



FRACCIONAMIENTO Y RECUPERACIÓN DE ORGANELOS CELULARES Y BACTERIOIDE A PARTIR DE NÓDULOS DE *RHIZOBIUM* EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*) NEGRO JAMAPA PARA ESTABLECER LA RELACIÓN EN ACUMULACIÓN DE DERIVATIVOS DE FOLATOS CON LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO.

Wendy Berdeja Zamudio, Rocío Díaz de la Garza, Jorge Benavides-Lozano y Perla Ramos. Tecnológico de Monterrey, Escuela de ingeniería y ciencias, Monterrey N.L. 64849, A00824059@itesm.mx

Palabras clave: Fijación de nitrógeno, bacteroide y folatos.

Introducción.

La fijación de nitrógeno atmosférico (N_2) en leguminosas se lleva a cabo a través de la simbiosis con microorganismos fijadores conocidos como Rizobacterias. La bacteria penetra en la raíz formando nódulos y convirtiéndose en un bacteroide. En leguminosas como el frijol, el bacteroide transforma N_2 en amoníaco (NH_3) y después este es metabolizado a ureidos por la planta (1). La producción de ureidos necesita de la biosíntesis *de novo* de purinas, la cual requiere de cofactores derivados del tetrahidrofolato (THF) conocidos como "folatos". Previamente se ha sugerido que la reserva de folatos en la simbiosis podría tener un impacto directo en la fijación de nitrógeno (2). En plantas, la ruta biosintética de folatos es altamente compartimentada, la síntesis *de novo* ocurre en mitocondria, plástidos y citosol. Por otro lado, la síntesis *de novo* de purinas se da principalmente en plástidos y en mitocondria en células infectadas (3).

Objetivo: Establecer una metodología eficiente basada en gradientes de densidad y/o dos fases acuosas (ATPS) para optimizar el fraccionamiento de bacteroide, plástidos y mitocondria a partir de nódulos de *Rhizobium etli* en frijol negro Jamapa para la caracterización de los derivados de folatos.

Metodología. En el fraccionamiento de bacteroide se utilizó un gradiente con 5 concentraciones de Percoll (82, 72, 60, 45 y 30%) (4); en mitocondria se utilizó un gradiente con 2 concentraciones de Percoll (40 y 21%) (5). Se evalúa la partición de los compartimentos de interés en ATPS, Polietilenglicol 3350 – Dextrano T500, con un peso total de 5 g y con longitudes de línea de corte (LLC) de 19 y 25 %. Se realizaron reacciones enzimáticas para determinar la identidad y pureza, para plástidos con el ensayo NADP-GAPDH, fumarasa para mitocondrias y β -hidroxibutirato deshidrogenasa para bacteroide. La determinación de folatos se realiza a través de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a un detector electroquímico (6).

Resultados. Dos fracciones fueron aisladas; una de 70-82% de Percoll correspondiente al bacteroide y una fracción de 60-70% constituida por una mezcla entre bacteria en transición y bacteroide. Se determinó el perfil de folatos y se compararon sus contenidos así como con los del extracto de los nódulos de procedencia. s. En la

Figura 1 se muestra que el perfil de folatos es muy similar entre las muestras evaluadas, siendo predominante la especie 5- CH_3 -THF (60%). Además, Se puede observar que el bacteroide solo aporta de 16 a 20% de los folatos totales presentes en el extracto de nódulo.

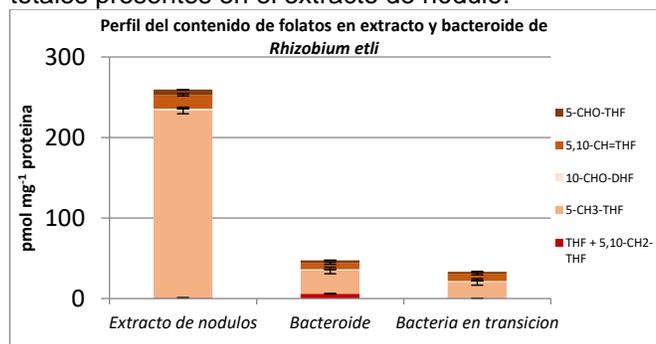


Fig. 1. Perfil de las especies de folatos presentes en extracto, bacteroide y bacteria en transición de nódulos de *Rhizobium etli* en frijol negro Jamapa.

Los resultados preliminares en mitocondria muestran que acumula principalmente 10-CHO-DHF (30-55%) y que la acumulación de 5- CH_3 -THF es menor del 40%, Un perfil de folatos diferente al observado en bacteroide.

Conclusiones. Se puede inferir que alrededor de un 80% de los folatos en el nódulo se están acumulando en compartimentos de la célula vegetal y solo un 20% en el bacteroide. Se logro establecer metodologías de fraccionamiento basadas en centrifugación por gradientes de densidad para los organelos celulares y también se reporta el comportamiento de partición de dichos organelos en ATPS. Desarrollar metodologías de fraccionamiento subcelular en este tipo de interacciones podría ayudar a futuras investigaciones de regulación de metabolismo en otras interacciones microorganismo-planta.

Agradecimientos. Beca CONACYT maestría en ciencias 857669. Beca escolar ITESM 2017-2019.

Bibliografía.

- Smith, P, Atkins CA (2002). *Plant Physiol.* (3): 793–802.
- Tajima S, Nomura M, Kouchi H (2004). *Front Biosci.* 9:1374-81.
- Atkins CA, Smith P, Storer PJ (1997). *Plant Physiol.* 1:127-135.
- Kouchi & Fukai K (1989). *J Plant Nutr Soil.* 35 (2):301-305.
- Suganuma N & Yamamoto Y (1987). *J Plant Nutr Soil Sci* 33:93-101.
- Ramos P, Urrea R, Díaz de la Garza R (2013). *Food Res Int.* 54:177-185.

