírez, S., Mendoza-Vargas, A., Ramírez-Romero, M. and Dávila, G. (2014). RNA-seq analysis of the multipartite genome of *Rhizobium etli* CE3 shows different replicon contributions under heat and saline shock. *BioMed Central*, 15(770). doi: 1471-2164/15/770.
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14<sup>a</sup> ed.). Madrid, España: PEARSON EDUCACIÓN, S. A.
- Maruta, K., Nakada, T., Kubota, M., Chaen, H., Sugimoto, T., Kurimoto, M. and Tsujisaka, Y. (1995). Formation of trehalose from maltooligosaccharides by a novel enzymatic system. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59(10), 1829-1834.
- Masson-Boivin, C. and Sachs, J. (2018). Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia – the roots of a success story. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 7-15. doi: 10.1016/j.pbi.2017.12.001.
- McIntyre, H., Davies, H., Hore, T., Miller, S., Dufour, J. and Ronson, C. (2007). Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(12), 3984-3992. doi: 10.1128/AEM.00412-07.
- Metcalf, W. and Wanner, B. (1993). Construction of new  $\beta$ -glucuronidase cassettes for making transcriptional fusions and their use with new methods for allele replacement. *Gene*, 129, 17-25.

- Müller, J., Boller, T. and Wiemken, A. (2001). Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 943-947.
- Paul, M., Primavesi, L., Jhurrea, D. and Zhang, Y. (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annual review of plant biology*, 59(1), 417-441. doi: 10.1146/annurev.arplant.59.03.
- Pérez-Montaña, F., del Cerro, P., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F., Cubo, M., Hungria, M., Megías, M. and Ollero, F. (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(198). doi: 10.1186/s 1286/4-016-2543-3.
- Perret, X., Staehelin, C. and Broughton, W. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201. doi: 1092-2172/00/\$04.00+0.
- Qu, Q., Lee, S. and Boos, W. (2004). TreT, a novel trehalose glycosyltransferring synthase of the hyperthermophilic Archaeon *Thermococcus litoralis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(46), 47890-47897. doi: 10.1074/jbc.M404955200.
- Ramírez-Trujillo, J., Encarnación, S., Salazar, E., García de los Santos, A., Dunn, M., Emerich, D., Calva, E. and Hernández-Lucas, I. (2007). Functional characterization of the *Sinorhizobium meliloti* acetate metabolism genes *aceA*, *SMc00767*, and *glcB*. *Journal of bacteriology*, 189(16), 5875-5884. doi: 10.1128/JB.00385-07.
- Rees, D., Tezcan, F., Haynes, C., Walton, M., Andrade, S., Einsle, O. and Howard, J. (2005). Structural basis of biological nitrogen fixation. *Philosophical transactions of the royal society*, 363, 971-984. doi: 10.1098/rsta.2004.1539.

- Reina-Bueno, M., Argandoña, M., Nieto, J., Hidalgo-García, A., Iglesias-Gerra, F., Delgado, M. and Vargas, C. (2012). Role of trehalose in heat and desiccation tolerance in the soil bacterium *Rhizobium etli*. *BioMed Central*, 12(207). doi: 10.1186/1471-2180-12-207.
- Saitou, N. and Masatoshi, N. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology Evolutionary*, 4(4), 406-425.
- Sakaguchi, M. (2020). Diverse and common features of trehalases and their contributions to microbial trehalose metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi: 10.1007/s00253-019-10339-7.
- Sessitsch, A., Howieson, J., Perret, X., Antoun, H. and Martínez-Romero, E. (2002). Advances in *Rhizobium* research. *Critical reviews in Plant Science*, 21(4), 323-378. doi: 0735-2689/02/\$50.
- Shamseldin, A., Nyalwidhe, J. and Werner, D. (2006). A proteomic approach towards the analysis of salt tolerance in *Rhizobium etli* and *Sinorhizobium meliloti* strains. *Current microbiology*. doi: 10.1007/s00284-005-6472-7.
- Shanker, A. and Venkateswarlu, B. (2011). Abiotic stress in plants-mechanisms and adaptations. *Intech*.
- Solovyev, V. and Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. *Metagenomics and its Applications in Agriculture*.
- Streeter, J. (1985). Accumulation of  $\alpha,\alpha$ -Trehalose by *Rhizobium* bacteria and bacteroids. *Journal of Bacteriology*, 164(1), 78-84. doi: 100078-07\$02.00/0.

- Suárez, R., Raya, P. e Iturriaga, G. (2015). La trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. *Ciencia y tecnología agropecuaria*, 3(1), 1-13.
- Suárez, R., Wong, A., Ramírez, M., Barraza, A., Orozco, M., Cevallos, M., Lara, M., Hernández, G. and Iturriaga, G. (2008). Improvement of Drought Tolerance and Grain Yield in Common Bean by Overexpressing Trehalose-6-Phosphate Synthase in Rhizobia. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(7), 958-966. doi: 10.1094/MPMI-21-7-0958.
- Sugawara, M., Cytryn, E. and Sadowsky, J. (2010). Functional role of *Bradyrhizobium japonicum* trehalose biosynthesis and metabolism genes during physiological stress and nodulation. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(4), 1071-1081. doi: 10.1128/AEM.02483-09.
- Uden, G. and Schirawski, J. (1997). The oxygen-responsive transcriptional regulator FNR of *Escherichia coli*: the search for signals and reaction. *Molecular Microbiology*, 25(2), 205-210.
- Welsh, D. (1999). Ecological significance of compatible solute accumulation by micro-organisms: from single cells to global climate. *Federation of European Microbiological Societies*, 24(2000) 263-290.
- Wosten, M. (1998). Eubacterial sigma-factors. *Federation of European Microbiology Societies*, 22, 127-150.

## 13. ANEXOS

### 13.1 Medios de cultivo y protocolos

#### Medio Peptona Yeast Calcio (PYCa) (1 litro)

Peptona	6 g
Extracto de levadura 0.5 %	3 g
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.5 g

#### Medio Luria Bertanie líquido (LB) (1 litro)

Peptona	6 g
Extracto de levadura 0.5 %	3 g

#### Medio mínimo M9 (1 litro)

Añadir a 750 ml de H<sub>2</sub>O:

<b>*5x M9 salts</b>	200 ml
MgSO <sub>4</sub> 1M	2 ml
Solución de fuente de carbono apropiada (20%)	20 ml
CaCl <sub>2</sub> 1M	0.1 ml
Aforar a 1 L con H <sub>2</sub> O	

#### \* 5x M9 salts (diluir las siguientes sales a un volumen final a 1 L)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	64 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15 g
NaCl	2.5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5.0 g

### **Preparación de Cajas Petri con medio mínimo M9 (10 cajas)**

5x M9 salts	50 ml
MgSO <sub>4</sub> 1 M	0.5 ml
CaCl <sub>2</sub> 1 M	0.025 ml
Agar más H <sub>2</sub> O (3.7 gr en 200 ml)	200 ml
Fuente de carbono al 20%	5 ml

**\* agregar a cada caja Petri la cantidad requerida de NaCl**

### **Ensayo de actividad GUS**

1. Tomar 1 ml de cultivo.
2. Centrifugar y tirar sobrenadante (en este punto se puede almacenar a -70° C).
3. Resuspender en 1 ml de 1x M9-salts cloranfenicol 100 µg/ml.
4. Adicionar 30 µl de SDS 0.1% y 60 µl de cloroformo.
5. Mezclar por Vortex 10 segundos.
6. Dejar en reposo 5 min hasta que se hayan separado dos fases.
7. En tubos Eppendorf limpios agregar 400 µl de buffer GUS y colocarlos en incubadora a 37°C para calentar el buffer.
8. Agregar a los tubos con buffer GUS 100 µl de células permeabilizadas (cuidando de no tomar cloroformo).
9. Mantener los tubos en incubación a 37°C.
10. Tomar 100 µl a las 24 y 48 h y colocarlos en tubos que contengan 800 µl de carbonato de sodio 0.4 M (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>).
9. Realizar mediciones por espectrofotómetro a 405nm.

### **Calculo**

- Para cada muestra graficar la DO<sub>405</sub> (eje Y) contra tiempo (eje X), calcular la pendiente (**S**) de la gráfica en unidades de DO<sub>405</sub> por minuto.
- La velocidad de reacción (**R**) en nanomoles por minuto por mg de proteína se calcula de la siguiente manera:

$$R = S / (0.02 * V * \text{mg de proteína})$$

V es el volumen del ensayado. En este protocolo V = 0.02 ml.

### Cuantificación de proteína

1. Tomar 1 ml de cultivo
2. Centrifugar y tirar sobrenadante (en este punto se puede almacenar a -70° C).
3. Resuspender en 1 ml de TCA 5% y centrifugar 10 min a 10 mil rpm.
4. Desechar sobrenadante y resuspender en 100 µl de NaOH 0.4 M.
5. Determinar curva patrón:

Tubo	BCA	H <sub>2</sub> O	Reactivo Bradford
1	0 µl	800 µl	200 µl
2	1 µl	799 µl	200 µl
3	2 µl	798 µl	200 µl
4	4 µl	796 µl	200 µl
5	8 µl	792 µl	200 µl
6	16 µl	784 µl	200 µl

\* leer en espectrofotómetro a 595 nm

6. En tubos Eppendorf independientes, agregar 790 µl de H<sub>2</sub>O más 10 µl de muestra y leer a 595 nm.

### 13.2 Soluciones

1x M9-salts (diluir las siguientes sales a un volumen final a 1 L)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	6.4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
NaCl	0.25 g
NH <sub>4</sub> Cl	0.5 g

### Buffer Gus

Buffer fosfatos de potasio	50 Mm pH 7.0
DTT	5 mM
EDTA	1 mM
<b>*Antes de usar adicionar 12.5 µl de pNPG</b>	100 mM por ml

### Solución Fahraeus

	gr/L
Fosfato de potasio monobásico	0.2
Fosfato di-potásico	0.2
Cloruro de sodio	0.2
Cloruro de calcio	0.17
Sulfato de magnesio	0.54
Citrato férrico	0.1

### Oligoelementos

Ácido bórico	2.86
Sulfato de manganeso	2.03
Sulfato de zinc	0.22
Sulfato de cobre	0.08
Molibdato de sodio	0.08
Agar (0.75 %)	





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)

Dr. Mario Ramírez Yáñez (CCG UNAM)

Tesis: **"Análisis de la expresión de los genes del metabolismo de trehalosa de *Rhizobium etli* CFN 42 en condiciones de vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Ramsses Carlos Carrillo**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DR. JOSÉ AUGUSTO RAMÍREZ TRUJILLO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

JOSE AUGUSTO RAMIREZ TRUJILLO | Fecha:2022-03-22 09:27:03 | Firmante

xV+52iKtZVq9yhwrri8rL0GVM16x9FdcxUXYwUaP873Hj2Qrtb8CcuPKY89zx+hZ8K27TkdGgmEOzG+Vh/ldH8/k0yarl3NmRmvN/QwfgES+n01SwyHdEIDTo/XvzWwJhbSC4Qh7a0dHHv5UEZH+Tile1Gv04+XJOeJuaOdzthiw2Tld056p/hyq1uNuhJVJzbn9PzqJYUwPS6Fmi6o2hnhK6ec+xZZzRKTmMSPRa1vMTcwoXxKsXecNNOV2W7SywwtuTrNWK9E88x7aR0jO84Ez8HNZZv8kEx1xKCLml5z3Qgv2ozMh1VBh8D7Sb4ciV/7ungd2YYRJ+9hfh3A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[2olUEaiju](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/NplQz7SGMr2urSyZjErCujb0ZihJRjj3>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)

Dr. Mario Ramírez Yáñez (CCG UNAM)

Tesis: **"Análisis de la expresión de los genes del metabolismo de trehalosa de *Rhizobium etli* CFN 42 en condiciones de vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Ramsses Carlos Carrillo**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DR. RAMÓN SUÁREZ RODRÍGUEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**RAMON SUAREZ RODRIGUEZ | Fecha:2022-03-22 11:17:42 | Firmante**

ewVPoQHoiT/4j9Givx+WNaoE8/iSvf7m80Z3R//EOHkOisCdEPnrptcmA62YxuXXKvI4D0Frs6EmpMjNgzAU0A05KDaVgVRlXigYw4aPvC0qCwCLakVyeyZII88cr5X6mBNBaONtfz  
Z3Er8FGLY6UfHhNH/4Z4aueemtw1sU1LEhud3LFe5GrZ21maawF1Y3435pzYkILX7da0Tht0TEUuttPoZrCzINNagcYkHsA2zkoyh5ZDeDo4DffhPwunGE3Pwo6xtyDsADCXG/u9  
Mlv1u1i1d7oD6C63iOBocnZr+vkGT/ZWjNOG+mkb9S2ig2o7YzrEPQlyvUoXXAXco/A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o  
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[N9EynmdJc](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/V9D3Kp4rzlyagXyMQwiXY2zpxrZkwets>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)

Dr. Mario Ramírez Yáñez (CCG UNAM)

Tesis: **"Análisis de la expresión de los genes del metabolismo de trehalosa de *Rhizobium etli* CFN 42 en condiciones de vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Ramsses Carlos Carrillo**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DRA. VERÓNICA OBREGÓN BARBOZA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

VERONICA OBREGON BARBOZA | Fecha:2022-03-22 11:33:47 | Firmante

EwAt0cMHw/tAqLZ2E91wpYN0ME7wl/9kteze8UztoONrFpWWMS/VBcyclofNvurrl26KxyOTFijB+oHZIbG4OostF6RIJ/u9P8jTpg6+BGs/pONJ1UokJKCiYb+dY+jB+cwmWsWiAiboJK3KgWB1EBcD7ri30ih+wxM8D2EJBy5tQQ7j91Yh8oTwU4bzwDI/CQ9lwckuN8OEo2XHwokrHF85+0a8qjyA5CtVx0uEnbtPPT8Qd6t6sHSAeCeRMdjtJNHZ/8YsUPN+T3viGuvL+mqT67Ns2NaB2shCEAnrTo1LICIbNB13OZflzEPR8skylJziGNiFEr1ijxvUxu/kioew==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[E30mclqY5](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/gzd8DElogGN9nBu90WxY5KD2okh5I9RW>





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)

Dr. Mario Ramírez Yáñez (CCG UNAM)

Tesis: **"Análisis de la expresión de los genes del metabolismo de trehalosa de *Rhizobium etli* CFN 42 en condiciones de vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Ramsses Carlos Carrillo**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DR. EDGAR DANTÁN GONZÁLEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**EDGAR DANTAN GONZALEZ** | Fecha:2022-03-17 08:05:18 | Firmante

X0dVFI2ti2mu3JuvL85ut43iaGiZRT8Fpz74BylVNbb5Y/f9BkcR1UwcY56GLnPmGFtRGY/mawCDGKRD8syMI2Ps7ysZsn9UHdGVAVwTGO3zWUAGs1EFiGNyp/ifCTEJp2uSgwD/uyF1feLLdlehaf44nje7iBQ9Fb5F0qc85NIRxh09UNyrAN08LbQmNKMIU6YEuMFDFJVJUVMVovT0L5vwmKBj+bd09iBgh4kDSI3ElmEUonqWPJpiOijomPgBIDSqzzi8A6LcZ5WPEt9MFRZOW0ni4LW3hrMVLrDQrvTJIEZWmjJyVkAgXmKua+MEQBx3VLQ2Z6EMmB7TIsq==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[c4C37ZHws](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/eptVGZC6PNJbi24snhiRNvWYgtjC29c>







UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Cuernavaca, Morelos, a 11 de marzo del 2022.

### COMITÉ DE REVISIÓN DE TESIS

Dr. José Augusto Ramírez Trujillo (director de tesis, CEIB UAEM)

Dr. Ramón Suárez Rodríguez (CEIB UAEM)

Dra. Verónica Obregón Barboza (CEIB UAEM)

Dr. Edgar Dantán González (CEIB UAEM)

Dr. Mario Ramírez Yáñez (CCG UNAM)

Tesis: **"Análisis de la expresión de los genes del metabolismo de trehalosa de *Rhizobium etli* CFN 42 en condiciones de vida libre y en simbiosis con *Phaseolus vulgaris*"**

Alumno que lo presenta a revisión: **Daniel Ramsses Carlos Carrillo**

Programa: **Maestría en Biotecnología**

### VOTO

El documento ha sido revisado y reúne los requisitos para editarse como TESIS por lo que es

**APROBADO**

ATENTAMENTE

---

DR. MARIO RAMÍREZ YÁÑEZ



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**MARIO RAMÍREZ YAÑEZ** | Fecha:2022-03-17 14:40:11 | Firmante

OpZr/2F0q+4GfINTtRWxyGjN7rgWsSiyR/Tb88Mhj+yX/3BUQBoJR9mdglKHEG4wD1WIZ/J5plpoBlwnsTiHTiXEFPM0JThXSJuGf3P3QMeVtcEBg2gKVyeazSgZUdrXChfV3FBrk8bay9lr55XOdNGcQ+/N+8Cp0hp3NrJ8ErQLVwp9SUMUzOOZH421gpMB/JvdWQHay9S4nwwNN7svm/4i5qN64uCXgxbWTU8wik46JfJmA1C3Vdjh1F1YLoS9WL3AH3lHkQLsiNsES5sGdKNquF7ftKrXH9Hujlb2IhuLAINBhOxo6LTMUyF3Uu6cAiaNpwEu+kFX5n5p1Zg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[EXDVsbzo7](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3Mje9Q2S3KhZsTVJSAifl7wNAXJttxei>

