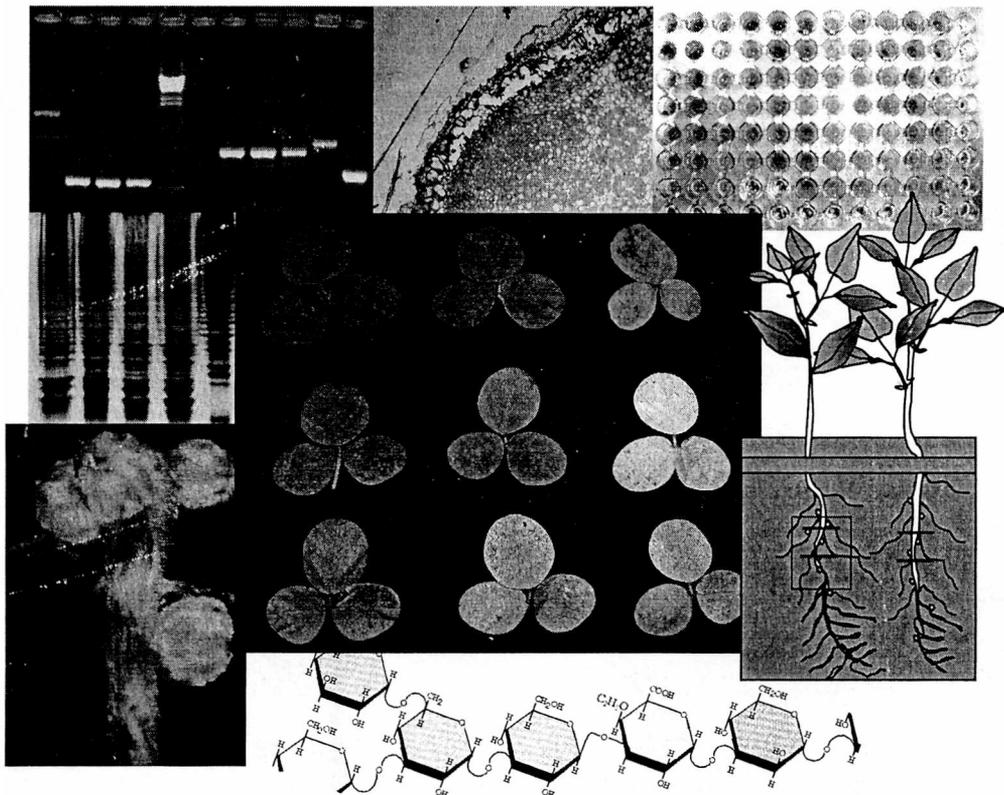


Tesis Doctoral 2008

Juan Ignacio Quelas

**BIOSÍNTESIS DE EXOPOLISACÁRIDOS Y
POLIHIDROXIBUTIRATO Y SU RELACIÓN CON LA
SIMBIOSIS *BRADYRHIZOBIUM JAPONICUM*-SOJA**



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Departamento de Ciencias Biológicas
Instituto de Biotecnología y Biología Molecular
CCT-La Plata-CONICET

El presente Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP-CCT-La Plata-CONICET, bajo la dirección del Profesor Dr. Anibal Roberto Lodeiro y la codirección del Dr. José Luis Boiardi

INDICE

Capítulo I

Introducción

I	Simbiosis	1
I.1	¿Que significa?	1
I.2	Fijación biológica de N	3
I.2.1	Importancia en los ecosistemas naturales y antrópicos	3
I.2.2	Costos y beneficios de la FBN	6
	Desde la planta	6
	Desde la bacteria	7
I.3.	Leguminosas	8
I.3.1	Sistemática	8
I.3.2	Evolución conjunta y nodulación	11
I.3.3	Importancia económica	13
I.3.4	La soja	14
I.3.4.1	Un poco de historia y actualidad	14
I.4	Rizobios	16
I.4.1	Sistemática	16
I.4.1.1	Hábitat y morfología	16
I.4.1.2	Concepto de especie en microbiología	18
I.4.1.3	Reseña histórica y actualidad	19
I.5	Simbiosis rizobio-leguminosa	23
1a	Reconocimiento mutuo	24
1b	Factores Nod y especificidad del hospedador	26
2	Adsorción superficial a raíces	27
3	Invasión de los tejidos del hospedador	29
4	Organogénesis del nódulo	32
5	Diferenciación a bacteroides y Fijación de N ₂	34
I.6	<i>Objetivos de este Trabajo de Tesis</i>	36
I.6.1	Objetivo general	36
I.6.2	Objetivos específicos	36

<i>Capítulo II</i>	<i>Materiales y Métodos</i>	
II.1	Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	39
II.2	Especies de plantas utilizadas	41
II.3	Procedimientos microbiológicos	42
II.3	Medios de cultivo	42
II.3.1	Medios líquidos y sólidos	42
II.3.2	Antibióticos	43
II.3.3	Conservación de las bacterias	44
II.3.4	Cultivos bacterianos y preparación de los inóculos	44
II.3.5	Métodos de recuento	
II.4	Soluciones para el cultivo hidropónico de plantas	46
II.5	Análisis bioquímicos	46
II.5.1	Separación, purificación y cuantificación de EPS	46
II.5.2	Cuantificación de PHB	47
II.5.3	Cuantificación de proteínas	48
II.5.4	Análisis cromatográficos por HPAEC	48
II.5.5	Extracción de LPS	49
II.5.6	Electroforesis en gel de los polisacáridos superficiales	50
II.6	Producción de biopelículas (<i>biofilms</i>) bacterianas	51
II.7	Microscopía	51
II.7.1	Optica	51
II.7.2	Electrónica	52
II.8	Técnicas de biología molecular y oligonucleótidos utilizados	52
II.8.1	Obtención de ADN molde	52
II.8.2	Preparación en pequeña escala de ADN plasmídico	54
II.8.3	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	54
II.8.4	Digestiones de ADN	55
II.8.5	Electroforesis de ácidos nucleicos	56
II.8.6	Secuenciación de ADN	56
II.8.7	Conjugaciones biparentales y triparentales	56
II.8.8	Preparación de células electrocompetentes	57
II.9	Ensayos biológicos	58

II.9.1	Esterilización superficial de las semillas y germinación	58
II.9.2	Ensayos de infectividad	59
II.9.3	Ensayos de competición para la nodulación	60
II.9.4	Determinación del peso seco de plantas	62

Capítulo III *Canalización diferencial del C en cultivos de B. japonicum limitados en la fuente de N*

III.1	Introducción	63
III.2	Crecimiento de <i>B. japonicum</i> USDA 110 y Δ P22 en medios líquidos limitados en la fuente de N	64
III.2.2	Acumulación diferencial de biopolímeros de C intracelulares y extracelulares	66
III.3	Composición de los EPS en relación con la fuente de C y la disponibilidad de N	68
III.4	Análisis simbióticos	72
III.4.1	Infectividad	73
	Resumen	76

Capítulo IV *Caracterización genotípica y fenotípica de mutantes de B. japonicum en el gen *blr0227**

IV.1	Introducción	79
IV.2	Análisis bioinformáticos	80
IV.3	Regulación de la síntesis de PHB	82
IV.4	Construcción de mutantes de <i>B. japonicum</i> en el gen <i>blr0227</i>	84
IV.5	Crecimiento de las cepas salvaje LP 3004 y LP 3020 en el medio de Götz	90
IV.6	Los mutantes <i>aniA</i> presentan una alta relación EPS/PHB en fase estacionaria tardía con suficiencia de la fuente de N	92
IV.7	Crecimiento en diferentes fuentes de C	94
IV.8	Cuantificación de <i>biofilms</i> en la cepa LP 3020	95
IV.9	La inactivación de <i>aniA</i> tiene un efecto en las propiedades simbióticas en plantas de soja	97

Capítulo V *Influencia cualitativa y cuantitativa de la composición del EPS sobre diferentes parámetros simbióticos*

V.1	Introducción	104
V.2	Análisis bioinformáticos	104
V.3	Construcción de las cepas mutantes de <i>B. japonicum</i> LP 3010, LP 3011 y LP 3012	106
V.4	Las cepas mutantes sintetizan menos cantidades de EPS en relación con la salvaje	112
V.5	Los mutantes tienen alterado su EPS pero no su LPS	112
V.6	La cepa LP 3010 revierte su fenotipo cuando lleva el plásmido con los genes salvajes	117
V.7	La cepa LP 3010 no tiene alterada su capacidad de formar <i>biofilms</i>	118
V.8	Análisis simbióticos	120
V.8.1	Infectividad	120
V.8.2	Competición para la nodulación	124
V.8.3	Ultraestructura de los nódulos	126
V.8.4	Fijación de N ₂	130
	Resumen	131

Capítulo VI *Mutantes sitio-específicos en el gen *exoB* en *B. japonicum* y su influencia en la nodulación en soja*

VI.1	Introducción	133
VI.2	Construcción de las cepas de <i>B. japonicum</i> LP 3013 y LP 3017 mutantes en el gen <i>exoB</i>	135
VI.3	Los EPS de las cepas mutantes no presentan galactosa y sus perfiles de LPS son similares	141
VI.4	Las cepas LP 3013 y LP 3017 son incapaces de formar <i>biofilms</i>	147
VI.5	La mutación en el gen <i>exoB</i> induce un fenotipo Nod ⁺ Fix ⁻ en plantas de soja	148
VI.6	Las mutantes muestran el mismo fenotipo en diferentes variedades de <i>G. max</i> y en <i>G. soja</i>	151
VI.7	La adición de EPS salvaje no restaura el fenotipo de nodulación Fix ⁺	153
VI.8	Microestructura de los nódulos de <i>G. max</i> inducidos por las cepas LP 3013 y LP 3017	154
	Resumen	156

Referencias Bibliográficas

Bibliografía

157

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

I.1 Simbiosis, ¿Qué significa?

Ninguna especie vive en aislamiento total, sino en conjunción con otros organismos, siendo a menudo asociaciones muy cercanas, a tal punto que en ocasiones un organismo es el hábitat de una especie determinada. Entre alguno de los muchos ejemplos que encontramos en la naturaleza podemos citar a los parásitos que viven dentro de cavidades corporales o células hospedadoras y a las bacterias fijadoras de N que viven en nódulos radicales de leguminosas. Simbiosis es el término que engloba estas interacciones físicas cercanas entre especies en la cual el “simbionte” ocupa un hábitat dado por el “hospedador”. Existe una discrepancia generalizada en el mundo científico sobre lo que implica la palabra simbiosis, por lo que vamos a dedicar algunas líneas introductorias sobre este concepto que resulta de vital importancia en la Biología. Simbiosis significa literalmente “vivir juntos”, es decir, implica una interacción entre dos o más individuos de distintas especies (interespecífica) por un período de tiempo prolongado o que puede durar toda la vida. Los organismos son denominados entonces “simbiontes” y suelen estar implicados seres tan diversos como virus, bacterias, hongos, plantas y animales. Estas interacciones se habrían originado hace unos 3.200 millones de años y tendrían tanta relevancia que de hecho, no son pocos los investigadores que consideran que el proceso simbiótico fue, es y será la “llave evolutiva” implicada en los mayores

procesos de especiación a lo largo de la historia del planeta Tierra y que, lejos de implicar relaciones de competencia, se basa en procesos tales como cooperación, interacción y dependencia mutua de las especies. Así, la bióloga Lynn Margulis llegó a la conclusión, aceptada mundialmente, que los organismos eucarióticos derivaron de dos o más organismos procarióticos (progenitores) que interactuaron mutuamente en un largo proceso denominado simbiogénesis (Teoría Endosimbiótica Seriada, Margulis 1975). Este es el caso para el origen de organelas tales como la mitocondria (una α -proteobacteria con el genoma extremadamente reducido (Andersson *et al*, 1998; Martin y Müller, 1998) y los plástidos de los eucariotas fotosintéticos (una cianobacteria englobada por un eucariota fagotrófico, Bhattacharya y Medlin, 1995). La fuerza motora de esta coevolución parecería haber sido la necesidad metabólica de alguno de los participantes, como por ejemplo la síntesis de ATP y la de productos fotosintéticos respectivamente.

La simbiosis puede relegarse a ser sólo una parte del ciclo de vida de un organismo o por el contrario, ser indispensable para la supervivencia. Dependiendo de ello, suele clasificársela según sea una interacción externa (ectosimbiosis) o que implique un reconocimiento pormenorizado entre los simbioses para permitir la entrada de uno de ellos en el otro, localizándose así en los tejidos internos (endosimbiosis).

Si bien muchos investigadores consideran que la simbiosis es una interacción mutualística en donde al menos uno de los simbioses se beneficia, muchos otros consideran que existen otras interacciones como el parasitismo que pueden también englobarse dentro de este término porque comparten varios mecanismos moleculares

en común (Ewald, 1987; Hentschel *et al.*, 2000; Goebel y Gross, 2001; Soto *et al.*, 2006). Así, es común encontrar en libros de texto que las simbiosis se diferencian según el grado de “ventajas” (+) o “desventajas” (-) de que dispone uno u otro simbiote. De todas formas, el concepto sigue siendo una entidad abstracta que, como toda clasificación, deja algunos “baches” en el camino. Pero, utilicemos la clasificación que utilicemos, las interacciones interespecíficas simbióticas juegan un papel vital sobre los procesos evolutivos y además suelen conllevar un alto grado de especificidad en el proceso. Sin ir más lejos, existen ejemplos de simbiosis casi en cualquier organismo que miremos: en nuestro propio cuerpo, tales como la microflora bacteriana-tubo digestivo, en otros mamíferos como bacterias y protozoos dentro del estómago de los rumiantes, y así podríamos enumerar infinitos pares de simbiotes. Dentro de las interacciones procariotas-eucariotas, encontramos ejemplos de gran relevancia mundial que aportan en gran medida a la *fijación biológica de nitrógeno* tales como las simbiosis entre α - y β -proteobacterias y leguminosas, entre las cuales se encuentra la pareja simbiótica motivo de esta Tesis: *Bradyrhizobium japonicum-Glycine max*.

I.2 Fijación Biológica de Nitrógeno

I.2.1 Importancia en los ecosistemas naturales y antrópicos

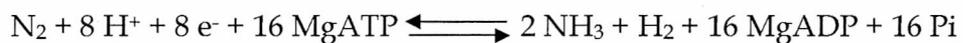
La Fijación de Nitrógeno representa una fase dentro del ciclo del N, el cual implica la interconversión global entre diferentes estados de oxidación. El reservorio principal es la atmósfera, y allí se encuentra como dinitrógeno (N_2) en cantidades aproximadas de 4×10^{21} g (Schlesinger, 1991). Una fracción aproximada de 3×10^{14} g es

fijada anualmente a amonio (NH_4^+) por microorganismos (relativamente pequeñas cantidades provienen de actividades volcánicas y relámpagos). Luego del ciclo metabólico a través de la biósfera, el N fijado retorna al reservorio atmosférico a través de procesos de desnitrificación. Hasta antes del siglo XX, el N_2 entraba al ciclo del N gracias a la fijación biológica, pero con el advenimiento del proceso de Haber-Bosch, se estima que entran cantidades equiparables (1×10^{14} g), las cuales dieron gran ímpetu a la agricultura dando sustento al incesante crecimiento de la población mundial (Smil, 2001).

El nitrógeno es uno de los componentes principales de muchas biomoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos y vitaminas siendo esencial para el crecimiento y el desarrollo de todos los organismos. Paradójicamente, resulta ser un elemento inerte en la atmósfera, y la gran mayoría de los organismos multicelulares no pueden acceder a él de manera directa con fines metabólicos. Así, es necesario que el N se convierta de alguna manera en una fuente asequible. A pesar de ello, la fijación biológica de nitrógeno (en adelante FBN) es un proceso enzimático llevado a cabo por pocos microorganismos procarióticos que lleva a la reducción de nitrógeno atmosférico (N_2) biológicamente inerte en amonio (NH_4^+). Dichos microorganismos, llamados diazótrofos, contribuyen a fijar aproximadamente 175 millones de toneladas métricas de N por año (Burns y Hardy, 1975) de las cuales aproximadamente el 35% son fijadas por leguminosas tanto cultivables como en sistemas naturales. En relación a ello, debe ponerse de manifiesto la enorme eficiencia de esta actividad teniendo en cuenta las minúsculas cantidades de la enzima nitrogenasa que se necesitan (Delwiche, 1970). La capacidad de fijar N_2 solo se encuentra dentro de organismos

procarióticos y nunca dentro de eucariotas, y si bien existen varios linajes que pueden hacerlo en vida libre o en simbiosis con animales, hongos y protistas, está confinada sólo a siete taxones que lo hacen en simbiosis con representantes del Reino vegetal, a saber: Rhizobiales, Actinomycetes del género *Frankia*, Azotobacteriaceae, Bacillaceae, Enterobacteriaceae, Spirillaceae y Nostocaceae estas últimas dentro de las cianobacterias.

Todos estos organismos están equipados con un sistema enzimático, el de la nitrogenasa, el cual provee la maquinaria bioquímica para poder llevar a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. Dicha maquinaria supone una múltiple cadena de transferencia de electrones que resultan finalmente en la síntesis de amonio e hidrógeno.



Para que esta reacción se lleve a cabo con éxito, es necesario un fuerte gasto de energía y debe realizarse en un ambiente reductor ya que la presencia de O₂ aún en pequeñas cantidades, inhibe selectivamente a la nitrogenasa. Esta barrera contra el O₂ pareciera que ha evolucionado independientemente en varias oportunidades pudiendo ser fisiológica, temporal o estructural según el caso; por ej. *Azotobacter* suele secretar polisacáridos de superficie para no permitir el ingreso del O₂ y muchas cianobacterias filamentosas poseen un órgano con paredes engrosadas llamado heterocisto para el mismo fin. En el caso de los rizobios, existe una molécula especializada llamada leghemoglobina, que juega un rol crucial para el mantenimiento del ambiente

reductor (Appleby 1984, Downie 2005) y las cianobacterias poseen otra hemoglobina llamada cianohemoglobina.

La nitrogenasa está formada por dos subunidades, la dinitrógeno reductasa (azoferredoxina) y la dinitrogenasa (molibdeno-ferredoxina) (Hageman y Burris, 1978). Los componentes estructurales de estas dos subunidades son las proteínas Nif (por sus siglas en inglés *nitrogen fixation*) NifH (γ -azoferredoxina homodimérica y NifD/K ($\alpha_2\beta_2$ -molibdenoferredoxina heterotetramérica). Este complejo enzimático, para el caso de los rizobios, necesita Fe^{+++} y Mo^{++} como cationes.

La FBN es un proceso antiguo y que ha perdurado a lo largo de la historia de la Tierra, estableciéndose en muchos microorganismos de vida libre y en asociaciones simbióticas que contribuyen a completar el ciclo atmosférico del N.

1.2.2 Costos y Beneficios de la FBN

¿Por qué la simbiosis rizobio-leguminosa perduró y perdura a lo largo del tiempo? ¿Es económicamente viable la formación y mantenimiento del nódulo? ¿Evolutivamente, es ventajoso vivir dentro de una estructura nodular? A continuación, vamos a desarrollar estas preguntas aproximándonos desde la planta y desde la bacteria.

-Desde la planta:

La gran mayoría de las leguminosas toman el N del suelo como amonio o nitrato, siendo el metabolito más económico el amonio, si bien este catión es rápidamente

convertido a nitratos por la actividad microbiana (bacterias nitrificadoras). El costo energético para hacerlo es de 8 moles de ATP por cada mol de amonio formado.

Cuando establecen relaciones simbióticas con los rizobios, las leguminosas gastan alrededor de 13,5 moles de ATP/mol de amonio formado sin contar el gasto energético que resulta de la formación y mantenimiento del nódulo, el cual es más del 20% del total de los productos fotosintéticos netos (Pate, 1986). Es por esto que la FBN resulta energéticamente un proceso ineficiente.

La energía sin embargo, resulta mucho más asequible que el nitrógeno, recurso muchas veces escaso en los suelos, con lo cual justificaría este gasto extra que implica el proceso simbiótico, teniendo en cuenta además que si la planta es suplementada con nitratos, la FBN declina rápidamente.

-Desde la bacteria:

Los beneficios de los rizobios son más difíciles de explicar desde el punto de vista evolutivo, porque aquellas bacterias que fijan nitrógeno (llamados bacteroides) son incapaces de dividirse luego de su diferenciación. Si bien los rizobios pueden reproducirse en el hilo de infección, los bacteroides no pueden hacerlo, y teniendo en cuenta que son clones, estos dos "estadios" son parte de un todo, con una integridad genética única. Los bacteroides y su producción entonces, pueden beneficiar a aquellas bacterias inmersas todavía en el hilo de infección o dentro o en las cercanías del nódulo que todavía no se diferenciaron y así se beneficiaría la especie como un todo. Pero teniendo en cuenta que en las asociaciones simbióticas existen mezcla de clones (Dowling and Broughton, 1986), sigue siendo un enigma el porqué un clon no

“estafa” al otro. Tal vez respuestas parciales a esta pregunta estén en las “sanciones” que pueda aplicar la planta a los rizobios que no fijan suficiente N o son incapaces de fijar, algunas interesantemente descritas por Kiers *et al.*, 2003. Estas sanciones favorecerían a los rizobios más benéficos y así estabilizarían el proceso simbiótico a lo largo del tiempo, como lo demuestran la escasa cantidad de rizobios poco fijadores en suelos naturales y de uso agrícola (Denton *et al.*, 2000; Thrall *et al.*, 2000).

I.3 Leguminosas

Las plantas leguminosas son muy diversas en su morfología, hábitat y ecología. A su vez, muchas de ellas son capaces de establecer relaciones simbióticas con rizobios que dependen de peculiaridades genéticas que sólo ellas poseen, siendo por ello casi únicas en el reino vegetal (Van Rhijn y Vanderleyden, 1995).

I.3.1 Sistemática

Si bien en la actualidad la filogenia de las leguminosas está siendo revisada en base a datos moleculares, haremos una breve descripción de los mayores grupos de estas particulares angiospermas.

Las plantas leguminosas comprenden un amplio grupo de angiospermas cuyos principales caracteres son una arquitectura floral inusual, fruto en forma de vaina o legumbre y cerca de un 88% de sus especies hasta ahora descritas con la particularidad de formar nódulos con rizobios (de Faria *et al.*, 1989). La familia

Leguminosae o Fabaceae comprende alrededor de 19.000 especies distribuidas en 750 géneros (Polhill *et al.*, 1981) e incluyen importantes especies agroforestales, forrajeras y graníferas.

La gran mayoría de sus especies son terrestres, presentando pocas especies acuáticas continentales y ninguna especie marina y habitan casi todos los biomas del planeta, con la única excepción de la Antártida.

Esta familia se divide a su vez en tres subfamilias, a saber, Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae, en general fácilmente distinguibles por la arquitectura de sus flores.

De las tres, la subfamilia Caesalpinioideae es la menos especializada, estando representada en su mayoría por árboles y arbustos distribuidos en ambientes tropicales a subtropicales la mayoría de los cuales son incapaces de nodular. Sus flores son zigomórficas y presentan cinco pétalos no diferenciados unos de otros y cuyos estambres son visibles externamente. Se la divide actualmente en cuatro tribus, Cercideae, Detarieae, Cassieae y Caesalpinieae de las cuales las últimas dos son capaces de nodular.

Dentro de la tribu Cassieae, el género *Chamaecrista* es el único que nodula y presenta alrededor de 300 especies (Doyle *et al.*, 1997) que en los últimos tiempos colonizaron hábitats templados, siendo la gran mayoría especies herbáceas. Esta expansión se correlaciona con los tipos de células infectadas que presenta, ubicándose los bacteroides dentro del hilo de infección (ahora hilos de fijación) rodeados o no por una membrana peribacteroidal (Naisbitt *et al.*, 1992).

La tribu Caesalpinieae está representada por géneros tales como *Campsiandra*, *Dimorphandra*, *Erythrophleum*, *Melanoxylon*, *Moldenhawera*, *Tachigali* y *Sclerolobium* todos capaces de nodular, si bien algunos de estos géneros no están emparentados.

La subfamilia Mimosoideae presenta al igual que la anterior, árboles y arbustos distribuidos principalmente por los trópicos y subtrópicos. Sus flores son pequeñas, actinomorfas y usualmente se presentan formando ramilletes. Sus cinco pétalos son inconspicuos y sus estambres son la parte más vistosa, siendo sus hojas usualmente bipinnadas.

Sus especies se distribuyen actualmente en tres tribus, Mimoseae, Acacieae e Ingeae y están uniformemente distribuidas en cuanto a nodulación se refiere. Presentan nódulos indeterminados con o sin ramificaciones y la infección con raras excepciones es a través de pelos radiculares. Especies de la tribu Mimoseae con capaces de nodular con β -proteobacterias (Barrett y Parker, 2005; Elliott *et al.*, 2007). Su género más extendido es *Acacia*.

La subfamilia Papilionoideae se encuentra ampliamente distribuida a lo largo del planeta y usualmente son plantas herbáceas, si bien existen árboles y arbustos. Sus flores son zigomorfas y sus cinco pétalos diferenciados constituyen uno grande a modo de estandarte, dos con forma de ala y los dos restantes fusionados parcialmente a manera de quilla, encerrando a los estambres de manera que dejan de ser visibles externamente.

Esta subfamilia contiene a la gran mayoría de las especies de importancia agroforestal, siendo la más vasta en cuanto al número de especies presentando 28 Tribus en la actualidad, tales como Swartzieae, Millettieae, Sophoreae, Brongniartieae,

Thermopsidaeae, Crotalarieae, Genisteae (*Glycine spp.* entre otros), Podalyrieae, Bossiaeeae, Mirbelieae, Hypocalypteae entre otras.

I.3.2 Evolución conjunta y nodulación

El registro más antiguo de Leguminosae data de unos 60 millones de años en suelos tropicales húmedos del Terciario inferior, mientras que los primeros eventos de nodulación fueron casi en simultáneo alrededor de los 58 millones de años (Lavin *et al.*, 2005). Esta aparición fue inmediatamente después de la gran extinción Cretácica/Terciaria y se correspondió con una aparición y expansión de otras familias de angiospermas (Schrire *et al.*, 2005a), particularmente al Norte del Mar de Thetys, es decir, en Laurasia.

Con la sola excepción de *Gunnera*, todas las angiospermas que forman simbiosis en las que fijan N atmosférico pertenecen al clado Rosidae I (Soltis *et al.*, 2000). Las plantas que nodulan con bacterias filamentosas del género *Frankia*, llamadas plantas actinorrízicas, están dispersas alrededor del clado y se encuentran en diferentes familias, encontrando especies que pueden nodular (*Alnus*) y otras que son incapaces de hacerlo (*Betula*).

Las plantas que son noduladas por bacterias colectivamente llamadas rizobios, se encuentran dentro de las Leguminosae con la única excepción de *Ulmus sp* dentro de las Ulmaceae.

En la actualidad, se cree que la mayoría de los genes implicados en el proceso de nodulación han sido adquiridos por duplicación génica, pero no se sabe aún si todas

las leguminosas tienen estos genes extra, y, si fuera así, por qué no todas son capaces de nodular (Sprent, 2007). En particular, probablemente la capacidad de formar nódulos ha aparecido al menos en tres oportunidades independientes dentro de las leguminosas, como lo muestra la figura I.1.

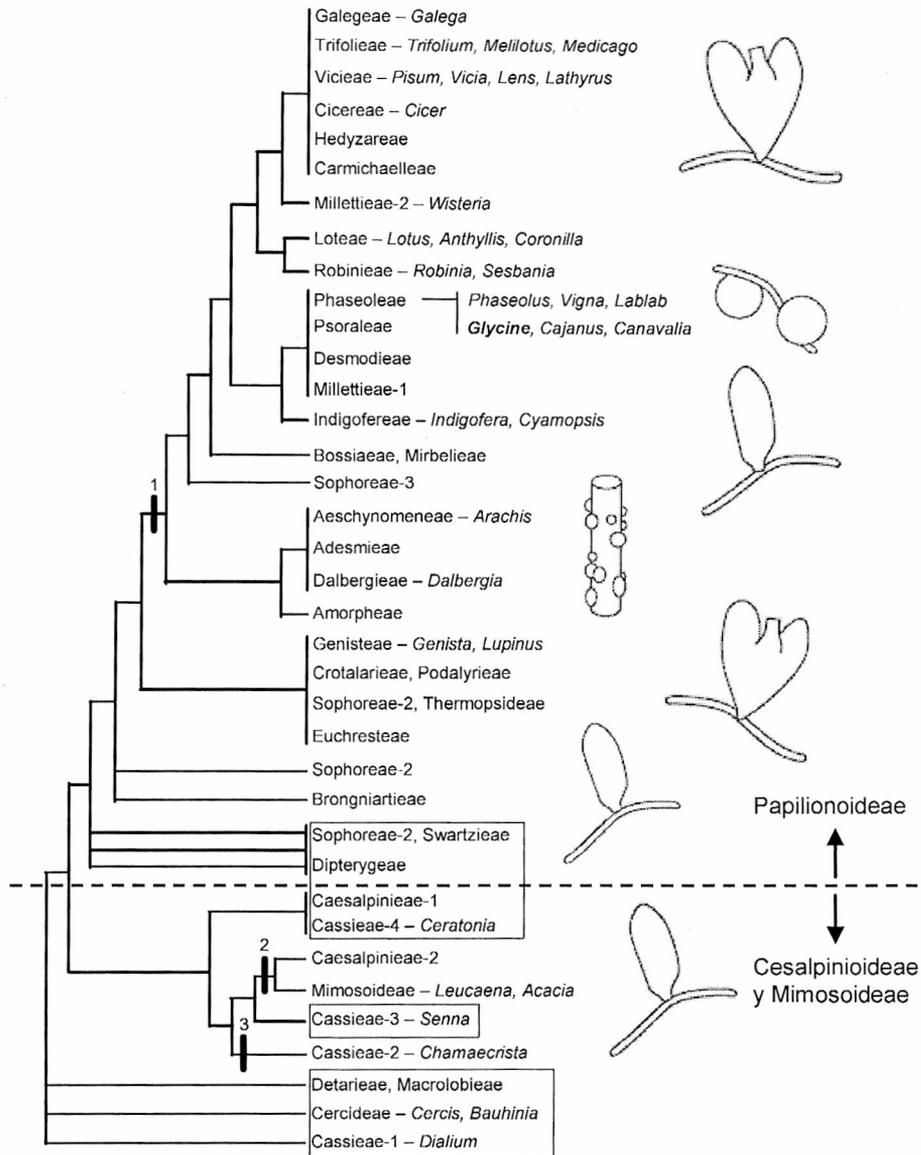


Figura I.1 Árbol filogenético de las leguminosas basado en el análisis de la secuencia del gen cloroplástico *rbcl* (Doyle *et al.*, 1998) donde se muestran tres eventos de nodulación independientes (barras verticales 1, 2 y 3). Los taxones dentro de los recuadros son incapaces de nodular. A la derecha se esquematizan los diferentes tipos de nódulos desarrollados.

I.3.3 Importancia Económica

Luego de las Gramíneas, las Leguminosas ocupan el segundo lugar en importancia para el hombre, siendo domesticadas desde hace alrededor de 8.000-9.500 años (Roosevelt *et al.* 1996). Tanto el poroto (*Phaseolus vulgaris*) en América como la soja (*Glycine max*) en Asia, fueron domesticadas hace más de 3.000 años (Hymowitz and Singh, 1987; Kaplan and Lynch, 1999) y forman hoy grandes extensiones de cultivos.

Las leguminosas forrajeras y graníferas representan entre el 12% y 15% de la superficie arable de la Tierra, contribuyendo sólo al 33% del total de N incorporado a la dieta por los humanos (Vance *et al.*, 2000).

En orden jerárquico, *Phaseolus*, *Pisum sativum*, *Cicer arietinum*, *Vicia faba*, *Cajanus cajan*, *Vigna unguiculata* y *Lens esculenta* constituyen la dieta primaria de legumbres (National Academy of Science, 1994). *Glycine max* y *Arachis hypogaeae* proveen más del 35% del aceite vegetal producido en el mundo y también son una fuente de alimentos para la producción industrial avícola y porcina.

Esta importancia económica podría ser aún mayor debido a la gran cantidad de hábitats marginales ocupados últimamente por el hombre teniendo en cuenta que muchas especies de leguminosas son propicias para sembrar en ambientes abiertos y/o disturbados y por sus propiedades de buen rendimiento en suelos pobres en nutrientes.

Tabla I.1 Cosecha y área sembrada mundiales de los vegetales más producidos por el hombre. Fuente: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) database (<http://apps.fao.org/page/collections>)

Cosecha	Producción (millones de toneladas x 10 ⁶)	Área cosechada (millones de hectáreas x 10 ⁶)
Legumbres graníferas	275	160
Legumbres forrajeras	605	20
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	583	214
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	590	152
Maíz (<i>Zea mays</i>)	609	138
Cebada (<i>Hordeum vulgare</i>)	141	54
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	308	19
Mandioca (<i>Manihot esculenta</i>)	179	20
Total	3.320	777

I.3.4 La soja

I.3.4.1 Un poco de historia y actualidad

Esta importante leguminosa pertenece a la subfamilia Papilionoideae y comprende alrededor de 10 especies en la actualidad. Las más importantes son *Glycine ussuriensis*, *G. soja* y *G. max*, siendo esta última la especie cultivada.

La evidencia lingüística, geográfica e histórica indica que la mitad oriental del norte de la China es el área de donde emergió la soja domesticada alrededor del siglo XI AC, extendiéndose luego a otros países del sudeste asiático. Los productos de soja eran conocidos por los viajeros europeos en los comienzos del siglo XV, pero el conocimiento amplio del cultivo no llegó a Europa sino hasta 1712.

La soja se cultiva principalmente por su semilla, rica en proteínas, la cual es usada comercialmente como alimento para el hombre y para el ganado, así como también para la producción de aceite (Salunkhe, 1992)

En la Argentina, la producción ha crecido vertiginosamente en detrimento de otros cultivos y gracias a la gran plasticidad fenotípica que presenta, las áreas para su cultivo se han expandido hacia el Norte con la selección de variedades más resistentes a la sequía. Las provincias más importantes son Córdoba (alrededor del 90% de los sembradíos son de soja), Santa Fe y Buenos Aires.

En nuestro país el cultivo no tenía mayor importancia en cuanto a superficie sembrada, pero a partir de la campaña 1996/97, se liberaron al medio para su siembra los primeros materiales de soja transgénica tolerantes a glifosato, situación que facilitó junto con la práctica de siembra directa, la notable expansión del área bajo cultivo (Figura I.2). Así, la Argentina se posicionó como el tercer productor mundial de grano y el primer exportador mundial de aceites.

Desde el punto de vista económico, el cultivo de soja se ha transformado en la fuente más importante de ingresos fiscales, posibilitando la financiación de los programas sociales implementados a fin de mitigar las consecuencias de la grave crisis socio-económica por la que atraviesa el país. Sin embargo, los avances logrados con la expansión del cultivo tienen su contracara, ya que la combinación de la siembra directa-monocultivo de soja tolerante a glifosato, atentan contra la sustentabilidad de los agroecosistemas. Así, en importantes áreas de la región pampeana el monocultivo de la soja, juntamente con la excesiva utilización de agroquímicos para el control de plagas animales y vegetales generó y genera grandes riesgos de contaminación al medioambiente y a la salud humana.

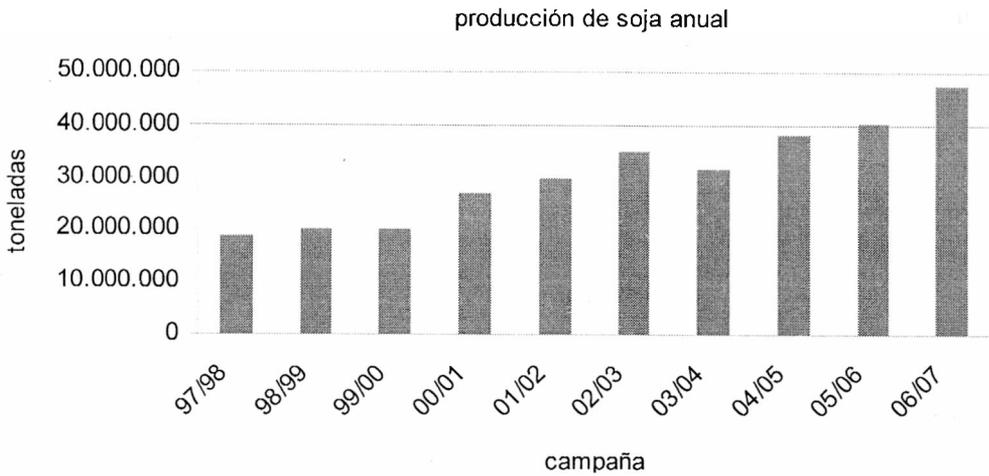


Figura I.2 Esquema de la evolución de superficies sembradas con soja en Argentina desde 1997 hasta la cosecha 2006/2007.

Fuente: www.sagpya.mecon.gov.ar

La producción de soja se podría tornar de esta manera altamente vulnerable ante la aparición de problemas climatológicos o de enfermedades teniendo en cuenta que la estimación para este año es sembrar alrededor de 16.600.000 hectáreas, un 2,8 % mas que en el 2007 (www.sagpya.mecon.gov.ar).

I.4 Rizobios

I.4.1 Sistemática

I.4.1.1 Hábitat y morfología

Los rizobios son α - y β -proteobacterias aeróbicas y/o microaeróbicas de forma bacilar, gram negativas, no esporuladas, con un tamaño de aproximadamente... Son móviles y suelen presentar un flagelo polar o subpolar tipo peritrico y numerosos flagelos distribuidos uniformemente a lo largo de su superficie, además de fimbrias. Su hábitat en vida libre es en el horizonte superficial de los suelos, pudiendo ser independientes o planctónicas o más comúnmente formando agregados uni o multiespecíficos

denominados biopelículas (biofilms), adsorbidos a sustancias inertes o en estrecha vinculación con restos orgánicos y/u otros organismos vivos que utiliza como vehículo. La inmensa mayoría de los suelos agrícolas presentan deficiencias de nutrientes, y en esas condiciones, especialmente en escasez de nitrógeno, los rizobios suelen formar simbiosis ocupando diferentes lugares dentro de leguminosas (con una sola excepción) como endófito, ya sea en tejidos del huésped no diferenciados o en tejidos especiales como hilos de infección y estructuras radiculares o caulinares llamadas nódulos. Allí, ciertas subpoblaciones se diferencian a estadios terminales llamados bacteroides, los cuales presentan importantes cambios estructurales y fisiológicos relacionados con modificaciones en los patrones de expresión génica que llevan, entre otros, a la pérdida del flagelo, la capacidad de fijar N_2 atmosférico y utilizar como única fuente de C ácidos dicarboxílicos como malato y succinato que le son proporcionados por la planta (Oke y Long, 1999; Natera *et al.*, 2000).

Sin embargo, el establecimiento de una simbiosis efectiva supone una serie de eventos concatenados que implican un reconocimiento mutuo y procesos de adhesión e infección que, si no son llevados con éxito, desencadenan respuestas de defensa de la planta como si se tratara de organismos fitopatógenos. En este sentido, los polisacáridos de superficie bacterianos, aparecen como moléculas indispensables en las primeras etapas de este "diálogo molecular" (Frayssé *et al.*, 2003).

Muchas cepas de rizobios pertenecientes a una misma especie tienen al menos tres estrategias genéticamente determinadas: formar relaciones de mutualismo, cuya finalidad es fijar N_2 , establecer relaciones de parasitismo con leguminosas en las cuales se fijan escasas o nulas cantidades de N y por último, no establecer relaciones

simbióticas, siendo este último caso el que más abunda en la naturaleza edáfica (Denison y Kiers, 2004a y 2004b).

I.4.1.2 Concepto de especie en microbiología y su problemática

La designación de posiciones taxonómicas discretas dentro de los procariotas es motivo de grandes y acaloradas discusiones, teniendo en cuenta que se reproducen asexualmente, presentan traspaso de material genético horizontal y son altamente polimórficos y pleiotrópicos. Dentro de este contexto, las bacterias habitantes del suelo, entre ellas los rizobios, no son una excepción y su status está actualmente en etapas de transición. Hoy se adopta un criterio polifásico para llevar a cabo análisis filogenéticos, en los cuales se evalúan y contrastan gran variedad de caracteres fenotípicos y genotípicos tales como morfología de las colonias, utilización de diferentes carbohidratos, presencia o ausencia de fosfogluconato-6-deshidrogenasa, resistencia a antibióticos, respuesta a la presencia de metales pesados, pH o NaCl, perfiles electroforéticos de proteínas y LPS, tipos de proteínas de secreción, composición de ácidos grasos, y entre los genotípicos podemos mencionar análisis de híbridos ADN-ADN o ADN-ARN, secuencias del ARN ribosómico y perfiles plasmídicos.

Vamos a introducir en esta Tesis sobre esta problemática haciendo especial hincapié en aquellas bacterias que son capaces de nodular soja.

I.4.1.3. Reseña histórica y actualidad

A finales del siglo XVI, Dalechamps representó gráficamente abundantes nódulos en raíces de *Ornithopodium tuberosum* (Martínez-Viera, 1986) y en los siglos posteriores, científicos como Malpighi (siglo XVIII) y Ward (siglo XIX) llamaron la atención sobre estas formaciones radiculares pero sin poder dar una explicación real a este fenómeno. Schroeter en 1886 presentó su propuesta de denominar como *Phytomyxa* a los organismos causantes de las formaciones nodulares pero sólo los estudios clásicos de Hellriegel y Wilfarth (1888) por primera vez establecieron claramente que eran microbios los que permitían la fijación de nitrógeno atmosférico.

En 1890, Beijerinck aisló y cultivó la bacteria a partir de nódulos, denominándola *Bacillus radicolica*, casi al mismo tiempo, Frank (1889) la había denominado *Rhizobium leguminosarum*, nombre que se mantiene actualmente (Young y Haukka, 1996; Sprent, 2001).

En 1932, Fred propuso una clasificación basada en caracteres fisiológicos y bioquímicos que se mantuvo inalterable hasta 1982. Allí, distinguió 6 especies de *Rhizobium*, basadas principalmente en su rango de huésped, a saber: *R. leguminosarum*, capaz de nodular plantas de *Lathyrus*, *Pisum*, *Vicia* y *Lens*, *R. trifolii* en *Trifolium*, *R. phaseoli* en *Phaseolus*, *R. meliloti* en *Melilotus*, *Medicago*, *Trigonella*, *R. japonicum* en *Glycine* y *R. lupin* en *Lupinus*.

Después de pasados 50 años, por primera vez se introdujeron cambios en la nomenclatura de los rizobios con la creación del nuevo género *Bradyrhizobium* (Jordan, 1984), el cual incluye todas las cepas que forman nódulos en *Glycine max*, pero que no

contemplaba la definición de otras especies, pues aunque el nuevo género estaba basado en caracteres fisiológicos que lo distinguen de *Rhizobium*, aún no se habían introducido completamente técnicas que pudieran establecer diferencias en el nivel genético (Young, 1996).

Pero es a partir de los métodos moleculares, como la amplificación y la secuenciación de genes del ARNr 16S, hibridación ADN-ADN o ARN-ADN, que se revolucionó la clasificación de los rizobios constituyendo opciones seguras para analizar la filogenia de estas bacterias (Woese, 1987; Young, 1996), si bien existen nuevas clasificaciones basadas en aspectos ecológicos aplicadas a las bacterias habitantes del suelo (Fierer *et al.*, 2006). Esto conllevó a un aumento en el número de géneros y especies que actualmente están en vigencia (Tabla I.2).

Así, la palabra “rizobio” implica en sentido estricto bacterias del género *Rhizobium*, pero hoy este término se aplica a todos los representantes bacterianos que pueden nodular y fijar en asociación con plantas leguminosas, representando un grupo polifilético (Turner y Young, 2000).

Tabla I.2 Número de especies dentro de los rizobios en función de los años

género	número de especies por intervalo de tiempo					
	hasta 1980	1981-1985	1986-1990	1991-1995	1996-2000	2001-2006
<i>Agrobacterium</i>	4	4	5	5	5	5
<i>Rhizobium</i>	4	5	5	10	10	16
<i>Bradyrhizobium</i>		1	1	3	3	7
<i>Sinorhizobium</i>			2	5	8	11
<i>Azorhizobium</i>			1	1	1	2
<i>Mesorhizobium</i>					7	11
<i>Allorhizobium</i>					1	1
total	8	10	14	24	35	53

Análisis de secuencias de ARN 16S ribosomal indican que las bacterias simbiotes en leguminosas no forman un único linaje sino que pertenecen a dos clases bacterianas disímiles: α -proteobacteria y β -proteobacteria que a su vez se dividen en por lo menos 9 subclases monofiléticas (grupo natural que incluye al antecesor común y a todos sus descendientes), dentro de los cuales se alternan formas simbióticas y no simbióticas (Figura I.3).

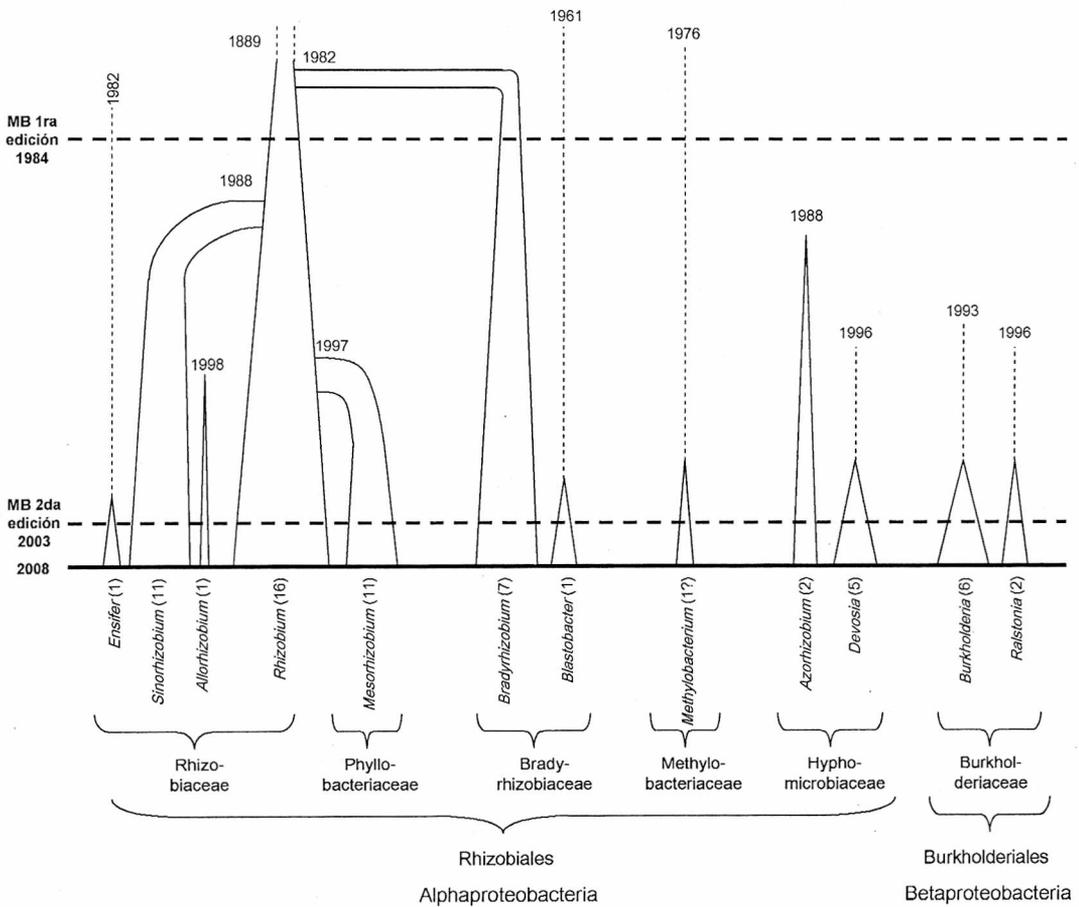


Figura I.3 Cambios en la clasificación de los simbiotes de leguminosas.

Diagrama esquemático que muestra los cambios a nivel genérico desde la primera edición del Manual de Bergey de Sistemática en Bacteriología (MB) hasta la segunda edición y hasta el presente. Los años que figuran dentro del esquema indican cuándo se validó el género. Los números en paréntesis luego del género indican la cantidad de especies simbiotes de leguminosas. Las líneas entrecortadas indican que no hubo cambios dentro del género. (Modificado de Sawada *et al.*, 2003)

En particular, *Bradyrhizobium* se ubica dentro de la familia Bradyrhizobiaceae y posee 7 especies, *B. japonicum*, *B. elkanii*, *B. liaoningense* que pueden nodular *Glycine*, *B. yuanningense* que nodula *Lespedeza*, *B. betae* aislada de tumores de raíces de *Beta vulgaris* (Rivas *et al.*, 2004) y *B. canariense* aislada de ciertas leguminosas genisteoides (Vinuesa *et al.*, 2005).

Adicionalmente a estas especies, se han descrito gran variedad de serogrupos (Date y Decker, 1965) lo que hace aún mas complicada su descripción, teniendo en cuenta la escasa divergencia interespecífica que presentan en base a secuencias de ARN ribosomales 16S.

Alternativamente, especies que presentan amplio rango de huésped como *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium xinjiangense* son capaces de formar nódulos en plantas de soja (Scholla y Elkan, 1984; Chen *et al.*, 1988).

También se debe mencionar que diversos análisis filogenéticos realizados en los últimos años ubican a géneros no simbióticos como *Afiplia*, *Rhodopseudomonas*, *Blastobacter*, *Nitrobacter* y *Brucella* mucho más cercanos a *B. japonicum* que a *B. elkanii*, lo cual no justificaría esta distinción genérica (Willems *et al.*, 2001). Inclusive se han aislado de *Parasponia spp.* (única planta que no pertenece a las Leguminosas que es capaz de nodular) especies de *Bradyrhizobium* que, sobre la base de cladogramas 16S, se posicionan filogenéticamente entre *B. japonicum* y *B. elkanii* (Lafay *et al.*, 2006).

En nuestro laboratorio además, se han observado diferencias morfo-funcionales y genotípicas de aislamientos bacterianos tomados de nódulos provenientes de campos sojeros. Todo ello sin contar los innumerables fenotipos pleiotrópicos que presentan cuando se realizan pequeños cambios genéticos en condiciones de laboratorio

(Martínez-Romero y Caballero-Mellado, 1996). Así, podríamos decir que serían necesarios estudios más acabados sobre este particular género de rizobio para dilucidar sus relaciones filogenéticas e historia biogeográfica.

I.5 Simbiosis rizobio-leguminosa

Es notable que en suelos naturales ricos en nitrógeno o aquellos suelos agrícolas fertilizados con urea, las leguminosas sean incapaces de formar nódulos (Streeter *et al.*, 2002), por lo que la escasez de N, al menos en el ambiente rizosférico, es un prerrequisito para establecer una simbiosis efectiva. En estas condiciones se inicia una fuerte interacción química que culminará en una íntima asociación en la cual las bacterias habitan órganos nuevos (nódulos) y fijan nitrógeno atmosférico. Esta fijación biológica de N₂ beneficia a la planta, pero el costo energético para hacerlo no es despreciable, sino por el contrario, alrededor del 20% de los fotosintatos totales se utilizan para alimentar a los nódulos (Walker *et al.*, 2003). Las etapas simbióticas implicadas en este proceso están muy bien caracterizadas, y clásicamente se dividen en 5 pasos, a saber :

- 1-Reconocimiento mutuo a través de señalizaciones químicas solubles
- 2-Adsorción superficial a raíces y posterior colonización
- 3-Invasión de la raíz
- 4-Organogénesis del nódulo e invasión
- 5-Diferenciación de las bacterias en bacteroides y Fijación Biológica de N₂

Vamos aquí a desglosar estos pasos para tratar de dar una idea más acabada de cada una de estas etapas simbióticas, haciendo especial énfasis en la interacción *B. japonicum*-soja.

1-Reconocimiento mutuo a través de señalizaciones químicas solubles

a- Estableciendo relaciones simbióticas

El establecimiento de una simbiosis entre la planta hospedadora y su simbionte bacteriano requiere un proceso con múltiples pasos que consisten en la percepción de señales, transducción y respuestas a esas señales (Broughton *et al.*, 2000) y también necesitan una precisa regulación espacio-temporal de los genes implicados (Schlaman *et al.*, 1998). En un comienzo, moléculas fenólicas producidas en el exudado radical por las leguminosas (flavonoides) disparan cascadas de transducción de señales en los rizobios de manera específica por activación de factores transcripcionales de los genes de nodulación. Estas cascadas de transducción de señales moduladas por los flavonoides actúan sobre genes rizobianos encargados del desarrollo y organogénesis del nódulo. La mayoría de estos genes de nodulación (*nod*, *noe*, y *nol*) están ubicados en un operón e inician la síntesis por parte del microbio de lipo-quito-oligosacáridos denominados factores Nod (por factores de nodulación) los cuales son necesarios para la infección de los pelos radiculares (Downie, 1998; Perret *et al.*, 2000).

En este “diálogo molecular” no sólo influyen las moléculas arriba descritas, sino también otras menos estudiadas, entre ellas betainas, ácidos aldónicos, xantonas y

jasmonatos que son secretadas por la planta y que actúan como inductores de los genes *nod*, y también polisacáridos de superficie, proteínas de secreción tipo I, II y IV, homoserinlactonas, bradyoxetinas, hopanoides, lumícromos, y ácido indol acético secretadas por los rizobios (Cooper 2007).

Los factores Nod inician el enrollado de los pelos radiculares, la formación del primordio nodular a través de la expresión de nodulinas tempranas y permite la entrada de las bacterias a través del pelo (Broughton *et al.*, 2000; Geurts y Bisseling, 2002; Irving *et al.*, 2000). Aquellos rizobios incapaces de formar factores Nod son incapaces de penetrar el pelo radicular (Relić *et al.*, 1993a; 1994a). Así, los flavonoides y los factores Nod constituyen el primer conjunto de señales moleculares intercambiadas por los participantes que fueron muy bien estudiadas.

En relación a ello, se han descrito aproximadamente 30 tipos de flavonoides. Son chalconas, flavonas, isoflavonas y coumestantes, los cuales producen respuestas en cantidades nanomolares o micromolares. Mezclas de flavonoides pueden llegar a ser más efectivos que por separado (Bolaños-Vázquez y Werner, 1997; Begun *et al.*, 2001) y en ciertas ocasiones, pueden actuar como agonistas para ciertos rizobios y antagonistas para otros, como es el caso de las isoflavonas daidzeína y genisteína que son inductores para *B. japonicum* y *Rhizobium sp.* NGR234 y antiinductores para *R. leguminosarum* bv. *trifolii* y bv. *viciae*.

Los Factores Nod son lipo-quitto-oligosacáridos formados por un eje de acetil-D-glucosaminas con cadenas de ácidos grasos adheridas a su extremo no reductor. Estas cadenas tienen diferente grado de saturación entre los distintos Factores Nod. Sobre esta estructura básica podemos encontrar variaciones en cuanto a sustituciones a lo

largo de la cadena que difieren según la especie de rizobio. Estas modificaciones son las que determinarán la especificidad de señal desde la bacteria a un determinado hospedador. Así, *B. japonicum* produce factores Nod que pueden ser tetrámeros o pentámeros de N-acetilglucosamina con la modificación de una 2-O-metilfucosa, fucosa o glicerol en su extremo reductor. En su extremo no reductor está sustituido por ácidos grasos 18:1, 16:0 o 16:1 (San Juan *et al.*, 1992) (Figura I.4).

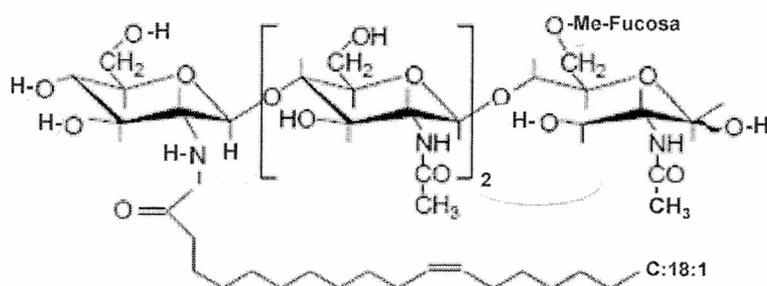


Figura I.4 Estructura del Factor Nod sintetizado por *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. En rojo se muestran las modificaciones típicas en esta especie bacteriana que son susceptibles de cambio en otras especies y/o géneros de rizobios. Modificado de Cullimore *et al.*, 2001 y D’Haeze y Holsters, 2002.
Me: grupo metilo.

b- Factores Nod y especificidad del hospedador

Diferentes cepas de *Bradyrhizobium* son capaces de nodular plantas del género *Parasponia* (única no leguminosa que es nodulada) no sólo en condiciones naturales sino también en condiciones de laboratorio (Trinick y Hadobas, 1989). Esto significa que posee genéticamente los determinantes de la nodulación en dicho género y no se debe simplemente a una condición natural dada. Entonces, ¿Cómo adquirió *Bradyrhizobium* la capacidad de nodular raíces de *Parasponia*?

Estas cuestiones exceden al género *Bradyrhizobium*, encontrándose otros ejemplos como *Ensifer* sp. NGR 234, aislados de nódulos de *Lablab purpureus* (Trinick, 1980), y *Ensifer fredii* USDA 257, aislados de *Glycine soja* (Keyser *et al.*, 1982). Estas bacterias se caracterizan por poseer un amplio rango de huésped, un estado que parece ser una condición ancestral en la evolución de los rizobios (Pueppke y Broughton, 1999). En los rizobios, el rango de huésped es determinado por el "genotipo de nodulación", es decir, la combinación de genes *nod* presentes en el cromosoma y/o en plásmidos (Ueda *et al.*, 1995; Dénarié *et al.*, 1996; Mergaert *et al.*, 1997). Una vez activados por los flavonoides, los productos de estos genes interactúan para sintetizar factores Nod los cuales actúan como señales en los tejidos de la planta que finalmente se diferencian e inician la formación de un órgano nuevo, el nódulo (Dénarié *et al.*, 1996; Esseling y Emons, 2004). Sin embargo, los genes de rango de huésped y de nodulación no se correlacionan con la filogenia (Young y Johnston, 1989; Dobert *et al.*, 1994; Young y Haukka, 1996), sugiriendo que tal vez la transferencia horizontal haya jugado un rol importante en la evolución de la simbiosis (Mergaert *et al.*, 1997; Suominen *et al.*, 2001).

2-Adsorción superficial a raíces y posterior colonización

La adsorción o adhesión a raíces también es un proceso que involucra diferentes tipos de moléculas secretadas por ambos simbioses. Entre ellos, podemos citar compuestos de origen vegetal, como las lectinas vegetales y compuestos de origen bacteriano, como adhesinas, fimbrias, fibrillas de celulosa y polisacáridos de superficie.

Las raíces de las plantas secretan alrededor del 20% de los productos de fotosíntesis en sus exudados (Walker *et al.*, 2003) y así, el microhábitat inmediatamente contiguo a las raíces (rizosfera), supone un nicho ecológico rico en nutrientes con respecto al suelo circundante, siendo factible de ser colonizado por diversos microorganismos que generalmente se encuentran formando biofilms (Morris y Monier, 2003), haciendo de este nuevo nicho un ambiente complejo y difícil de estudiar en el laboratorio.

En este sentido, muchas bacterias edáficas, además de los rizobios, han desarrollado mecanismos de adhesión a raíces, por lo que este paso de la simbiosis es compartido por diversos linajes de procariotas, no asegurando por ello una libre entrada a la leguminosa. Las bacterias que se unen a raíces suelen permanecer adheridas durante toda la vida promoviendo el crecimiento de las plantas y son llamadas por ello bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés *plant growth promoting rhizobacteria*) (Castro-Sowinski *et al.*, 2007). En este sentido, ciertas cepas, tales como *Azospirillum brasilense*, *Pseudomonas spp.*, *Bacillus subtilis* B2 y *Enterobacter cloacae* se comercializan para incrementar la producción (Lucy *et al.*, 2004; Nelson, 2004), pudiéndose encontrar junto con cepas de rizobios en formulaciones de inoculantes mixtos para leguminosas (www.nitragin.com.ar).

Los mecanismos de adhesión de los rizobios a raíces de leguminosas suelen tener cierto grado de especificidad, reconociéndose uniones específicas y no específicas (Lodeiro *et al.*, 1995). A lo largo de tres décadas de estudio principalmente en los rizobios *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *trifolii* y *B. japonicum*, se han propuesto varios tipos de unión a raíces, entre los cuales podemos citar uniones mediadas por lectinas

vegetales (Dazzo y Hubbell, 1975; Liang y Emerich, 1987; van Rhijn *et al.*, 1998; Lodeiro *et al.*, 2000), mediadas por diferentes lectinas bacterianas (Kijne *et al.*, 1988; Smit *et al.*, 1992; Ho *et al.*, 1993; Mongiardini *et al.*, 2007), mediada por fibrillas de celulosa (Dazzo *et al.*, 1984; Smit *et al.*, 1986) y finalmente mecanismos menos caracterizados que relacionan algún tipo de función de las fimbrias, pili y polisacáridos de superficie en la adhesión (Galibert *et al.*, 2001). En este sentido, existen diversos indicios que muestran que mutantes EPS- de *B. japonicum* sin galactosa en su estructura (el hapteno de la lectina bacteriana, (Ho *et al.*, 1990)) tienen menor adhesividad a raíces de soja que las cepas salvajes (Ausmees *et al.*, 2003; Pérez Giménez *et al.*, enviado). Sin embargo, y a pesar de los grandes esfuerzos de estos grupos de investigación, nuestro conocimiento sobre la multiplicidad de factores que afectan la adhesión bacteriana y los cambios fisiológicos que se inducen en los rizobios a través del contacto directo con las raíces de leguminosas todavía es escaso.

3-Invasión de los tejidos del hospedador

Existen tres zonas diferentes de pelos radiculares a lo largo de la raíz en cuanto a su crecimiento y arquitectura celular (Miller *et al.*, 1997; Gage, 2004), pero solo los pelos radiculares de la zona III responden a los rizobios o a los Factores Nod por deformación o enrulado (Heidstra *et al.*, 1997; Esseling *et al.*, 2004). En la Figura 1.5 se muestra un detalle de estas zonas y las modificaciones que tienen lugar cuando se inoculan rizobios sobre la raíz de alfalfa.

La adhesión de los rizobios a la punta de los pelos radicales provoca un cambio en la dirección de su crecimiento, de manera que se forma una especie de “bolsillo” donde una o muy pocas bacterias quedan atrapadas. Así, a partir de este “bolsillo” se originan los hilos de infección que crecerán a lo largo del pelo radicular en busca del nódulo en formación (Figura I.6). Estos hilos de infección se ramifican a nivel de la base del pelo, pasando entre las células corticales. El pasaje del hilo de infección de una célula a otra implica degradación local de la pared celular, fusión de ésta con el hilo e iniciación de una nueva invaginación que permite el crecimiento del mismo (van Spronsen *et al.*, 1994).

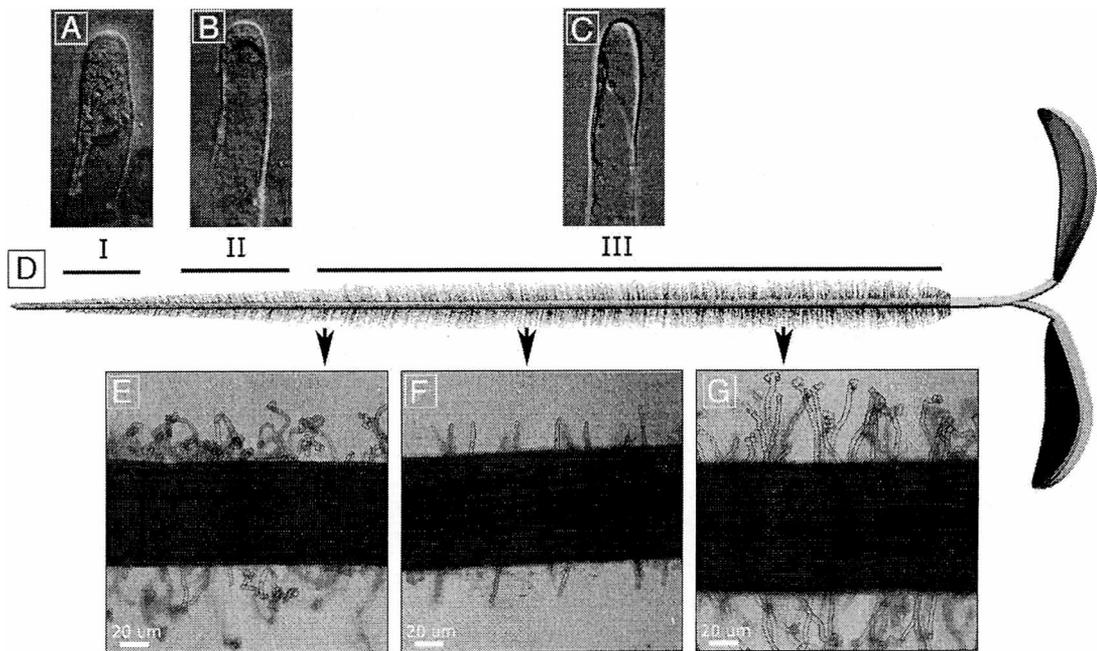


Figura I.5 Morfología de los pelos radicales de raíces de alfalfa inoculadas y no inoculadas con *S. meliloti*. (A a C) Pelos radicales típicos de las zonas I, II y III respectivamente, de plantas de alfalfa no inoculadas. (D) Diagrama de una planta de alfalfa joven, mostrando la localización de las zonas I, II, y III. (E a G) Fotografías que muestran las respuestas de los pelos a *S. meliloti* a lo largo de la raíz. Fotos y dibujo originales de Gage (2004).

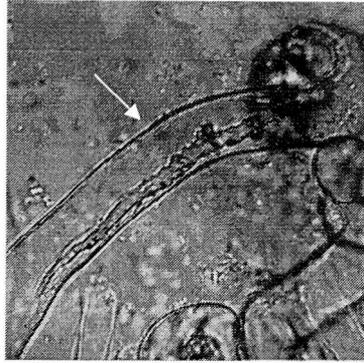


Figura I.6 Hilo de infección completamente formado en un pelo radical de alfalfa enrulado (flecha) inoculado con *S. meliloti*. Fotografía de Gage (2004)

A lo largo de todo el crecimiento del hilo de infección, las respuestas de defensa de la planta deben ser suprimidas de tal manera que permitan un “libre acceso” de las bacterias en división y no sean reconocidas éstas como parásitos. En este sentido, los polisacáridos superficiales parecen jugar un rol crucial en la inhibición de estas respuestas de defensa (Fraysse *et al.*, 2003).

Ciertas interacciones, como por ejemplo las que se dan entre plantas no leguminosas y rizobios y entre *Arachis hypogaea* y *B. spp.*, no involucran el desarrollo de un hilo de infección sino que los rizobios penetran por roturas que generalmente ocurren en las axilas de raíces secundarias emergentes y se dispersan luego por los espacios intercelulares (Boogerd y van Rossum, 1997; Morgante *et al.*, 2005). Este modo de invasión es considerado evolutivamente más primitivo que la invasión a través del hilo de infección (Sprent y de Faría, 1988).

4-Organogénesis del nódulo e invasión

Una vez alcanzado el nódulo en formación, las bacterias se descargan dentro de las células vegetales corticales en un proceso similar a la endocitosis, lo cual usualmente genera una nueva membrana vegetal llamada membrana peribacteroidal, que rodea a una o pocas bacterias formando el simbiosoma. Este mecanismo de entrada de los rizobios a las células vegetales tiene ciertas similitudes con los mecanismos usados por otras bacterias y hongos parásitos como se muestra en la Figura I.7. Así, en todas estas interacciones, sean parasíticas o mutualísticas, se forma un simbiosoma como característica distintiva (Parniske, 2000).

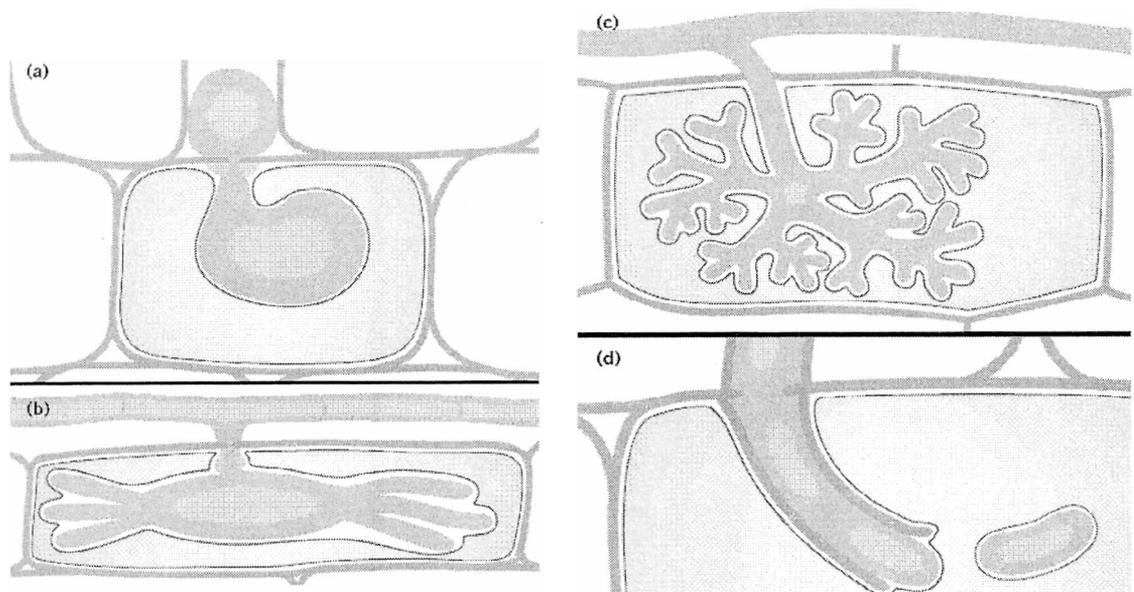


Figura I.7 Ejemplos de endosimbiosis en las que se desarrolla un simbiosoma. A y B: simbiosis parasíticas, C y D: simbiosis mutualísticas (A) Complejo haustorial de *Peronospora* (oomycete) dentro de una célula del mesófilo de hoja. (B) Complejo haustorial de *Erysiphe graminis* dentro de una célula de epidérmica de hoja. (C) Estructura arbuscular de *Glomus sp.* dentro de una célula cortical de raíz (micorriza). (D) Hilo de infección y bacteroide dentro de una célula de nódulo radical.

En color azul, el microorganismo, en trazo gris grueso, la pared vegetal, en trazo gris fino, la membrana plasmática, en amarillo, el collar de calosa y en rojo, el simbiosoma. Esquema tomado de Parniske (2000).

Una característica distintiva entre estas relaciones es que en las primeras, se depositan β -glucanos por la actividad de una enzima típica de la membrana peribacteroidal llamada β -1,3-glucano (calosa) sintasa (figura I.XX A y B, en amarillo), mientras que en las segundas, no existe deposición. Esta ausencia de calosa sería un efecto de la acción de los EPS en la inhibición de las respuestas de defensa de la planta (Ahlborn y Werner, 1991) a juzgar por estudios *in vitro*.

Dependiendo del genotipo de la leguminosa, el primordio del nódulo se forma en alguna de las tres capas de células de la corteza radical: interna, media y externa. Estas células, una vez invadidas, detienen su crecimiento pero comienzan a diferenciarse en conjunción con los bacteroides para la posterior fijación de N_2 .

Clásicamente, los nódulos se dividen en dos tipos de acuerdo a su morfología y tipo de crecimiento, esto es: determinados (formados en la corteza media o externa) e indeterminados (formados en la corteza interna). Entre los primeros podemos citar los nódulos formados en plantas de soja y poroto mientras que son ejemplos típicos de los segundos los de alfalfa, trébol, arveja, entre otros. Aquellos rizobios con amplio rango de huésped que tienen la habilidad de infectar leguminosas que desarrollan ambos tipos de nódulos, han sido de interés para el estudio del porqué de esta diferencia (Patriarca *et al.*, 2004; Manoury *et al.*, 2007), pero hasta hoy, poco se sabe en este sentido.

En los nódulos indeterminados, las células del primordio nodular mantienen distalmente su actividad meristemática, dando así nódulos cilíndricos en los que se puede distinguir hasta 5 o inclusive 6 zonas de acuerdo al estadio de desarrollo celular (Figura I.8). Los nódulos determinados, por el contrario, son estructuras

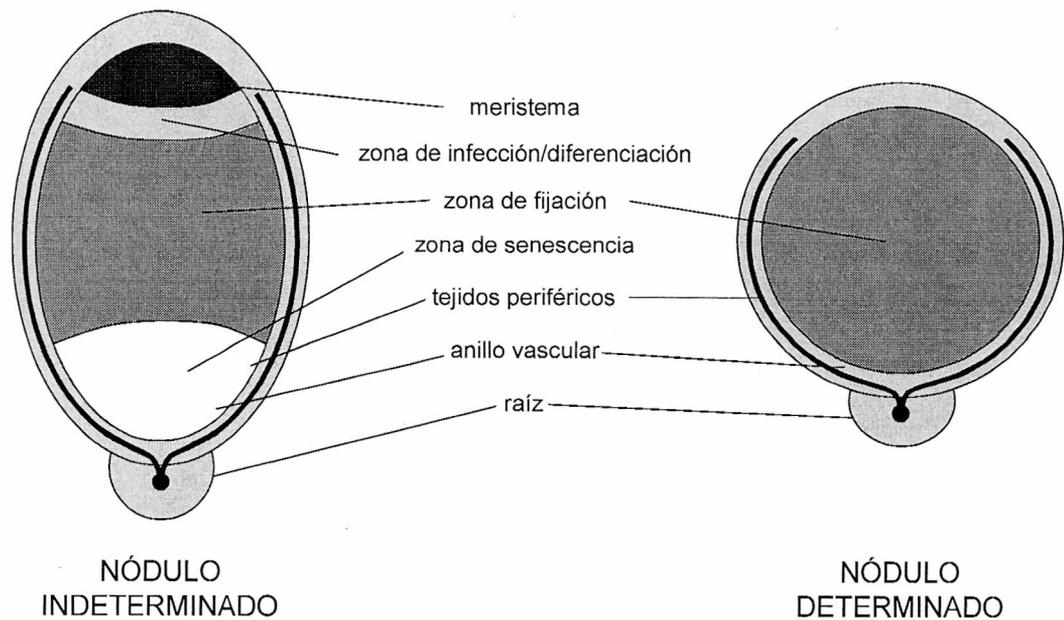


Figura I.8 Esquema de la arquitectura general de nódulos indeterminados (izquierda) y determinados (derecha) vista en corte longitudinal.

cilíndricas sin meristema persistente en los cuales aparentemente no existe distinción zonal entre las células invadidas jóvenes y maduras.

5-Diferenciación de las bacterias en bacteroides y Fijación Biológica de N₂

Uno de los pasos más fascinantes de las etapas simbióticas, es el que culmina en la diferenciación de la bacteria en un estadio terminal llamado bacteroide. Numerosos genes son regulados de manera positiva y negativa una vez alcanzada la célula huésped, tanto por el tejido radical de la planta (Gyorgyey *et al.*, 2000) como por la bacteria diferenciada (Sarma y Emerich, 2005; Brechenmacher *et al.*, 2008). La señal más importante implicada en este proceso es, quizá, la baja presión parcial de O₂ dado por el ambiente reductor reinante. Dentro de la bacteria, diversos reguladores

transcripcionales, entre los cuales se encuentran NifA, FixL y FixJ, son imprescindibles para originar una cascada de señales que culminarán en el patrón de expresión y metabolismo típico de los bacteroides (Kouchi *et al.*, 2004; Sarma y Emerich, 2005; Prell y Poole, 2006; Brechenmacher *et al.*, 2008; Socorro-Mesa, 2008). Así, en este estadio terminal en que la bacteria es encerrada por una membrana de origen vegetal, la bacteria pierde el/los flagelos, es incapaz de reproducirse, expresa la enzima nitrogenasa y fija N₂ atmosférico, el cual es cedido íntegramente a la planta. A cambio, los bacteroides reciben fotosintatos en forma de ácidos dicarboxílicos (Prell y Poole, 2006). Típicamente, el C ingresa a través de la membrana bacteriana vía la proteína integral transportadora de ácidos dicarboxílicos DctA (por sus siglas en inglés *C4-dicarboxylic acid transport protein*). Este C se canaliza mayormente hacia el ciclo de Krebs para la generación de ATP que será utilizado posteriormente por la enzima nitrogenasa. En los bacteroides que forman nódulos determinados, parte de este C es canalizado hacia PHB, mientras que en los nódulos indeterminados esto no ocurre (Prell y Poole, 2006).

I.6 Objetivos de este Trabajo de Tesis

I.6.1 Objetivo general

Tanto los EPS bacteriano como el PHB son polímeros que revisten especial importancia dado sus características como molécula señal y/o supresora de las respuestas de defensa vegetales (EPS) y su metabolismo en relación con la disponibilidad de C y energía (PHB).

A pesar de los numerosos estudios desarrollados en estos polímeros tanto en vida libre como en simbiosis con leguminosas, todavía no es bien comprendido el rol que juegan, especialmente en simbiosis (Frayssé *et al.*, 2003, Trainer y Charles, 2006). Particularmente además, los rizobios de crecimiento lento como *B. japonicum*, resultan ser menos estudiados que los rizobios de crecimiento rápido como *R. etli*, *S. meliloti* y *R. leguminosarum*.

En este sentido, nuestro trabajo está enfocado a profundizar los conocimientos de las características fisiológicas que permiten la acumulación del EPS y el PHB en *B. japonicum* y cómo tienen influencia en la simbiosis con plantas de soja.

I.6.2 Objetivos particulares

1- Profundizar el estudio de la desviación del C en cultivos limitados en la fuente de N. Trabajos previos en nuestro laboratorio indicaron que los cultivos de *B. japonicum* crecidos en manitol como única fuente de C y en escasez de la fuente de N llevan a una regulación fina que desvía el flujo de C hacia EPS en detrimento de PHB, entre otros cambios (López García, 2004). Nuestro trabajo se centró en extender el

conocimiento de los flujos hacia EPS o PHB en malato como única fuente de C y en suficiencia o escasez de la fuente de N y analizar el EPS formado para determinar su composición en *B. japonicum* USDA 110 y mutantes sitio-específicos generados por otros nosotros y por otros laboratorios defectivas en la síntesis del mismo.

2-Estudiar el rol que tanto EPS y PHB poseen en simbiosis con plantas de soja analizando diferentes parámetros simbióticos como infectividad (Bhuvanewari *et al.*, 1980), la capacidad de formar nódulos, la fijación biológica de N₂ y en algunos casos la competición para la formación de nódulos. Para ello se contó con los mutantes del punto anterior y se generaron otros mutantes en un regulador del flujo de C intracelular (Povolo y Casella, 2000).

I.7.1 Hipótesis básicas

1- La síntesis de exopolisacáridos (EPS) y poli-β-hidroxi-butarato (PHB) se encuentran ligadas directa o indirectamente con la disponibilidad de la fuente de N en que se cultivan los rizobios.

2- Alteraciones en la composición y en las cantidades de exopolisacáridos bacterianos afectan los procesos de infección y nodulación en la pareja simbiótica *Bradyrhizobium japonicum*-soja.

I.7.2 Hipótesis de Trabajo

1- Las bacterias crecidas en medios líquidos definidos en *batch* en escasez de la fuente de N son más infectivas que aquellas cultivadas en exceso de la fuente de N.

- 2- Los EPS bacterianos son moléculas plásticas sujetas a regulación en relación con factores ambientales y su composición varía según la fuente de C y la disponibilidad de N en que se cultiva *Bradyrhizobium japonicum*.
- 3- El gen *blr0227* es un regulador global del flujo de carbono intracelular en *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 y su inactivación genética causa un aumento significativo de los niveles de EPS en detrimento de la síntesis de PHB al igual que en *R. etli* (Encarnación *et al.*, 2002).
- 4- La delección en *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 del gen *blr7578 (exoB)* se ve reflejada en la ausencia de galactosa en su EPS y en consecuencia, altera los perfiles normales de nodulación.
- 5- La delección de los genes *blr2382* y *blr2383* de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 resultan en un fenotipo donde se altera la composición de EPS pero no del lipopolisacárido. Dicha alteración produce polisacáridos extracelulares sin ácido galacturónico y en consecuencia la molécula se torna menos hidrofóbica.
- 6- Los mutantes en los genes *blr2382* y *blr2383* de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 producen menor cantidad de EPS que la cepa parental.

Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

II.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados durante esta Tesis se detallan en la tabla II.1 junto con sus principales características

Tabla II.1 Cepas Bacterianas y plásmidos utilizados

Cepas	Características relevantes	Referencia
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	<i>recA</i> , Δ <i>lacU169</i> , Φ 80 <i>dlacZ</i> Δ M15	Bethesda Res. Lab.
S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en el cromosoma	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>		
USDA 110	Cepa salvaje Nod ⁺ Fix ⁺ Cm ^r	Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA)
LP 3004	Mutante espontáneo derivado de USDA 110, Str ^r , Nod ⁺ Fix ⁺ Cm ^r	López García <i>et al.</i> , 2002
Δ P22	Mutante delecional <i>blr7576</i> , <i>blr7577</i> y <i>blr7578</i> , Spc ^r Km ^r	Becker <i>et al.</i> , 1998
LP 3010	Mutante delecional <i>blr2382</i> y <i>blr2383</i> , derivado de USDA 110, Km ^r Spc ^r , Str ^r	esta Tesis
LP 3011	Mutante delecional <i>blr2382</i> y <i>blr2383</i> , derivado de USDA 110, Km ^r Spc ^r , Str ^r	esta Tesis
LP 3012	Mutante delecional <i>blr2382</i> y <i>blr2383</i> , derivado de USDA 110, Km ^r Spc ^r , Str ^r	esta Tesis
LP 3020	Mutante insercional <i>blr0227</i> derivado de LP 3004, Str ^r Gm ^r	esta Tesis
LP 3021	Mutante insercional <i>blr0227</i> derivado de Δ P22, Spc ^r Km ^r Gm ^r	esta Tesis
LP 3013	Mutante delecional <i>blr7578</i> derivado de USDA 110, Km ^r	esta Tesis
LP 3014	Mutante delecional <i>blr7578</i> derivado de USDA 110, Km ^r	esta Tesis
LP 3015	Mutante delecional <i>blr7578</i> derivado de USDA 110, Km ^r	esta Tesis
LP 3016	Mutante delecional <i>blr7578</i> derivado de USDA 110, Km ^r	esta Tesis
LP 3017	Mutante delecional <i>blr7578</i> derivado de LP 3010, Spc ^r Str ^r Km ^r	esta Tesis

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pRK2013	replicon ColEI, tra ⁺ de RK2, Km ^r	Figurski <i>et al.</i> 1979
pGemT-easy ^r	Vector multicopia, Ap ^r	Promega
pK18mob	Mob ⁺ Km ^r , suicida en rizobios	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pG18mob2	Mob ⁺ Gm ^r , suicida en rizobios	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pG18mob LK	derivado de pG18mob2 Mob ⁺ Gm ^r , suicida en rizobios, sitio de clonado múltiple modificado	Cedido gentilmente por Lagares
pBBR1MCS2	Km ^r , amplio rango de hospedante	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pBBR1MCS5	Gm ^r , amplio rango de hospedante	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pHP45Ω	Ap ^r , Sm ^r , Sp ^r , donador del interposón Ω Sm/Sp	Prentki <i>et al.</i> , 1984
pCB303	Tc ^r , lacZ, phoA, oriT	Schneider y Beck, 1987
pUC4-K	Ap ^r , Km ^r , gen de Km delimitado por sitios de clonado múltiple	Vieira y Messing, 1982
pIQ01	derivado de pGemT-easy llevando un fragmento interno del gen <i>blr0227</i>	esta Tesis
pIQ02	derivado de pG18mob2 llevando un fragmento interno del gen <i>blr0227</i>	esta Tesis
pIQ03	derivado de pBBR1::MCS5 llevando el gen <i>blr0227</i> completo	esta Tesis
pIQ04	derivado de pCB303 llevando el gen <i>blr0227</i> completo	esta Tesis
pIQ05	derivado de pG18mobLK llevando un fragmento interno del gen <i>blr7578</i>	esta Tesis
pIQ06	derivado de pG18mobLK:: <i>exoB</i> llevando el cassette kanamicina	esta Tesis
pIQ07	derivado de pBBR1MCS2 llevando el gen <i>blr7578</i> completo	esta Tesis
pIQ08	derivado de pCB303 llevando el gen <i>blr7578</i> completo	esta Tesis
pIQ09	derivado de pGemT-easy llevando el fragmento intergénico entre <i>blr2381</i> y <i>blr2382</i> (A) comprendido entre las bases 2595375 y 2595687	esta Tesis
pIQ10	derivado de pGemT-easy llevando un fragmento intergénico entre <i>blr2383</i> y <i>blr2384</i> (B) comprendido entre las bases 2598116 y 2597844	esta Tesis
pIQ11	derivado de pK18mob llevando el fragmento intergénico A	esta Tesis
pIQ12	derivado de pBBR1MCS5 llevando el	esta Tesis

	fragmento intergénico B	
pIQ13	derivado de pK18mob::A llevando el fragmento intergénico B	esta Tesis
pIQ14	derivado de pK18mob::A::B llevando los fragmentos intergénicos A y B y el cassette Ω Sm/Sp	esta Tesis
pIQ15	derivado de pBBR1MCS2 llevando los genes <i>blr2382</i> y <i>blr2383</i> completos	esta Tesis

II.2 Especies de plantas

Para la mayoría de los ensayos (excepto donde se indica) se utilizó *Glycine max* variedad Don Mario 4800. Otras variedades utilizadas fueron: Don Mario 3100, Don Mario 4600 y A7321RG. También se utilizó la especie *Glycine soja* variedad PI 339871A. Las variedades fueron provistas por el Ing. Agr. Alejandro Peticari del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias de INTA (Castelar, Provincia de Buenos Aires) y por la Dra. Ana Castro del laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP.

II.3 Procedimientos microbiológicos

II.3.1 Medios de cultivo

II.3.1a- Medios líquidos

-Götz y derivados

El medio mínimo de Götz (Götz *et al.*, 1982) se preparó con agua bidestilada. Su composición (salvo donde se indica) fue: manitol 5,0 g.l⁻¹ o malato 3,75 g.l⁻¹, K₂HPO₄

1,06 g.l⁻¹, KH₂PO₄ 0,53 g.l⁻¹, MgSO₄ 0,25 g.l⁻¹, (NH₄)₂SO₄ 0,13 g.l⁻¹, CaCl₂ 15 mg.l⁻¹, NaCl 5,85 mg.l⁻¹, Na₂MoO₄ 2,42 mg.l⁻¹, FeSO₄ 7 H₂O 0,28 mg.l⁻¹, biotina 20 µg.l⁻¹, tiamina-HCl 20 µg.l⁻¹, riboflavina 20 µg.l⁻¹, ácido p-aminobenzoico 20 µg.l⁻¹, piridoxina 20 µg.l⁻¹. La mezcla de manitol o malato, fosfatos, sulfato de amonio, cloruro de sodio y molibdato de sodio fue esterilizada en autoclave a 121°C por 20 minutos. Las soluciones de calcio y magnesio fueron esterilizadas en forma separada también por calor húmedo y se agregaron a la mezcla anterior una vez enfriada. Las mezclas de vitaminas y la solución de sulfato ferroso fueron esterilizadas por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22 µm) y luego agregadas en flujo laminar al resto del medio ya esterilizado.

-PSY

El medio de PSY (Regensburger y Hennecke, 1983) se preparó con agua bidestilada. Su composición fue peptona 1 g.l⁻¹, extracto de levadura 11 g.l⁻¹, KH₂PO₄ 0,3 g.l⁻¹, Na₂HPO₄ 0,3 g.l⁻¹, MgSO₄ 7 H₂O 0,1 g.l⁻¹, CaCl₂ 0,05 g.l⁻¹, y los siguientes micronutrientes: H₃BO₃ 10 mg.l⁻¹, ZnSO₄ 2 H₂O 1 mg.l⁻¹, FeCl₃ 6 H₂O 1 mg.l⁻¹, CuSO₄ 5 H₂O 0,5 mg.l⁻¹, MnCl₂ 4 H₂O 0,15 mg.l⁻¹, Na₂MoO₄ 2 H₂O 0,1 mg.l⁻¹ y biotina 0,2 mg.l⁻¹. La mezcla de peptona, extracto de levadura, y fosfatos fue esterilizada en autoclave a 121°C por 20 minutos. Luego en flujo laminar se agregaron las demás soluciones previamente esterilizadas por separado. Las vitaminas y micronutrientes fueron filtrados a través de membrana (filtros Millipore de 0,22 µm).

-LB

El medio Luria-Bertani (LB, Sambrook *et al.*, 1989), se preparó con agua bidestilada y su composición fue: triptona 10 g.l⁻¹, extracto de levadura y CINa 5 g.l⁻¹ y glucosa 1 g.l⁻¹. La esterilización se realizó durante 20 minutos a 121°C en autoclave.

Para los medios sólidos se agregó agar 1.5% (p/v) y rojo congo 0.25% (p/v) para el caso de YEM-agar.

II.3.2 Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en agua bidestilada (excepto la espectinomicina, que se preparó en metanol) a una concentración 1.000x (con excepción de la tetraciclina que fue 100x) y se esterilizaron por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22 µm).

Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron (µg.ml⁻¹):

-Para *Escherichia coli*: Kanamicina sulfato (Km) 25, Ampicilina (Ap) 200, Streptomycin (Sm) 100, Spectinomicina (Sp) 100, Tetraciclina (Tc) 10 y Gentamicina (Gm) 10.

-Para *B. japonicum.*: Km 150, Sm 400, Sp 200, Gm 100, Cloranfenicol (Cm) 20, y Tc 100.

II.3.3 Conservación de las bacterias

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se hizo por congelamiento rápido de cultivos crecidos en YEM o Götz hasta la fase logarítmica tardía. Para su conservación se agregó glicerol estéril hasta una concentración final del 30% (V/V) y se almacenaron a una temperatura de -20°C. Para uso rutinario, alícuotas de estas

reservas se hicieron crecer en YEM sólido con los antibióticos correspondientes y se mantuvieron a 4°C por períodos que no excedieron de 60 días.

II.3.4 Cultivos bacterianos y preparación de los inóculos

Para realizar los diferentes ensayos, los cultivos se iniciaron a partir de reservas en medio sólido mantenidas a 4°C y se hicieron crecer en Götz-manitol a 28°C con agitación rotatoria a 180 rpm hasta saturación. Este cultivo se diluyó 1:100 en medio de cultivo fresco Götz-manitol y se dejó crecer durante 3 días para asegurar que todas las células estuvieran en fase exponencial. A partir de este cultivo iniciador, se realizaron diluciones 1:50 en los medios a estudiar y se continuó su cultivo en las mismas condiciones hasta la fase de crecimiento deseada.

Para el caso de los cultivos líquidos crecidos en condiciones de microaerobiosis, se realizaron diluciones 1:50 del cultivo iniciador citado anteriormente en medio fresco Götz-manitol en frascos de vidrio completamente llenos y se dejaron crecer durante 10 días dentro de una jarra de Leonard a 28°C con agitación rotatoria a 50 rpm. Para generar un ambiente microaeróbico (2-10 % O₂), se dispusieron 0,5 l de una solución cúprica (CuSO₄ 5g.l⁻¹, H₂SO₄ 0,5 ml.l⁻¹ y detergente Tween 80 2,5g.l⁻¹ pH=2) sobre un recipiente conteniendo lana de hierro colocado dentro de la jarra y se tapó la misma inmediatamente. Como generador de CO₂ se agregó un tubo conteniendo una solución acuosa de bicarbonato de potasio y ácido cítrico. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el caso de las bacterias crecidas en medios sólidos agarizados en cajas de Petri.

II.3.5 Métodos de Recuento

La biomasa se estimó por lecturas de densidad óptica a 500 nm (DO_{500}). El número de células viables se estimó por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC.ml⁻¹) sobre el medio YEM. Los recuentos se realizaron por triplicado. Previamente se había determinado que el recuento de las UFC en el medio YEM sólido arrojaba los mismos resultados que en Götz sólido (López García, 2004). Las placas se incubaron a 28°C y las colonias fueron visibles a partir de los 5 días.

II.4 Soluciones para el cultivo hidropónico de plantas

Se utilizó la solución de Fåhraeus modificada (Lodeiro *et al.*, 2000): CaCl₂.2 H₂O 0,11 g.l⁻¹ MgSO₄.7 H₂O 0,12 g.l⁻¹; K₂HPO₄ 0,20 g.l⁻¹; KH₂PO₄ 0,17 g.l⁻¹, NaCl 0,06 g.l⁻¹, citrato férrico 0,005 g.l⁻¹, y los siguientes micronutrientes: KCl 3,73 mg.l⁻¹, H₃BO₃ 1,55 mg.l⁻¹, MnSO₄ H₂O 0,85 mg.l⁻¹, CuSO₄ 5 H₂O 0,13 mg.l⁻¹, ZnSO₄ 7 H₂O 0,58 mg.l⁻¹, (NH₄)₆Mo₇O₂₄ 4 H₂O 0,018 mg.l⁻¹, pH=7,0. Esta solución se preparó en agua bidestilada. La preparación de fosfatos, cloruro de sodio, citrato férrico y micronutrientes se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 20 minutos, y luego de permitir su enfriamiento hasta temperatura ambiente, se le agregaron las sales de calcio y magnesio de preparaciones 1.000x previamente esterilizadas por calor húmedo.

II.5 Análisis bioquímicos

II.5.1 Separación, purificación y cuantificación de EPS

300 ml de cultivo de *B. japonicum* crecidas en los medios apropiados fueron centrifugados dos veces a 12.000 xg por 45 minutos a 4°C. El EPS fue precipitado del sobrenadante con tres volúmenes de etanol 96° a -20°C durante una noche. Luego de otra centrifugación en las mismas condiciones, el sedimento fue resuspendido en NaCl 0,5 M, incubado una noche a 4°C y dializado extensivamente contra agua bidestilada en membranas con un corte de 3.500 Da (para los EPS de las cepas $\Delta P22$, LP 3013 y LP 3017) o 14.000 Da (para los EPS de las cepas USDA 110 y LP 3010) y liofilizados para su posterior procesamiento.

Parte del EPS así obtenido se cuantificó con antrona 0,2 % en H₂SO₄ 95% (Trevelyan *et al.*, 1952) usando glucosa como estándar y otra parte fue analizada a través de HPAEC como se describe mas adelante.

II.5.2 Cuantificación de PHB

Los sedimentos celulares de los mismos cultivos utilizados para cuantificar el EPS fueron resuspendidos en agua bidestilada estéril y separados en dos fracciones. Una fracción se reservó para la determinación de proteínas (ver mas adelante) y la otra se homogeneizó con lavandina comercial en tubos de vidrio Corex (Cevallos *et al.*, 1996). Dicha suspensión se centrifugó a 10.000 xg y el sedimento fue resuspendido en agua

bidestilada estéril para luego ser centrifugado nuevamente en las mismas condiciones y posteriormente resuspendido en una mezcla alcohol-acetona en una relación 1:1. Finalmente, el sedimento proveniente de una nueva centrifugación en las mismas condiciones, se resuspendió en 1 ml de cloroformo, se homogeneizó la mezcla por agitación vigorosa seguida de breves inmersiones en agua a 60°C para inmediatamente disponer 3 alícuotas de entre 5 y 100 µl en tubos de ensayo de vidrio previamente lavados con etanol. Los tubos se secaron en estufa a 60°C y luego se agregaron 10 ml de H₂SO₄ a cada uno y se llevaron a un baño de agua a 100°C por 10 minutos. Se dejó enfriar y alícuotas de 1 ml de esta suspensión fueron medidas como ácido crotónico a 235 nm (Law y Slepecky, 1961).

II.5.3 Cuantificación de proteínas

La segunda fracción de los sedimentos celulares fue tratada por ultrasonido con un sonicador Sanyo Soniprep 150 a potencia media en tres intervalos de 15 segundos cada uno. Luego de centrifugar la suspensión, se midió el contenido proteico del sobrenadante por el método de Bradford (Bradford, 1976) usando seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

II.5.4 Análisis cromatográficos por HPAEC

El EPS purificado fue resuspendido en agua mili Q y tratado con ácido trifluoroacético (TFA) 2 M por dos horas a 120°C. El hidrolizado fue inyectado en un cromatógrafo

Dionex DX-300 Bio-LC equipado con una columna CarboPack PA-10 y un detector de pulso amperométrico. Fueron utilizadas las siguientes condiciones: para azúcares neutros se usó una solución isocrática con 7% de solución A (NaOH 200mM) y 93% de solución B (agua) con un flujo de 1 ml.min⁻¹ usando 2-desoxiglucosa como estándar interno. Para azúcares ácidos se usó una solución isocrática con 25% de solución A, 65% de solución B y 10% de solución C (acetato de sodio 1 M) con un flujo de 1 ml.min⁻¹ usando ácido siálico como estándar interno. Para los ensayos de desacetilación de los exopolisacáridos, las muestras hidrolizadas con TFA fueron liofilizadas y posteriormente tratadas con metóxido de sodio 0,1 N en metanol a temperatura ambiente durante una noche.

Estos análisis se realizaron en el Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR), Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA con la valiosa colaboración de las Dras. Alicia Couto y Adriana Casabuono.

II.5.5 Extracción de LPS

Para el aislamiento de los lipopolisacáridos, las bacterias fueron cultivadas en medio de Götz-manitol a una temperatura de 28°C y con una agitación de 180 rpm hasta obtener una DO₅₀₀=0,8 (fase exponencial tardía). Las bacterias fueron luego centrifugadas a 10.000 xg a 4°C durante 20 minutos. Para eliminar restos de medio de cultivo y polisacárido liberados al mismo, los pellets bacterianos fueron lavados con 5 ml de solución de NaCl 0,5 % (p/v) por gramo de células húmedas. El LPS fue

extraído según la técnica de Westphal y Jann (1965) para la cual se emplearon 100 ml de mezcla fenol fundido-agua (45 : 55, v:v) por cada 14 gramos de células húmedas. La mezcla obtenida fue incubada a 60°C con agitación energética durante 20 minutos. Las fases fenólica y acuosa fueron separadas por centrifugación (40 minutos a 9.600 $\times g$) y la fase fenólica fue reextraída con la misma cantidad de agua que la utilizada en la primera extracción. Las fases fueron separadas por centrifugación en las mismas condiciones y la fase acuosa fue mezclada con la obtenida anteriormente. La fase acuosa resultante fue dializada contra agua bidestilada durante tres días a temperatura ambiente para eliminar los restos de fenol. En esta diálisis fue empleada una membrana con un tamaño de corte de 14 kDa. La solución de LPS así obtenida fue tratada con RNasa A, DNasaI y Proteinasa K, a una concentración final de cada una de las enzimas de 15 $\mu g ml^{-1}$ en tampón de $MgSO_4$ 10 mM y Tris base 50 mM pH = 7,0 durante toda una noche a 37°C con agitación suave.

II.5.6 Electroforesis en gel de los polisacáridos superficiales

Alicuotas de EPS o LPS fueron resuspendidas en buffer Laemmli (Laemmli, 1970), hervidas durante 5 minutos y sonicadas 15 minutos. Luego se sembraron en un gel de poliacrilamida 17,5% (Díaz-Marrero *et al.*, 1998) y se corrieron a 100 V durante dos horas. El gel fue sumergido en solución fijadora (etanol 40%, ácido acético 5% y azul de alcian 0,005% sólo para los EPS) durante toda la noche. Luego se trató con ácido periódico 0,7% p/v, se lavó con agua bidestilada y se tiñó con plata BioRad 10% v/v durante 10 minutos. Posteriormente se realizaron cinco lavados con agua bidestilada y

se agregó desarrollador BioRad. La reacción fue detenida con ácido acético 5% una vez visualizados los EPS.

II.6 Producción de biopelículas (*biofilms*) bacterianas

Se utilizó el método de Fujishige *et al.*, (2006). Las cepas de *B. japonicum* a ensayar se crecieron en el medio de Götz con manitol como única fuente de C hasta fase exponencial tardía. Luego, se diluyeron en medio fresco de Götz a una DO_{500} de 0,1 y posteriormente se dispusieron por cuatuplicado en una placa multipocillo de poliestireno tapada con *parafilm* estéril más una tapa de poliestireno (para evitar una excesiva evaporación) siendo incubados a 28°C en agitación a 50 rpm. A diferentes intervalos de tiempo se midió la DO_{500} para normalizar el crecimiento de cada cepa y posteriormente se tiñeron los pocillos con una solución de cristal violeta 0,1% durante 15 minutos, se lavaron tres veces con agua destilada, se dejaron secar y se disolvió el colorante por adición de 150 μ l de una solución acetona-etanol 80:20. La absorbancia de dicha suspensión fue medida a 570 nm. Como control negativo se utilizó el mismo medio de Götz sin inocular.

II.7 Microscopía

II.7.1 Óptica

Los cultivos vivos de *B. japonicum* se colocaron entre porta y cubreobjetos y se observaron en un microscopio óptico Carl Zeiss Jena por contraste de fase con un aumento de 1.000 X con luz visible.

II.7.2 Electrónica

Los nódulos cortados a la mitad se fijaron en glutaraldehído al 2% en buffer de fosfatos (pH 7,2-7,4) durante 2 horas a 4°C. La fijación secundaria se realizó con tetróxido de osmio 1% p/v durante una hora a 4°C y posteriormente se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes y se incluyeron en resina epoxi. Los cortes ultrafinos (70 nm) se realizaron con un ultramicrotomo SuperNova Reichert-J, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se examinaron en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EX II (JEOL) ubicado en el Servicio Central de Microscopía de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

II.8 Técnicas de Biología Molecular y oligonucleótidos utilizados

II.8.1 Obtención de ADN molde

Los ADN moldes para las amplificaciones fueron obtenidos utilizando las siguientes metodologías:

a) Extracción acuosa: las células de los cultivos (líquidos o en placa) fueron lavadas con NaCl 1 M y resuspendidas en 50-100 µl de agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por 10 ó 15 minutos y centrifugada a 14.000 g por 10 minutos; 5 µl de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde.

c) Extracción fenólica: se centrifugaron a 14.000 xg 1,5 ml de un cultivo bacteriano de la cepa correspondiente en fase exponencial tardía durante 15 minutos. Las células se

lavaron en 200 μ l de N-lauril sarcosina al 0,1% en TE y se centrifugaron a 14.000 xg . A continuación, se resuspendieron en 300 μ l de TE, se añadió 100 μ l de lisozima 1 $mg.ml^{-1}$ (en sacarosa 20%), se incubó una hora a 37°C y luego se agregaron 100 μ l de pronasa (2,5 $mg.ml^{-1}$ en buffer Tris Edta [TE], predigerida a 37°C durante un mínimo de 90 minutos) y 100 μ l de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 5% en TE. Se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Luego, se precipitaron los restos celulares con 125 μ l de una solución de NaCl 5 M en TE previamente esterilizada en autoclave. Se incubó en hielo 30 minutos, y se centrifugó. Posteriormente, a la solución de ADN se le añadió un volumen de fenol y se agitó con vórtex vigorosamente durante un minuto, se dejó reposar y se mezcló nuevamente de la misma manera durante otro minuto. Se centrifugó durante cinco minutos, pasando a continuación la fase superior acuosa a un nuevo tubo donde se extrajo una vez más con fenol. Recogida la fase acuosa, se procedió a dos nuevas extracciones sucesivas con fenol/cloroformo y cloroformo. El ADN se precipitó añadiendo tres volúmenes de etanol 100% a -20°C, se mezcló por inversión y se incubó a -20°C un mínimo de dos horas. Finalmente, se centrifugó a 14.000 xg durante 15 minutos y el precipitado se lavó con 0,5 ml de etanol al 70%, se secó al vacío durante 20-30 minutos y el ADN seco se resuspendió en 25-50 μ l de agua bidestilada estéril.

II.8.2 Preparación de ADN plasmídico

Los plásmidos de *E. coli* y *B. japonicum* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook *et al.* (1989).

Brevemente, se suspendieron bacterias crecidas en medio sólido en una solución Tris/HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH= 8.0. Se agregó luego una solución de NaOH 0,2 M, SDS 1% y se mezcló por inversión suave. Finalmente, se agregó una solución de KAc 3 M, pH= 4.8 mezclando suavemente. Luego se centrifugó la mezcla a 14.000 xg durante 15 minutos a 4°C y se agregó 15 μl de silica clean. Se centrifugó a 14.000 xg y se lavó el sedimento tres veces con una solución de NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH=7,5, EDTA 2,5 mM y etanol 50%. Posteriormente se dejó secar y se resuspendió en 20-30 μl de agua bidestilada, se incubó durante 5 minutos a 65°C, se centrifugó a 14.000 xg y se tomó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico.

II.8.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico capilar Idaho 1605 (Idaho Technology) o cicladores BioRad Icycler y MyCicler. La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue: Tris-HCl 50 mM, pH 8.3, seroalbúmina bovina (BSA) 500 $\mu g ml^{-1}$; $MgCl_2$ 3 mM; dNTPS 200 μM ; 2 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y cada uno de los cebadores para PCR específicas en concentraciones 10 μM . Los cebadores empleados fueron los siguientes:

Nombre	secuencia 5' a 3'	referencias
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	producto comercial
M13 Rv	GCGGATAACAATTTTCACACAGG	producto comercial
Km Fw	CATCGGGCTTCCCATACA	Mongiardini, 2008
Km Rv	TGCCATTCTCACCGGATT	Mongiardini, 2008
Sm/Spc	CGGTGGATGACCTTTTGAAT	esta Tesis
aniA Fw	GGTCAAGGATGGCGAAGA	esta Tesis
aniA Rv	GATCTGCTTGCGGAATT	esta Tesis
aniA PR	ATCTGGCCCATGATGACTTC	esta Tesis

aniAT Fw	TGCTTATTTTGTTCGTTGC	esta Tesis
aniAT Rv	TTACCCAGGAAGCAGTTTG	esta Tesis
ugdH Fw	GTGGGTGTCTTACGGTGGG	esta Tesis
ugdH Rv	GCAATGCCAGACCAGGACA	esta Tesis
lspL Fw	CTCACCTTCAAGCCCGACAC	esta Tesis
lspL Rv	GCTGTAGATGTTGCGGAGG	esta Tesis
ugdH comp Rv	GCATCACCTGTGCAACAAAC	esta Tesis
ugdH up Fw	GCGACAGCACTTGCCACTCT	esta Tesis
lspL comp Fw	AGGGTGTTTCAGTGGAGCATC	esta Tesis
lspL dw Rv	AATCTCCATAGCGGCAGCGA	esta Tesis
exoB Fw	ATGACCGATCCGCAGAAGTA	esta Tesis
exoB Rv	ACCGTAGGCAGGTCAGAGTG	esta Tesis
exoB total Fw	GGATGCAGAAATTCGGACTC	esta Tesis
exoB total Rv	AGGCAAGGTGCGGGTGT	esta Tesis

II.8.4 Digestiones del ADN

Las digestiones con endonucleasas de restricción se realizaron en las condiciones óptimas para cada enzima, siguiendo las indicaciones de temperatura y tampón propuestas por los proveedores, y las recomendaciones descriptas en Sambrook *et al.* (1989).

Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 µg de ADN, 0,5-1 unidad de la enzima a utilizar en el tampón correspondiente, en volúmenes finales de 10-25 µl. Estas reacciones se llevaron a cabo incubando las mezclas de reacción a la temperatura indicada por el fabricante durante un período de tiempo de al menos 12 horas.

II.8.5 Electroforesis de ácidos nucleicos

Las preparaciones plasmídicas, de ADN total, los productos de digestión y de PCR fueron separados en geles de agarosa al 0,8; 1; y 1,5 % según el tamaño del fragmento a separar, conteniendo 0,5-1,0 µg de bromuro de etidio µg ml⁻¹ en buffer TBE (Tris-

borato 45 mM, EDTA 1 mM pH=8). Como marcador de peso molecular fue utilizado el fago λ digerido con *Hind*III. El perfil de bandas obtenido fue fotografiado usando una cámara digital Kodak modelo DC 120 bajo iluminación ultravioleta.

II.8.6 Secuenciación de ADN

Las secuenciaciones de los fragmentos de interés se llevaron a cabo en Macrogen Corp., Seúl, Corea del Sur y en el IGEVET (Instituto de Genética Veterinaria, CONICET-UNLP).

II.8.7 Conjugaciones biparentales y triparentales

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon *et al.* (1989) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1,5 ml se mezclaron 0,5 ml de la cepa donadora a una densidad óptica a 620nm de 0,4-0,5 con 0,9 ml de un cultivo de igual DO de la cepa receptora. La mezcla fue luego centrifugada a 3.000 $\times g$ durante 8 minutos y el sedimento resuspendido suavemente en aproximadamente 50-75 μl de medio de cultivo. Dicha suspensión fue colocada en una caja de Petri con medio sólido PSY sin antibióticos e incubada a 28°C durante 48 horas. Finalmente, la mezcla de bacterias donadoras y receptoras fue resuspendida en agua bidestilada estéril y plaqueada en medio sólido suplementado con el/los antibiótico/s adecuado/s para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se

agregaron ya sea la bacteria donadora o la receptora. En el caso de la conjugación triparental, la mezcla de bacterias se realizó agregando una *E. coli* que llevaba el plásmido pRK2013 (Figurski *et al.*, 1979), el cual aporta en *trans* los genes necesarios para la movilización.

II.8.8 Preparación de células electrocompetentes. Electrotransformación de *E. coli*

Se siguió la técnica de Tung y Chow (1995). Se inocularon 500 ml de medio LB sin el agregado de NaCl con 1 ml de cultivo de la cepa de *E. coli* de interés, la que había sido crecida desde el día anterior. El cultivo fue inoculado a 37°C y agitado vigorosamente hasta que la DO₆₀₀ llegó a 0,8 unidades. Las células fueron centrifugadas a 4.000 xg por 15 minutos a 4°C y se lavaron dos veces con 200 ml de glicerol 10% a 4°C. Luego, las células se resuspendieron suavemente en baño de agua-hielo en 0,5 ml de GYT (glicerol 10%, extracto de levadura 0,125% y triptona 0,25%) y se fraccionaron en alícuotas de 100 µl. Las mismas se conservaron congeladas a -80°C hasta su utilización. Las electrotransformaciones fueron llevadas a cabo usando un equipo Gene Pulser provisto por BioRad en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 µF, 200 Ω, 2,5 kV). En ellas, se dispusieron 100 µl de *E. coli* electrocompetentes y entre 2-5 µl de plásmido a utilizar resuspendido en agua bidestilada estéril. Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente a las células 1 ml de medio SOC (triptona 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10mM, SO₄Mg 10mM, MgCl₂ 10 mM) y la mezcla se incubó aproximadamente 1 hora a 37°C para permitir que la información contenida en el ADN introducido se expresara.

Posteriormente las bacterias fueron plaqueadas en medio LB sólido con los antibióticos selectivos e incubadas una noche a 37°C.

II.9 Ensayos biológicos

II.9.1 Esterilización superficial de las semillas y germinación

Las semillas de *G. max* y *G. soja* se sumergieron en etanol 96°C por 10 segundos y luego se esterilizaron superficialmente en una solución de lavandina comercial al 20% v/v durante 10 minutos en agitación permanente. Posteriormente, se lavaron al menos siete veces con abundante agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas se germinaron en cajas de 25 cm x 25 cm con agar-agua al 1,5% durante tres o cuatro días en oscuridad a 28°C.

II.9.2 Ensayos de infectividad

Se realizaron siguiendo la metodología de Bhuvaneswari *et al.* (1980). Las semillas esterilizadas superficialmente y germinadas como se indicó anteriormente se transfirieron en forma aséptica a bolsas plásticas de crecimiento en un número de tres plántulas por bolsa. Las bolsas habían sido previamente humedecidas con 10 ml de solución de Fåhraeus. Se llevaron al invernáculo, con una temperatura diurna de 26°C y nocturna de 18°C y 14 h. de fotofase. Al día siguiente se marcaron las posiciones de la punta de la raíz (PR) y de los pelos radicales emergentes más pequeños (PEMP) trazando sendas líneas sobre la bolsa plástica con la ayuda de una lupa binocular

(Figura II.1). Cada raíz se inoculó con 0,5 ml de suspensiones bacterianas con las concentraciones que se indican. Además se incluyeron controles de plantas sin inocular. Las plantas y los controles se mantuvieron en el invernáculo en las condiciones antes descritas y se regaron periódicamente con agua destilada estéril hasta el momento de la observación de los resultados. A los 20 días desde la inoculación se realizaron mapas de la frecuencia de aparición de nódulos respecto de la ubicación de la marca PR realizada al momento de la inoculación en la raíz principal (Bhuvaneswari *et al.*, 1980).

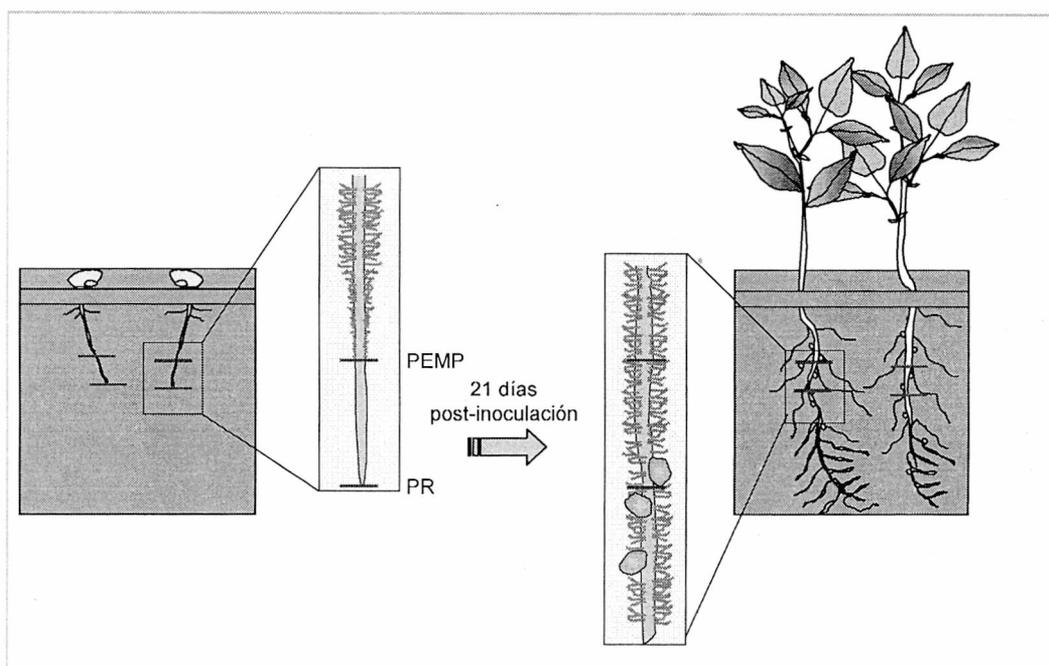


Figura II.1 Determinación de la infectividad en bolsas plásticas de crecimiento. Al momento de la inoculación se marca sobre la bolsa la región infectable comprendida entre los pelos emergentes más pequeños (PEMP) y la punta de la raíz (PR) (rayas rojas, izquierda). Luego de 21 días se mapea la posición de los nódulos en relación con dicha zona (derecha). Los nódulos observados allí provienen de infecciones iniciadas dentro de las seis horas inmediatas a la inoculación (el tiempo requerido para que los pelos radicales de esa zona maduren y se vuelvan no infectables). Los nódulos registrados por debajo de esa zona corresponden a

infecciones más tardías. Así, el recuento de las proporciones relativas de nódulos en cada zona permite cuantificar la infectividad.

Luego se graficó la distribución de cada uno de los nódulos sobre la raíz principal en unidades relativas de distancia respecto de la marca de PR de acuerdo con la siguiente relación:

$$D_U = D_L / UDR$$

donde D_U es la distancia (en UDR) del nódulo hasta PR, D_L es la distancia (en mm) del nódulo hasta PR y UDR es la longitud (en mm) entre las marcas de PR y PEMP.

Este último procedimiento permitió normalizar los resultados compensando las diferencias entre plantas con raíces de distinta longitud y distinta velocidad de crecimiento (para más detalles, véase Bhuvanewari *et al.*, 1980).

II.9.3 Ensayos de competición para la nodulación

Estos ensayos se realizaron con cepas llevando diferentes resistencias a antibióticos para permitir su identificación. Se trabajó con macetas plásticas de aproximadamente 300 cm³ conteniendo vermiculita estéril. Las macetas fueron esterilizadas mediante lavados con alcohol seguidos de una exposición de dos horas a la luz ultravioleta en una cámara cerrada, mientras que la vermiculita se esterilizó en autoclave, una hora a 121°C. Cada maceta con vermiculita estéril se regó con 700 ml de solución de Fåhraeus libre de bacterias o conteniendo entre 10⁴ a 10⁶ rizobios.ml⁻¹ de la mezcla de cepas que se deseaba ensayar. La siembra de soja se realizó inmediatamente. Se sembraron en

cada maceta tres plantines de soja germinados. Cada condición se ensayó por triplicado. Como controles siempre se incluyeron macetas sin inocular, y también macetas inoculadas con cada cepa en forma separada. Las macetas se llevaron al invernáculo y se mantuvo la humedad mediante riegos con agua destilada estéril hasta la determinación de los porcentajes de ocupación de los nódulos.

Los nódulos de cada tratamiento fueron extraídos y cada uno colocado separadamente en fosas de placas multipocillo estériles. Luego se los esterilizó superficialmente mediante el agregado de una solución de lavandina comercial al 20% v/v durante cinco minutos seguidos de al menos siete lavados con agua destilada estéril. Así, cada nódulo pudo ser procesado en su fosa y no se corrió el riesgo de que se produjeran contaminaciones cruzadas entre materiales provenientes de distintos nódulos cuando se liberó su contenido bacteriano. Los nódulos fueron macerados con palillos estériles, con los que luego se depositó el material recién extraído en cajas de Petri réplicas conteniendo antibióticos selectivos, lo que permitió identificar en el crecimiento posterior al material extraído de cada nódulo y al mismo tiempo, comprobar a qué cepa pertenecía.

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de la transformación angular de los porcentajes de ocupación (Lison, 1976).

II.9.4 Determinación de peso seco de plantas

Se tomaron plantas de soja de más de 30 días postinoculación y se procedió a cortar la parte aérea (tallo y hojas) de cada planta por separado. Luego se las dispuso a cada

una en una bolsa de papel madera y posteriormente se secaron a 60°C en estufa durante 4 días o hasta constancia de peso. Una vez secas, la parte aérea de cada una de las plantas fue pesada en una balanza analítica con una precisión de ± 1 mg. Los resultados se analizaron estadísticamente empleando un análisis de varianza.

Capítulo III

CANALIZACIÓN DIFERENCIAL
DEL CARBONO EN CULTIVOS DE *B.*
JAPONICUM LIMITADOS EN LA
FUENTE DE N

III.1 Introducción

Hace casi 60 años, Jacques Monod relacionó la tasa de crecimiento bacteriano con los niveles de nutrientes en los medios de cultivo (Monod, 1949). En este sentido, los cultivos bacterianos crecidos en condiciones limitantes, evidencian una respuesta adaptativa como resultado de cambios a nivel molecular (Koch, 1997; Button, 1998). Uno de estos nutrientes esenciales es el nitrógeno, elemento indispensable para la biosíntesis de gran cantidad de componentes celulares básicos, tales como proteínas y ácidos nucleicos entre otros. En particular, en nuestro laboratorio se observó que *B. japonicum* USDA 110 y una mutante derivada de ésta incapaz de agregar galactosa en su EPS, llamada $\Delta P22$, acumularon C al entrar en fase estacionaria. Esta acumulación de C, sin embargo, fue canalizada hacia EPS cuando los cultivos crecían limitados en la fuente de N, mientras que se acumuló como PHB en cultivos sin limitación de N. Estos ensayos se llevaron a cabo en medios de Götz líquidos y con manitol como única fuente de C, en los que se corroboró la limitación intracelular de N por la falta de represión de GS I, y la inducción de la actividad de GS II, en respuesta al aumento en la relación C/N intracelular (López García *et al.*, 2001).

Según datos bibliográficos, la composición del EPS puede variar de acuerdo con la fuente de C en que se cultiva *B. japonicum*, y particularmente se reportó que cuando crece en malato como única fuente de C sintetiza un EPS enteramente compuesto por galactosa (galactano) (Karr *et al.*, 2000). Por otro lado, mediante análisis bioquímicos se demostró que *B. japonicum* $\Delta P22$ carece de actividad UDP-glucosa-4-epimerasa, no presenta la vía de Leloir y produce un EPS sin galactosa (Parniske *et al.*, 1993; Becker *et*

al., 1998). Por ello, nuestro interés fue obtener una condición en la que $\Delta P22$ fuera incapaz de sintetizar EPS y así estudiar el metabolismo en estas condiciones y su relación con la simbiosis en plantas de soja. Se decidió entonces emplear malato como fuente de C, con la idea de que en esta condición $\Delta P22$ sería incapaz de sintetizar EPS por cuanto el mismo debería ser un galactano. El malato entra a las bacterias en forma diferente al manitol, a través de una proteína llamada DctA permeasa (Dct por *Dicarboxilate transport*). Esta elección también se debió a que junto con el ácido succínico, son las dos únicas fuentes de C conocidas hasta ahora para los bacteroides (Kahn y Yurgel, 2004).

III.2.1 Crecimiento de *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ en medios líquidos limitados en la fuente de N

Para caracterizar el crecimiento de *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ se utilizó el medio líquido definido de Götz *et al.* (1982) suplementado con malato 27 mM como única fuente de C y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 mM como única fuente de N (GN1). La condición limitada en N se obtuvo sin el agregado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (GN0) lo que deja una concentración de NH_4^+ menor que 40 μM , proveniente del cultivo iniciador (el límite máximo sería aquel en el que todo el NH_4^+ inicial permaneciera sin consumirse). Estas condiciones fueron previamente establecidas como no limitante y limitante en N, respectivamente (López García *et al.*, 2001). Aquí suponemos que las respuestas a la escasez de N observadas previamente con manitol como única fuente de C (López García *et al.*, 2001) también tienen lugar con malato.

Diariamente y durante un lapso de 8 días se estimó la biomasa total por medida de la DO_{500} y se contaron en placa las UFC como medida de las células viables. Estos ensayos fueron realizados en tres experimentos diferentes y mostraron resultados similares.

En la Figura III.1 se muestran las lecturas de DO_{500} y los recuentos de UFC de uno de estos experimentos. Allí se observa que el tiempo de duplicación de ambas cepas es de alrededor de 12 horas, en concordancia con lo observado por Karr *et al.* (2000), siendo casi la mitad del observado con manitol como única fuente de C (Karr *et al.*, 2000; López García *et al.*, 2001).

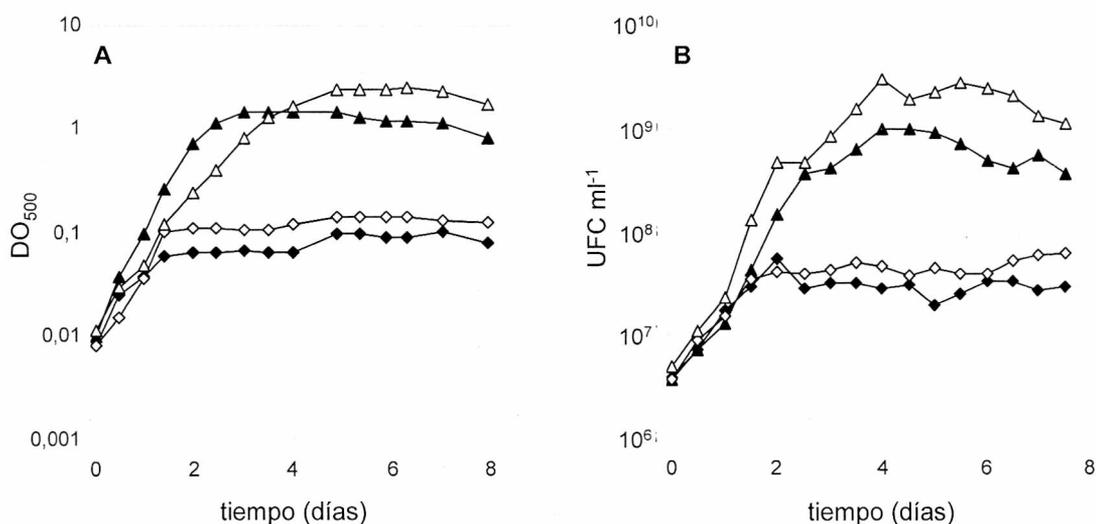


Figura III.1 Crecimiento de las cepas *B. japonicum* USDA 110 (símbolos llenos) y $\Delta P22$ (símbolos vacíos), en GN1 (triángulos) y GN 0 (rombos) respectivamente, durante 8 días a 28°C y a 180 rpm. **A.** Biomasa estimada por la DO_{500nm} . **B.** Estimación del número de células viables por recuento en placa de las UFC. ml^{-1} .

Nosotros también notamos diferencias entre el tipo salvaje y el mutante, siendo USDA 110 ligeramente más rápida que $\Delta P22$. Cuando las bacterias crecieron en medios limitados en la fuente de N, la tasa de crecimiento exponencial fue la misma pero la

fase estacionaria fue alcanzada más temprano. Llamativamente, la DO_{500} y los recuentos de UFC que se obtuvieron con la cepa $\Delta P22$ bajo condiciones de escasez de N (GN0) fueron, en los tres experimentos independientes, coherentemente más altos que los obtenidos con la cepa salvaje USDA 110. Una vez en fase estacionaria, la viabilidad celular se mantuvo.

III.2.2 Acumulación diferencial de biopolímeros de C intracelulares y extracelulares

Para estudiar los destinos del C con o sin escasez de la fuente de N utilizando malato como única fuente de C, tomamos puntos de referencia representativos de cultivos en fase exponencial (dos días de crecimiento) y en fase estacionaria (siete días de crecimiento). Debido a que en escasez de la fuente de N la fase estacionaria se alcanza antes, el estado fisiológico de las bacterias puede no ser el mismo para una edad determinada en todos estos medios (Figura III.1).

A estos cultivos se les extrajo el EPS y el PHB y se los cuantificó como se explica en la pág. 46 de Materiales y métodos. Se observó que las cantidades de EPS en la cepa mutante $\Delta P22$ fueron significativamente más bajas que en la cepa salvaje USDA 110 en cultivos con suficiencia de N, en concordancia con datos bibliográficos (López García, 2004; Parniske *et al.*, 1992). Sin embargo, en escasez de N, la producción de EPS fue similar en ambas cepas (figura III.2).

A

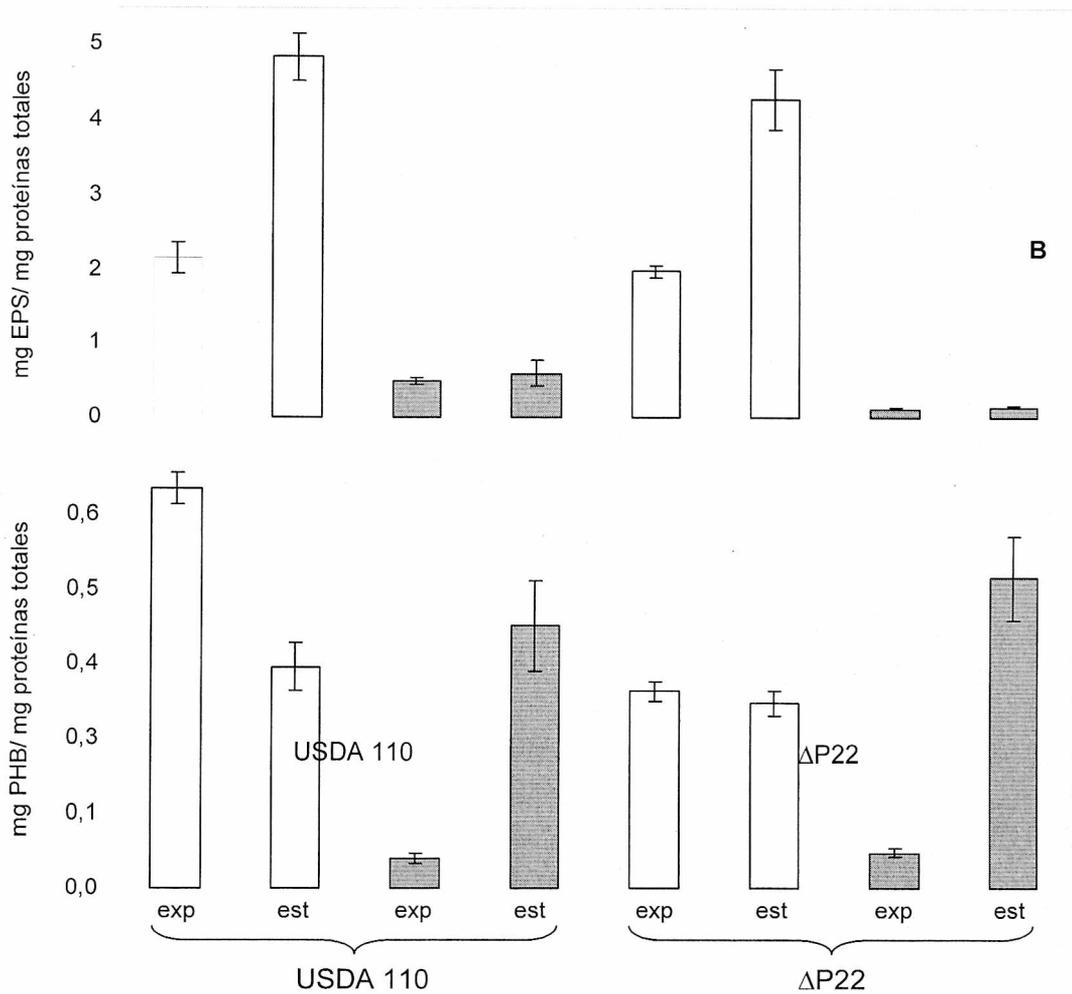


Figura III.2 Contenido de EPS (A) y PHB (B) relativos a proteínas totales de las cepas de *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ crecidas en Götzt con malato como única fuente de C. Los cultivos fueron crecidos en escasez (GN0, barras blancas) o suficiencia (GN1, barras grises) de la fuente de N hasta la fase exponencial (exp) o estacionaria (est)

Este resultado nos sorprendió debido a que esperábamos bajos niveles de EPS en la cepa mutante también en la condición de escasez de N.

Al contrario de ello, la acumulación de EPS con respecto a PHB siguió los patrones previamente descritos: en suficiencia de N el contenido de EPS fue similar en cultivos jóvenes y viejos, mientras que en cultivos crecidos en escasez de la fuente de N se acumuló una significativa cantidad de EPS en fase estacionaria en ambas cepas

(Figura III.2). Concomitantemente, se acumuló PHB en cultivos viejos en suficiencia de N en ambas cepas.

El hecho de que la cepa $\Delta P22$, a pesar de su mutación, aún haya canalizado el C hacia la síntesis de EPS (y a sus precursores) cuando los cultivos envejecieron limitados en N, sugiere que en estas condiciones no hubo suficiente acumulación de acetyl-CoA tal que sirva como precursor de la síntesis de PHB.

Esto puede haberse debido a la combinación de una alta carga energética y al uso del exceso de poder reductor que normalmente se canaliza hacia el PHB (Povolo y Casella, 2000) hacia la síntesis y acumulación de EPS.

III.3 Composición de los EPS de *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ en relación con la fuente de carbono y la disponibilidad de nitrógeno

En la cepa mutante aumentó la cantidad de EPS cuando se la cultivó en escasez de la fuente de N, aún con malato como única fuente de C, donde se suponía que no debería producirse EPS alguno (Figura III.2). En efecto, Karr *et al.* (2000), reportaron que *B. japonicum* 2143 produce un galactano como EPS cuando crece con malato como única fuente de C.

Para resolver esta contradicción, determinamos la composición de los EPS de *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$. Para ello, se extrajeron y purificaron los EPS de cada cepa, crecidas en manitol o malato como únicas fuentes de C y en escasez o suficiencia de la fuente de N, para posteriormente analizarlos por HPAEC.

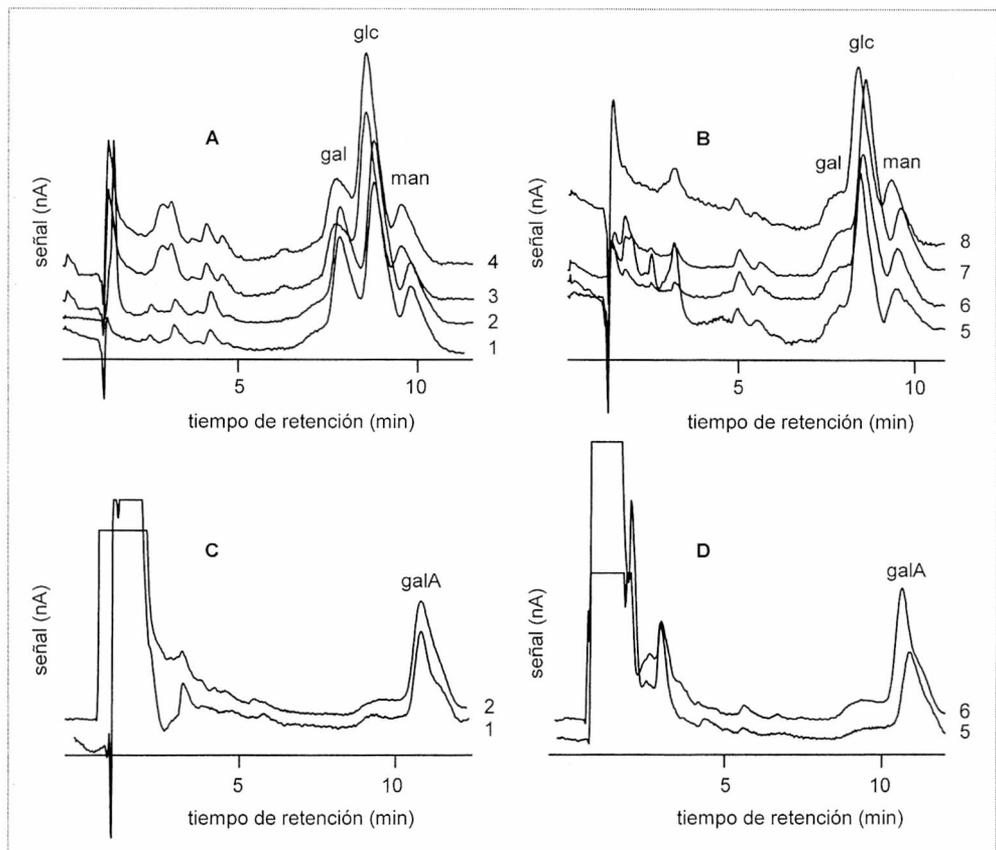


Figura III.3 Cromatogramas de azúcares neutros (A y B) y ácidos (C y D) de EPS hidrolizados de *B. japonicum* USDA 110 (A y C) y $\Delta P22$ (B y D) cultivados con malato (líneas 1, 2, 5 y 6) o manitol (líneas 3, 4, 7 y 8) como única fuente de C. Las hexosas correspondientes a cada pico se indican encima del mismo. Por cuestiones de claridad, en los paneles C y D se muestran sólo los azúcares con malato como única fuente de C. nA: intensidad de señal.

gal: galactosa, glc: glucosa, man: manosa, galA: ácido galacturónico.

Nosotros encontramos que, a diferencia de la cepa de *B. japonicum* 2143 (Karr *et al.*, 2000), USDA110 y $\Delta P22$ no cambiaron la composición de EPS con malato o manitol como únicas fuentes de C, ni con los niveles de N (Figura III.3), lo cual sugiere que la diferente composición del EPS en relación con la fuente de C no es una respuesta general en *B. japonicum*. En este sentido, es de destacar que USDA 110 tampoco produce NPS cuando se diferencia a bacteroide una vez dentro de la planta

hospedante (Streeter *et al.*, 1992). Serían necesarios más estudios para entender las razones por las cuales algunas cepas de *B. japonicum* cambian la composición de su EPS mientras que otras no lo hacen. Estas cuestiones no son triviales, ya que a menudo cambios en su composición resultan en procesos simbióticos con diferente grado de eficiencia.

A diferencia de la unidad repetitiva de EPS descrita con anterioridad por Mort y Bauer (1982), nuestros análisis revelaron que la cantidad de manosa es menor, siendo la proporción observada 6 Glc: 3 Gal: 3 GalA: 1 Man. Esta composición es consistente con la unidad repetitiva propuesta por Mort y Bauer (1982) si uno plantea que cada tres unidades repetitivas, la manosa está presente en una sola, mientras que en las otras dos, no. Alternativamente, esta discrepancia se podría explicar con la existencia de dos tipos de EPS, uno que carezca de manosa y otro como el descrito por Mort y Bauer (1982), en una relación molar de 1:2. Sea como fuese, nuestros estudios con una tecnología más sensible condujeron a una reconsideración de la composición del EPS en *B. japonicum* y demostraron que son necesarios estudios más detallados sobre su estructura. Por otro lado, y como era de esperar, el EPS de la cepa $\Delta P22$ careció de galactosa (Gal) (Parniske *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1998) pero tuvo niveles normales de ácido galacturónico (Figura III.3). Este resultado sugiere que el ácido galacturónico no se incorpora a través de la oxidación de UDP-galactosa sino que tal vez provenga de la oxidación de UDP-glucosa y su posterior epimerización en UDP-ácido galacturónico (Figura III.4). En este sentido, en el genoma completo de *B. japonicum* USDA 110 se predicen cuatro marcos de lectura abiertos que codificarían para dos UDP-Glc-deshidrogenasas y dos UDP-GlcA-epimerasas (designados en la RhizoBase como

blr2383 y *bll8129*, y *blr2382* y *bll5920* respectivamente) si bien la función de ellos no está caracterizada todavía (Kaneko *et al.*, 2002). Dichas enzimas, si son activas, podrían explicar la presencia de residuos galA en el EPS de la cepa $\Delta P22$ (Kereszt *et al.*, 1998; Laus *et al.*, 2004).

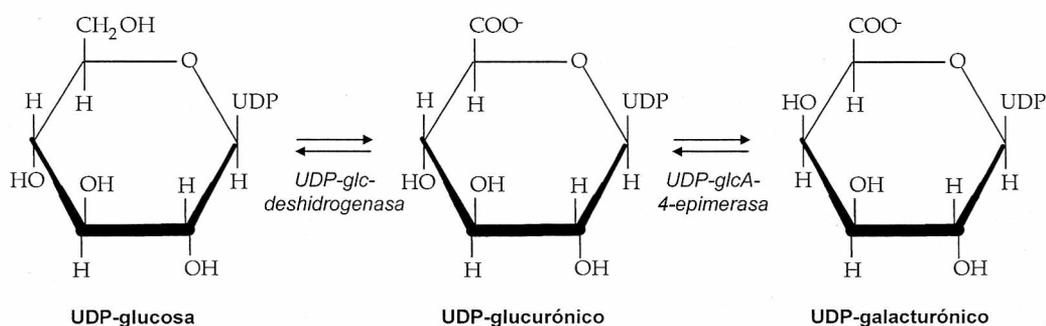


Figura III.4 Posible vía de síntesis del ácido UDP-galacturónico a partir de UDP-glucosa en *B. japonicum* USDA 110.

III.4 Análisis simbióticos

Los efectos observados en relación con el aumento significativo de los niveles de EPS tanto en la cepa salvaje como en la mutante cuando las bacterias son cultivadas en escasez de la fuente de N podrían llegar a tener impacto sobre la infección y posterior ocupación de los nódulos en plantas de soja (López García *et al.*, 2001). Por otra parte, la cepa mutante $\Delta P22$ produce respuestas de defensa en raíces de soja, como liberación de fitoalexinas (gliceolina) en los exudados radicales y posteriormente actividad quitinasa en nódulos (Parniske *et al.*, 1994). En sus ensayos, estos autores cultivaron a $\Delta P22$ en medios ricos y así, las cantidades de EPS sintetizados en relación con la cepa salvaje son significativamente menores (Parniske *et al.*, 1998). En paralelo, se demostró que el EPS de $\Delta P22$ no une lectina de soja, una proteína vegetal que podría estar

implicada en procesos simbióticos tempranos (van Rhijn *et al.*, 1998; Lodeiro *et al.*, 2000). Así, y de acuerdo a lo observado en este capítulo, podríamos esperar que, cuando plántulas de soja se inoculen con $\Delta P22$ previamente crecidas en escasez de la fuente de N ocurran dos situaciones totalmente diferentes, a saber: 1-las altas cantidades de EPS defectuoso incitarían respuestas de defensa de las plantas y esto se vería reflejado en una disminución de la nodulación, o 2-el EPS defectuoso no actuaría *per se* incitando dichas respuestas, y entonces mayores niveles de estos polisacáridos derivarían en una mayor infectividad, independientemente de la incapacidad de unir lectina de soja.

Para intentar aproximarnos a una respuesta, realizamos ensayos de infectividad en plantas de soja en bolsas plásticas de crecimiento (Bhuvanewari *et al.*, 1980).

III.4.1 Infectividad de las cepas de *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ en relación con la disponibilidad de N

Dado que la infectividad se satura con concentraciones bacterianas superiores a 10^6 UFC.ml⁻¹ (Halverson y Stacey, 1986), decidimos iniciar nuestros estudios con concentraciones del orden de 10^3 - 10^4 UFC.ml⁻¹ para así poder detectar posibles diferencias.

Ensayos previos en nuestro laboratorio, demostraron que las plantas inoculadas con la cepa salvaje USDA 110 mostraron alrededor de tres nódulos por planta en raíces primarias al momento de su cosecha (22 días post-inoculación), con un porcentaje de plantas noduladas de 50% (para inóculos de 10^3 UFC.ml⁻¹) y 88% (para inóculos de 10^4

UFC.ml⁻¹) mientras que en las raíces de las plantas inoculadas con la cepa mutante $\Delta P22$ el porcentaje de plantas noduladas fue, para ambas concentraciones, menor a 20% (López García, 2004).

Con estos resultados previos realizados con cultivos bacterianos crecidos en manitol como única fuente de C, y para obtener un perfil de nodulación similar entre ambas cepas, decidimos realizar los estudios de infectividad de *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ utilizando cultivos crecidos durante dos días en Götz-malato (fase exponencial) en escasez de la fuente de N (GN0) o suficiencia de la misma (GN1) inoculando sobre plántulas de soja cv Don Mario 4800 (*Glycine max*) 1.10⁵ UFC planta⁻¹ en el caso de USDA 110 y 1.10⁷ UFC planta⁻¹ en el caso de $\Delta P22$.

Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura III.5, el número de plantas ensayadas fue de 42 para cada condición y se repitieron en dos experimentos independientes dando resultados similares.

Como puede observarse, tanto la cepa USDA 110 como $\Delta P22$ fueron más infectivas cuando se cultivaron en escasez de la fuente de N. Estos datos corroboran observaciones previamente realizadas por López García (2004) con la mismas cepas USDA 110, una cepa derivada llamada *B. japonicum* 3001 y $\Delta P22$ crecidas en manitol como única fuente de C, con lo cual podemos inferir que es una respuesta general en relación a la disponibilidad de N. Por otro lado, no podemos hacer inferencias con respecto a la infectividad en escasez de N entre la cepa salvaje y la mutante debido a que ésta se inoculó con una concentración 100 veces mayor que la salvaje.

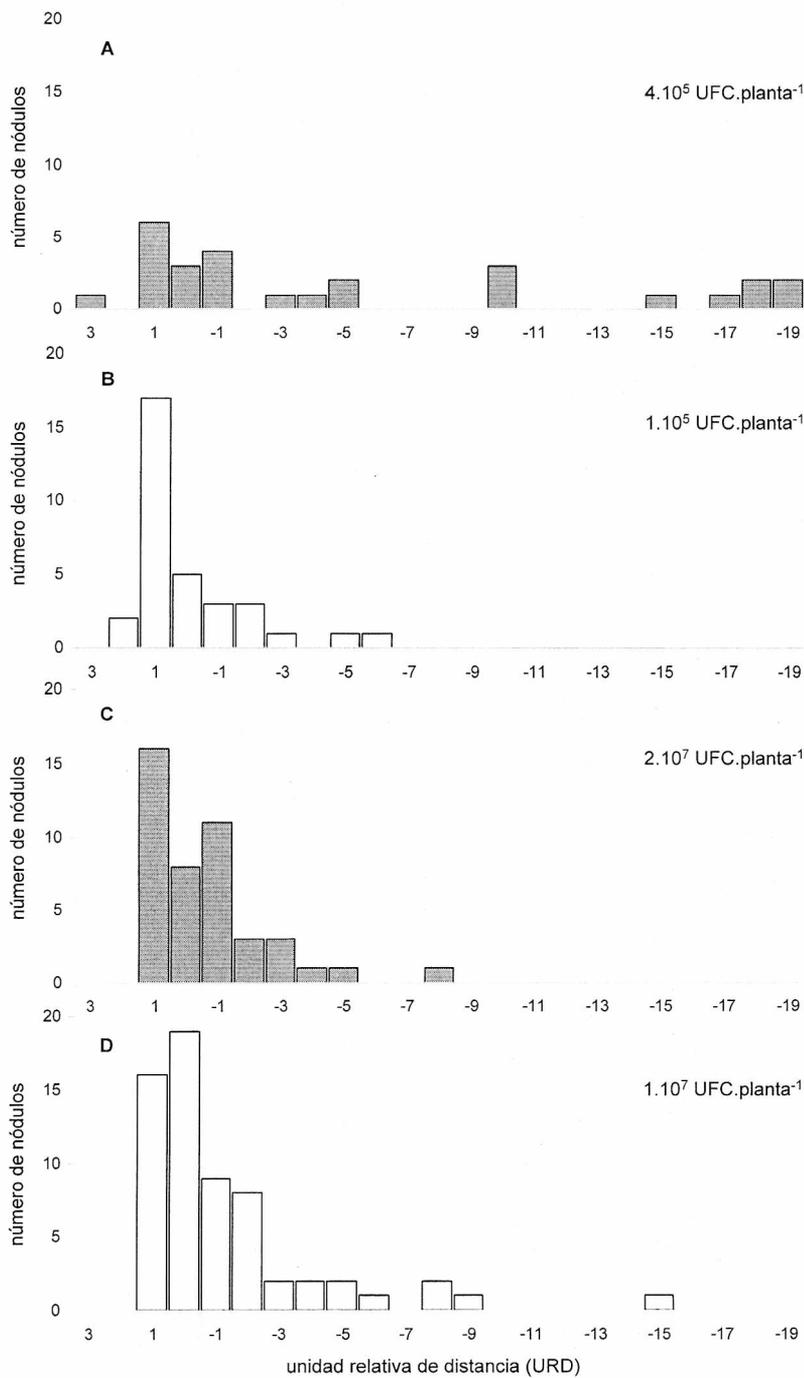


Figura III.5 Infectividad de USDA 110 (A y B) y $\Delta P22$ (C y D) en fase exponencial cultivadas en GN 0 (B y D, barras blancas) o GN 1 (A y C, barras grises). La distribución de los nódulos a lo largo de la raíz principal fue medida en relación a la posición de la punta de la raíz al momento de inocular, que es el valor 0. Los valores negativos representan regiones de la raíz inexistentes al momento de la inoculación. En suma, la infectividad de la cepa $\Delta P22$ no sólo no disminuyó en cultivos en escasez de la fuente de N en relación con los de suficiencia de la misma, sino que también se

vio reflejada en una mayor cantidad de nódulos en raíces principales y en un mayor número de nódulos por encima de la punta de la raíz, como puede observarse en la Tabla III.1.

Así, independientemente del tamaño del inóculo, las mayores cantidades de EPS producidos por la cepa $\Delta P22$ en escasez de la fuente de N, tienen un efecto similar al de la cepa salvaje sobre la infectividad a raíces de soja, pese a la ausencia de galactosa y a su incapacidad de unir lectina. Esta mayor infectividad no puede estar relacionada con la acción de la lectina de soja (Lodeiro *et al.*, 2000; López García *et al.*, 2001) sino que podría deberse a otros factores, como por ejemplo una mayor expresión de los genes *nod* en el medio con escasez de la fuente de N (López García *et al.*, 2001).

Tabla III.1 Infectividad de $\Delta P22$ sobre raíces de soja

fuelle de N	número de nódulos en raíces primarias por planta \pm DEM	número de nódulos por encima de PR por planta \pm DEM
GN 0	2,03 \pm 0,34	1,20 \pm 0,28
GN 1	1,43 \pm 0,28	0,80 \pm 0,14

DEM: desvio estándar de la media

Resumen

La cepa mutante $\Delta P22$ es capaz de producir más biomasa que la cepa salvaje en condiciones de escasez de la fuente de N. Esto no puede ser explicado por una escasa producción de EPS que derive C y energía a la síntesis de otras moléculas debido a que las cantidades de EPS producidas en GN0 por la cepa mutante son similares a las producidas por la cepa salvaje.

Fué confirmada la canalización diferencial del exceso de C hacia EPS o PHB en malato como única fuente de C en relación con la escasez de N. Los rizobios cultivados en escasez de N tienen una alta relación EPS/PHB en fase estacionaria mientras que aquellos cultivados en suficiencia de N tienen una baja relación EPS/PHB.

Las unidades repetitivas de los EPS de *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ tienen menos cantidad de manosa en relación con las demás hexosas que lo componen. La proporción encontrada fué: 6 Glc : 3 GalA : 3 Gal :1 Man. Esta composición es consistente con la previamente descrita por Mort y Bauer (1982) si uno supone que cada 3 unidades repetitivas, sólo una contiene manosa. Alternativamente, podrían coexistir dos tipos de EPS, uno que no contenga manosa y otro como el descrito por Mort y Bauer (1982) en una relación 2 : 1.

La composición de los EPS en *B. japonicum* USDA 110 y $\Delta P22$ no cambia con la fuente de C ni con los niveles de N en que son cultivadas las bacterias. Esto indica que las variaciones de la composición en respuesta al ambiente previamente observados por Streeter (1995) y Karr *et al.* (2000) no se podrían aplicar a la especie de manera general sino a variedades y/o serogrupos dentro de la misma.

Tanto la cepa salvaje como la mutante fueron más infectivas en raíces de soja cuando los inóculos crecieron en escasez de la fuente de N, independientemente de la composición de los polisacáridos extracelulares. Dicha infectividad fue comparable solamente cuando la cepa mutante $\Delta P22$ se inoculó con una concentración de 100 a 1.000 veces superior a la de la cepa salvaje.

Del análisis de estos resultados surgen tres preguntas de importancia:

- 1) ¿La canalización diferencial del exceso de C hacia EPS o PHB está relacionada con algún regulador global?
- 2) ¿La biosíntesis del ácido UDP-galacturónico y su incorporación al EPS ocurre según la ruta predicha en la Figura III.5?
- 3) Dado que la mutación en $\Delta P22$ abarca tres genes, ¿Puede decirse que los fenotipos observados se deben solamente a la mutación del gen *exoB*?

En los próximos capítulos se encararán estas preguntas con el fin de comprender mejor el rol de los EPS y el PHB en la simbiosis *B. japonicum*-soja.

Capítulo IV

CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DE MUTANTES DE *B. JAPONICUM* EN EL GEN *blr* 0227

IV.1 Introducción

El metabolismo del PHB está relacionado con el estado redox de la célula. En *Azotobacter spp.* y *Rhizobium ORS271*, su síntesis se ve aumentada bajo condiciones microaeróbicas (Stockdale *et al.*, 1968; Senior *et al.* 1972; Stam *et al.*, 1986), lo que también ocurre dentro de los nódulos, donde el potencial redox de las células decrece dada la limitación del O₂ impuesta por la leghemoglobina. Como resultado de estas carencias de O₂ se incrementan los niveles citoplasmáticos de NADPH. En *Azotobacter beijerinckii* esto lleva a la inhibición de algunas enzimas del ciclo de Krebs como la NADP-isocitrato deshidrogenasa y la citrato sintasa, por lo cual dicho ciclo se ve enlentecido y el acetyl-CoA forzado a entrar en la síntesis de PHB (Senior *et al.* 1972; Jackson y Dawes, 1976). Así, un aumento en la síntesis de PHB podría actuar como una vía de escape para oxidar NADPH regulando de esta manera también la velocidad del ciclo de Krebs. Esta regulación estaría dada en principio por una multiplicidad de factores, entre los cuales podríamos mencionar la relación acetylCoA/CoA, el estado redox del pool de nucleótidos pirimidínicos y la reducida velocidad del ciclo de Krebs bajo condiciones microaeróbicas (Karr *et al.*, 1984).

En vida libre, el PHB tiene roles protectores contra diferentes estreses, tales como irradiación UV, shocks térmico y osmótico y exposición ante agentes oxidantes (Kadouri *et al.*, 2003). Además, parece ser de vital importancia desde el punto de vista ecológico debido a que gracias a esta reserva, las bacterias en el suelo podrían sobrellevar con éxito períodos de escasez de nutrientes y por otro lado, un rápido catabolismo de este biopolímero en la rizósfera podría estar relacionado con una

rápida colonización de la misma, facilitando de esta manera la entrada de los rizobios a través del hilo de infección (Denison y Kiers, 2004).

Dada la importancia del metabolismo del PHB en los rizobios, y en especial conociendo que *B. japonicum* USDA 110 y Δ P22 acumulan PHB en fase estacionaria, se quiso investigar qué factores podrían estar regulando el flujo de C entre el EPS y el PHB, dado que parecen estar ligados porque su acumulación responde de forma coordinada a la abundancia o escasez de N.

En este sentido, se reportaron sendos mutantes en un gen regulador del flujo de carbono intracelular (llamado *aniA* por anaerobically induced gene A) que veía aumentada la síntesis de EPS en detrimento de la de PHB (Povolo y Casella, 1996; Encarnación *et al.*, 2002). Esta desviación de carbono en estos rizobios mutantes nos recordó la observada por nosotros en cultivos limitados en la fuente de N y que consideramos de relevancia a la hora de estudiar el flujo de C hacia PHB o EPS. ¿Es *aniA* un regulador general del flujo de C en *B. japonicum*? ¿Puede *aniA* estar involucrado en la desviación de C hacia la síntesis de EPS?

IV.2 Análisis bioinformáticos

Los genes *phbA* y *phbB*, codificantes de las enzimas β -ceto-tiolasa y acetoacetyl-CoA-reductasa respectivamente, se encuentran duplicados en el genoma de *B. japonicum* y su similitud aminoacídica es del 72% entre los dos *phbA* y 75% entre los *phbB*. Estos genes a su vez, poseen alta similitud de secuencias aminoacídicas y nucleotídicas con los genes *phbA* y *phbB* de muchos rizobios. Sin embargo, en uno de los clusters existe

un gen contiguo (*blr0227*) que tiene el mismo arreglo de genes vecinos con respecto a los genes posiblemente homólogos de *Rhizobium etli* y *Sinorhizobium meliloti*. Dicho gen muestra un 54,5% y 54,7% de identidad y 66,8% y 66,7% de similitud con los genes *aniA* de *R. etli* (*RHE_CH04019*) y de *S. meliloti* (*SMc03880*) respectivamente. En la Figura IV.1 se muestra el arreglo de genes al que hacemos referencia en estas tres especies de rizobios y en especies relacionadas.

Particularmente en *R. etli*, la cepa *aniA*⁻ sintetiza alrededor de un 40% menos PHB que la cepa salvaje y aumenta drásticamente los niveles de EPS (Encarnación *et al.*, 2002).

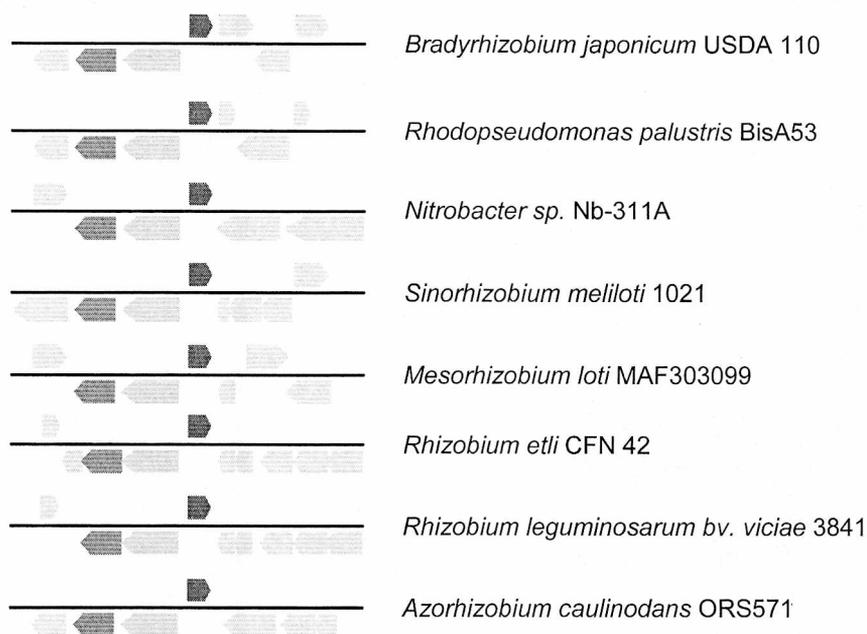


Figura IV.1 Comparación de la región genómica del ADN cromosomal de *B. japonicum* USDA 110 y bacterias relacionadas filogenéticamente, entre las cuales se encuentran *S. meliloti* 1021 y *R. etli* CFN42. Se puede observar que en las tres especies el gen *aniA* (flechas rojas) se encuentra río arriba y en dirección opuesta al cluster formado por los genes *phbA* y *phbB* (flechas celestes y verdes, respectivamente).

Además de este fenotipo, los autores no detectaron la proteína acetoacetyl-CoA-reductasa (codificada por *phbB*) por análisis proteómicos en la cepa *aniA*⁻ y concomitantemente el poder reductor total se veía disminuído en fase estacionaria en un 50% en cultivos con piruvato y 75% en cultivos con glucosa como únicas fuentes de C.

IV.3 Regulación de la síntesis de PHB

En la mayoría de las proteobacterias en que se encuentra la proteína AniA (también denominada PhaR, por las siglas en inglés *Polihidroxyalcanoate Repressor*) también se encuentra un dominio de unión a ADN cuya secuencia se halla muy conservada. En la Figura IV.2 se muestra un alineamiento de secuencias de aminoácidos de AniA entre diferentes especies de rizobios y no-rizobios. En todas existe una similitud por encima del 50% y en particular los aminoácidos 79 al 100 (marcados en rojo en la figura IV.2) parecen representar un dominio potencial de unión a ADN. Si bien la unión AniA-ADN está muy bien caracterizada a través de estudios de hidrólisis de ADN tratado con ADN-asas (*DNaseI footprinting*) en *Ralstonia eutropha*, todavía no ha sido probada en rizobios. Hasta hoy se conocen por lo menos dos genes que estarían regulados por AniA, a saber, *phaP* y el propio *aniA*. AniA se une río arriba de *phaP* en dos sitios, el codón de inicio de la transcripción e inmediatamente antes del promotor σ^{70} , reconociendo en *R. eutropha* H16 la secuencia de nucleótidos **GCAMMAMWTMMD** (Pötter *et al.*, 2002). Por otro lado, PhaR también se une 86 bases río arriba del codón de transcripción de *phaR*, donde se encontró un promotor dependiente de σ^{54}

(Steinbüchel *et al.*, 2005). Buscando estas secuencias de bases conservadas en el genoma de *B. japonicum* hemos observado que también se encuentran río arriba de los genes *aniA*, y de proteínas posiblemente homólogas a *phaP1* y *phaP2*.



Figura IV.2 Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas de la proteína AnA de diferentes rizobios y géneros emparentados realizado con el programa CLUSTALW 2.0. Debajo de las secuencias apiladas se observan asteriscos (aminoácidos idénticos), dos puntos (aminoácidos muy similares) un punto (aminoácidos algo similares). En letras rojas se marca un dominio conservado de unión a ADN presente en todas las secuencias en estudio.

Estos tres genes no se encuentran caracterizados en *B. japonicum*. Los genes *phaP1* y *phaP2* tienen alta similitud de secuencia con sendos genes reportados para *S. meliloti* (Wang *et al.*, 2007). Además, y en estrecha relación con nuestro trabajo, existe en *B. japonicum* una secuencia río arriba de uno de los genes *phbB* que se encuentra muy cercano a *aniA* (ver Figura IV.1) que, al igual que en *R. etli*, pero no en *S. meliloti*, muestra nucleótidos conservados que indicarían posibles sitios de unión de AniA.

De esta manera, uno de los genes implicados en la síntesis de PHB (*phbB*) podría estar regulado positivamente por AniA en *B. japonicum* como lo hace en *R. etli* (Encarnación *et al.*, 2002) o *Azotobacter vinelandii* (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Con todo ello, decidimos realizar mutantes de *aniA* en *B. japonicum* para estudiar la conexión entre la síntesis de PHB y EPS, la relación con la disponibilidad de N y su vinculación con la simbiosis en soja.

IV.4 Construcción de mutantes de *B. japonicum* en el gen *blr0227*, un posible regulador del flujo de carbono intracelular

Se decidió realizar mutantes de *B. japonicum* LP 3004 (resistente natural a Sm derivada de USDA 110) y $\Delta P22$, ya que esta última sintetizaba escasas cantidades de EPS en GN1. Esta mutagénesis fue dirigida a insertar un vector suicida llevando una porción homóloga al gen blanco, que se integrara en el cromosoma y que se ubicara en el medio de la región codificante del gen en cuestión. Esta inserción se diagramó de tal forma que se interrumpieran los dos dominios proteicos putativos de AniA, entre los cuales se halla el dominio de unión a ADN. Para ello, se utilizó la estrategia de simple

recombinación homóloga que se esquematiza en la Figura IV.4b. Para obtener el plásmido suicida, se amplificó un fragmento interno del gen *blr0227* por PCR con cebadores específicos utilizando ADN total obtenido de *B japonicum* LP 3004 (Figura IV.4a, gel a) y posteriormente se lo clonó en pGemT-Easy siguiendo las instrucciones del fabricante. La construcción, llamada pIQ01, se corroboró utilizando una mezcla de cebadores específicos del vector y del inserto (Figura IV.4a, gel b). Luego, se liberó el inserto por digestión con *EcoRI* y se introdujo en el plásmido pG18mob2 (Figura IV.4a, gel c) suicida en rizobios, creando el plásmido pIQ02. Finalmente, el plásmido pIQ02 se chequeó por PCR (Figura IV.4a, gel d) y por secuenciación.

Dicha construcción se introdujo en *Escherichia coli* S17-1 y se movilizó por conjugación biparental a *B. japonicum* LP 3004 y Δ P22 (Figura IV.4b). Los transconjugantes resistentes a Gm fueron seleccionados y posteriormente se corroboraron por PCR con cebadores específicos de una porción del vector y de porciones río arriba y río abajo del gen *blr0227* (Figura IV.4b, gel a).

Una vez obtenidos y chequeados los mutantes, se realizó una PCR con cebadores BoxAR-1 para obtener la huella digital de ADN (fingerprint) y así corroborar que los transconjugantes seleccionados no provinieran de una posible contaminación, no encontrándose diferencias en el bandeo entre las cepas salvajes y mutantes (no mostrados).

Se eligieron dos mutantes independientes, a los que se llamó LP 3020 (derivado de USDA LP 3004) y LP 3021 (derivado de Δ P22).

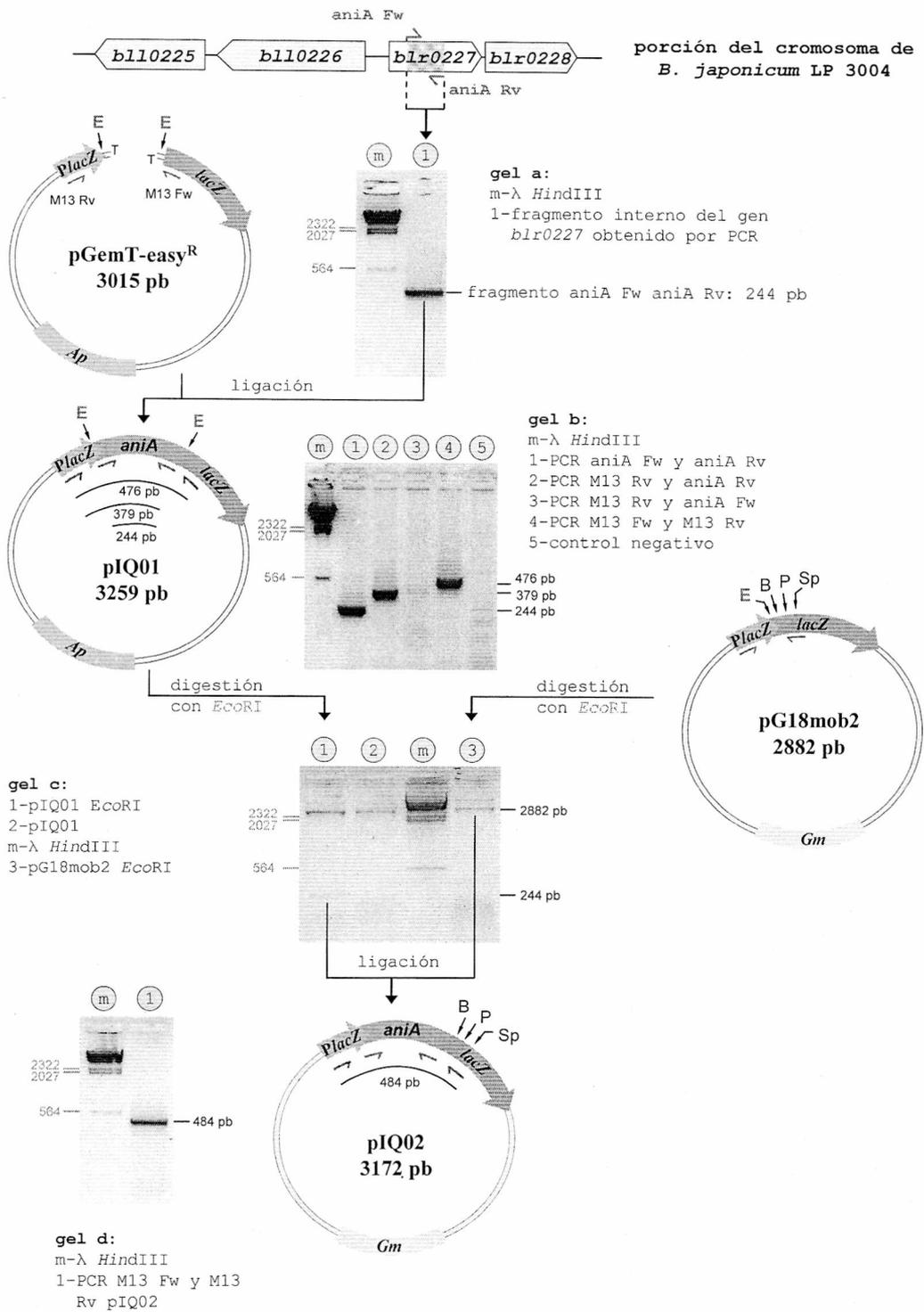


Figura IV.4a Esquema que muestra la estrategia de mutagénesis utilizada para la obtención de mutantes de *B. japonicum* LP 3020. La misma estrategia se utilizó para obtener los mutantes de *B. japonicum* LP 3021.

A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *Hind*III y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

Enzimas de restricción: B: *Bam*HI, E: *Eco*RI, P: *Pst*I, Sp: *Sph*I

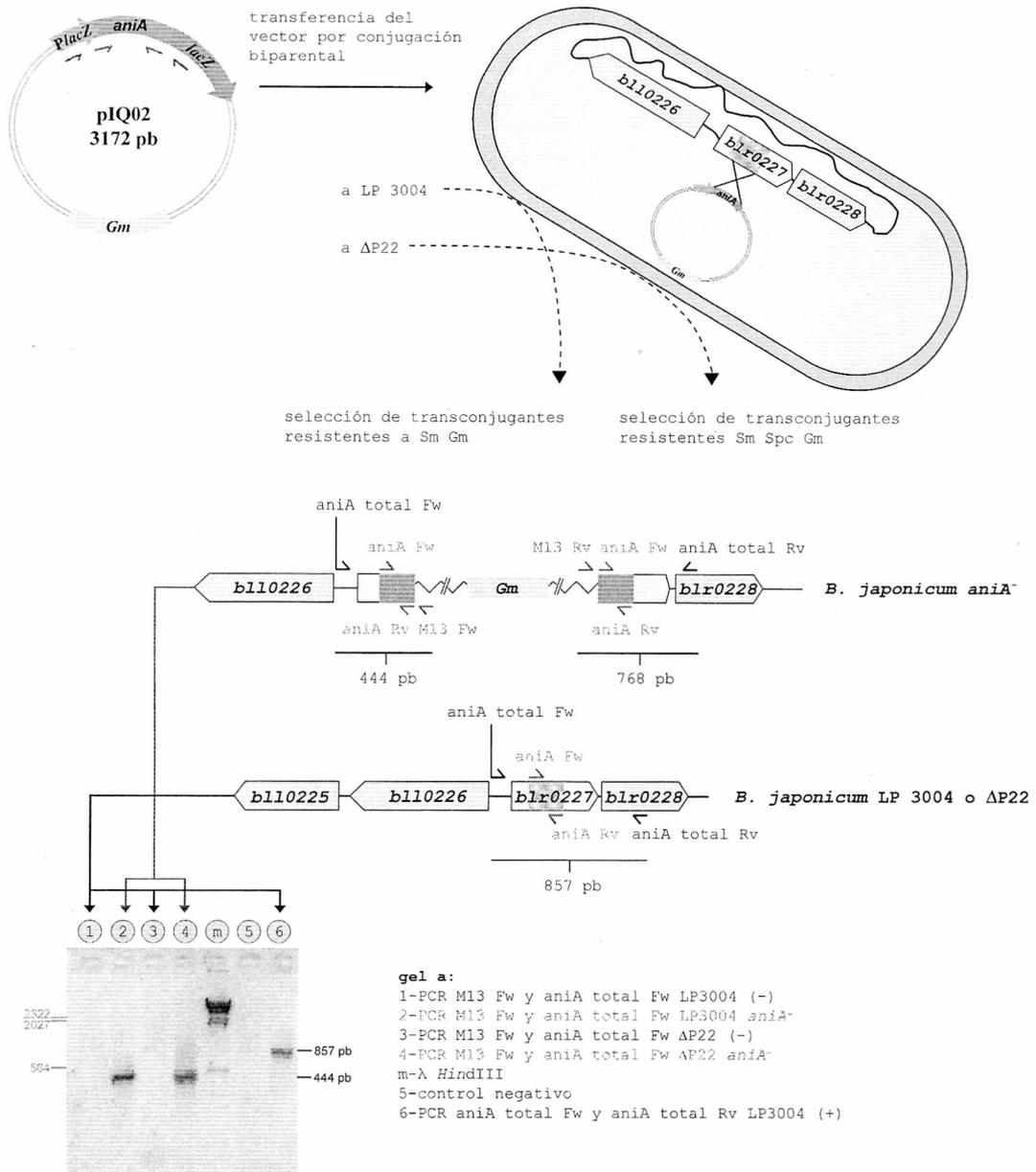


Figura IV.4b Esquema que muestra la transferencia del vector construido pIQ02 a las cepas de *B. japonicum* LP 3004 y ΔP22 y los chequeos correspondientes por PCR. A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *Hind*III y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

Por otro lado, se amplificó por PCR con la enzima Pfx un fragmento de 1245 pares de bases con los cebadores aniAPR Fw y aniAT Rv (Figura IV.5a) que contenía el gen *blr0227* entero con su posible promotor (inferido por el programa Promoter Finder). Este fragmento con extremos romos se clonó con *SmaI* en el vector pBBR1MCS5, dando el plásmido pIQ03 y luego se subclonó en el plásmido pCB303 replicativo en rizobios (Schneider y Beck, 1987) digiriendo con *PstI* y *XbaI*.

Esta última construcción, llamada pIQ04, se introdujo posteriormente en las cepas mutantes LP 3020 y LP 3021 (figura IV.5b) por conjugación triparental, para complementar el fenotipo observado en las cepas mutantes. Una vez realizada la transferencia del vector, se extrajo de *B. japonicum* y se corroboró por PCR (Figura IV.5b) y por secuenciación. En paralelo, repiques en cajas con los antibióticos apropiados y X-gal, tornaron las colonias azules, indicando que el gen se ubicó en la posición correcta como lo muestra la figura IV.5b. Los mutantes que llevaron el plásmido sin inserto no mostraron el color azul característico.

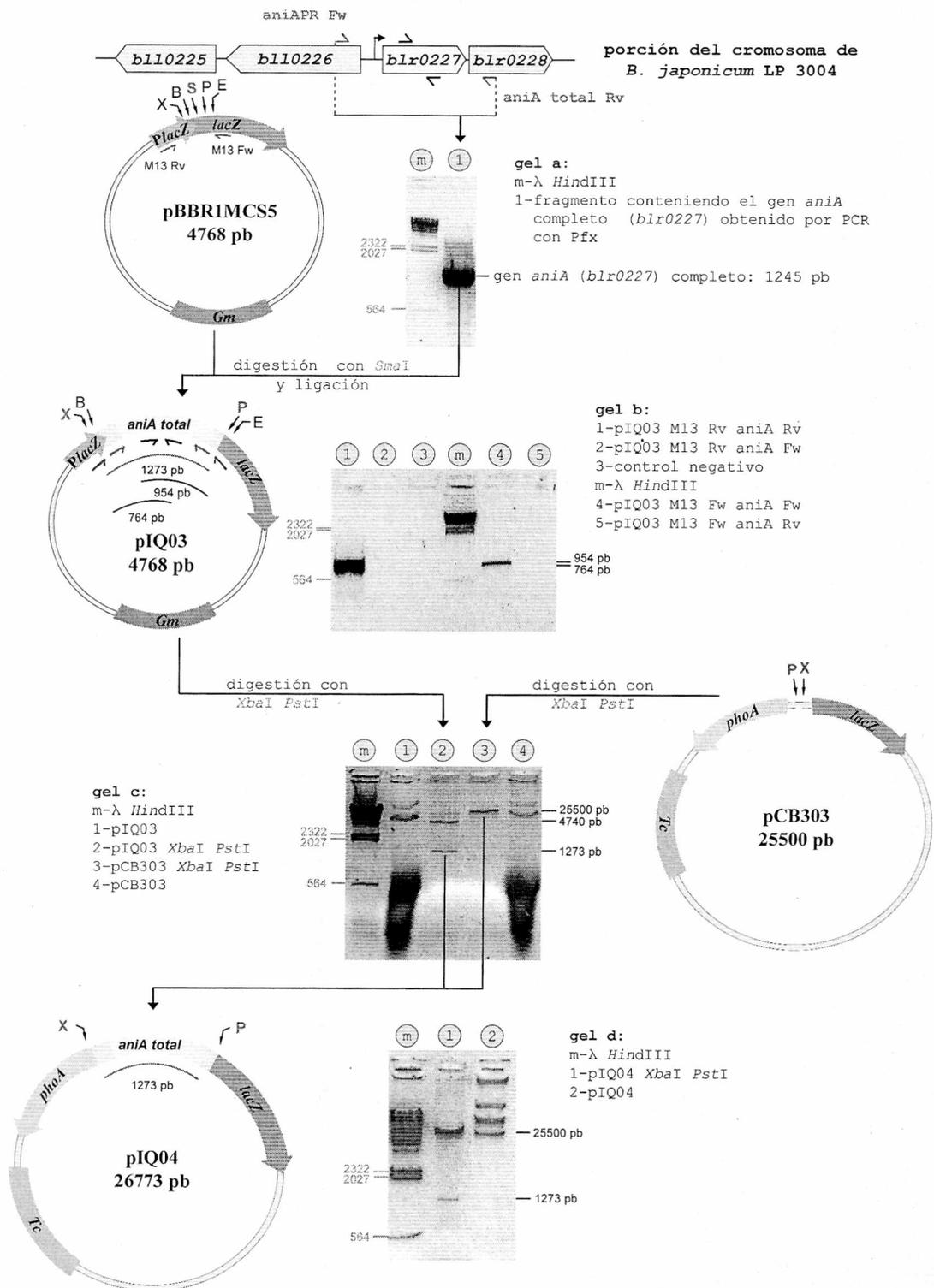


Figura IV.5a Esquema que muestra la estrategia de complementación utilizada para revertir el fenotipo de los mutantes de *B. japonicum* LP 3020. La misma estrategia se utilizó para mutantes de *B. japonicum* LP 3021. El plásmido pCB303 fue gentilmente cedido por Peter Müller.

A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *HindIII* y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

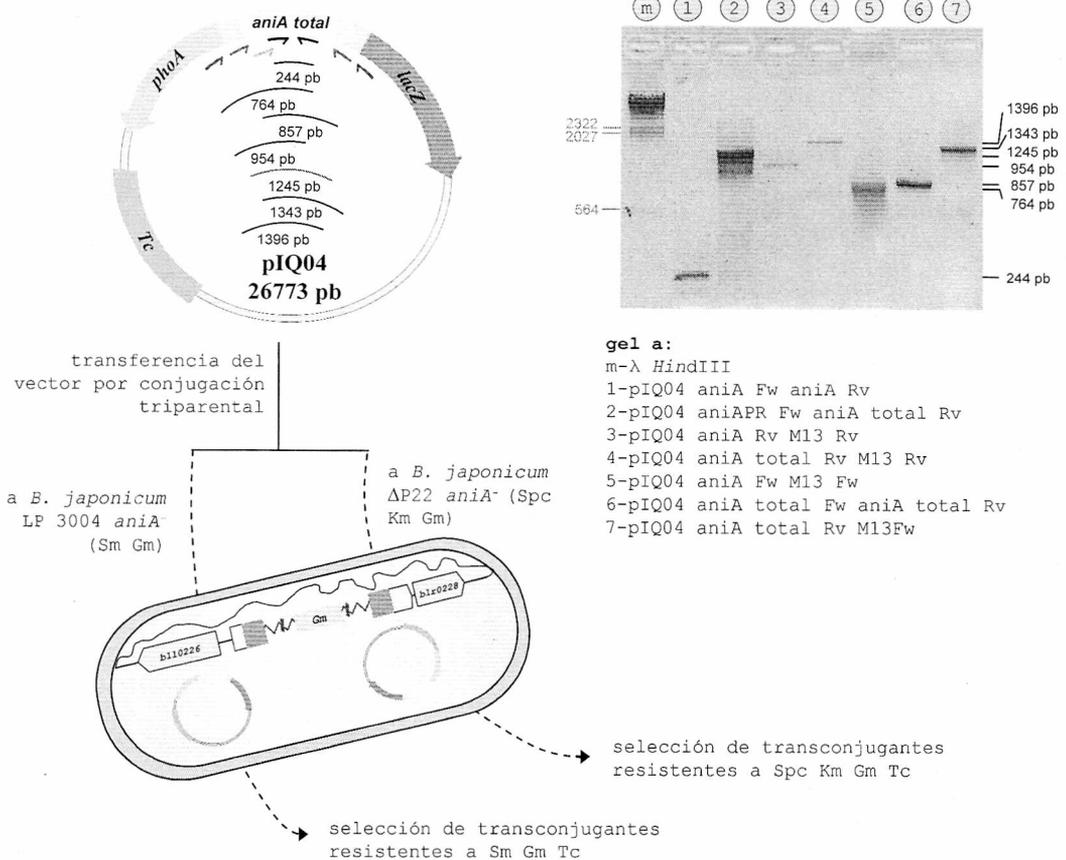


Figura IV.5b Esquema que muestra la introducción del plásmido pIQ04 llevando el gen *blr0227* completo en las cepas mutantes LP 3020 y LP 3021. El gel a muestra el chequeo de la correcta inserción del gen *blr0227* completo en el plásmido (extraído de los mutantes de *B. japonicum* complementados).

A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *Hind*III y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

IV.5 Crecimiento bacteriano de las cepas salvaje LP 3004 y LP 3020 en el medio definido de Götz

Con el objetivo de caracterizar el crecimiento de *B. japonicum* LP 3004 y la mutante LP 3020, se las cultivó en el medio de Götz *et al.* (1982). Los cultivos se iniciaron a partir de rizobios que estaban en el estadio exponencial de crecimiento (véase materiales y métodos). Durante 28 días se tomaron muestras de los cultivos diariamente, y a cada

muestra se le estimó la biomasa total por medida de la DO_{500} y el número de células viables por recuento en placa de las UFC. Se realizaron dos experimentos independientes, los cuales mostraron resultados similares; a continuación expondremos los resultados obtenidos en uno de ellos.

En la Figura IV.6 puede observarse que la biomasa total de la cepa salvaje y la mutante poseen cinéticas de crecimiento similares. Una vez alcanzada la fase estacionaria o exponencial tardía (7 días) comienza a descender el número de $UFC.ml^{-1}$ en ambas cepas (figura IV.6.B). Sin embargo, este descenso del número de células viables fue más pronunciado en la cepa mutante, llegando a $1,5 \times 10^6$ bacterias. ml^{-1} a los 28 días mientras que la cepa salvaje se mantuvo en las $5,2 \times 10^7$ bacterias. ml^{-1} . Este descenso del número de células viables en la cepa mutante bajo condiciones limitantes (Kolter *et al.*, 1993), podría deberse en parte a una disminución de la síntesis de PHB documentada para las cepas *aniA*- de *R. etli* (Encarnación *et al.*, 2002) debido a su conocido rol como reserva intracelular de C y energía (Tal y Okon, 1985; James *et al.*, 2003; Kadouri *et al.*, 2002).

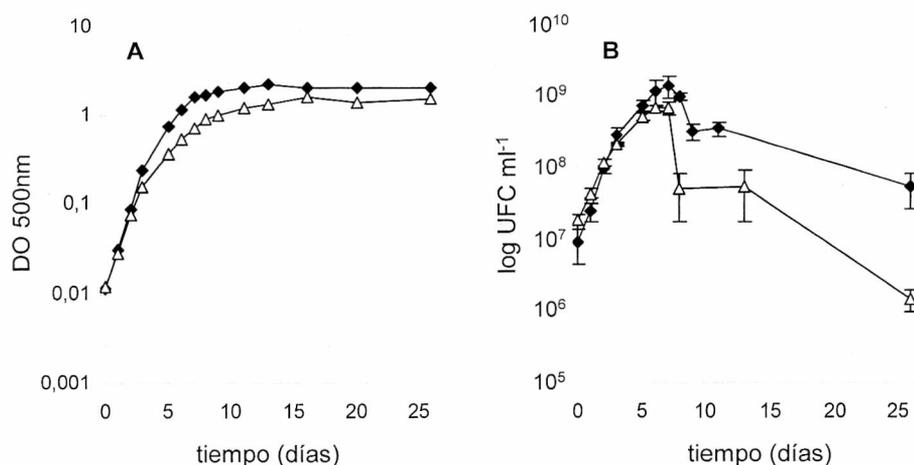


Figura IV.6 Crecimiento de *B. japonicum* LP 3004 (rombos negros) y LP 3020 (triángulos blancos) en GN1 durante 28 días a 28°C con agitación a 180 rpm. **A.** Biomasa estimada por la DO_{500} . **B.** Estimación del número de células viables por recuento en placa de las $UFC.ml^{-1}$

En este sentido, López *et al.* (1995 y 1998) documentaron que cepas de *Pseudomonas oleovorans* que acumulan PHB sobreviven más tiempo que aquellas mutantes incapaces de hacerlo en cultivos bajo diferentes limitaciones, estableciendo una dependencia directa entre su acumulación y la supervivencia en cultivos con escasez de otros nutrientes diferentes del C. Paralelamente, esta misma dependencia entre la acumulación de PHB y la supervivencia se observó en *S. meliloti* (Ratcliff *et al.*, 2008).

Para probar en parte esta hipótesis y para proseguir con la caracterización de estas cepas, se decidió analizar la producción de PHB y EPS a lo largo del crecimiento de *B. japonicum* LP 3004 y su mutante LP 3020.

IV.6 Los mutantes *aniA*⁻ presentan una alta relación EPS/PHB en fase estacionaria tardía con suficiencia de la fuente de N

La denominación aquí utilizada de *aniA* (*anaerobic induced gene A*) al marco de lectura abierto que se sitúa río arriba del cluster *phbAB* fue acuñada por Povolo y Casella (2000) debido a que el gen se expresó sólo en cultivos limitados en O₂. Cuando los mutantes *aniA* de *S. meliloti* se cultivaron en escasez de O₂, mostraron un aumento significativo de los niveles de EPS pero el contenido de PHB permaneció inalterable (Povolo y Casella, 2000). Como dijimos anteriormente, en *R. etli* la cepa *aniA*⁻ produce un 40% menos de PHB que la cepa salvaje y un aumento significativo de los niveles de EPS, pero contrariamente a *S. meliloti*, las diferencias son notorias en condiciones aeróbicas (Encarnación *et al.*, 2002).

Para dilucidar los posibles efectos de *aniA* en la canalización de C en *B. japonicum*, se realizaron cultivos líquidos de las cepas salvajes y mutantes en Götz con manitol como única fuente de carbono y se midieron la densidad óptica (DO₅₀₀) y las cantidades de EPS y PHB a diferentes tiempos durante su crecimiento. En particular se cosecharon a los 5, 10, 15 y 25 días, observándose sólo una canalización diferencial en fase estacionaria tardía (25 días). Esta canalización diferencial del carbono hacia EPS también se reflejó en cultivos líquidos y sólidos sometidos a condiciones de microaerobiosis como se detalla en materiales y métodos. Los resultados que se muestran en las Figuras IV.7 y 8 corresponden a las cantidades relativas de EPS y PHB de cultivos aeróbicos de *B. japonicum* LP 3004 y el mutante LP 3020 cosechados en fase estacionaria tardía (25 días).

Allí puede observarse una marcada tendencia a la síntesis de EPS y CPS por parte de las cepas mutantes *aniA*⁻, situación similar a la observada cuando los cultivos son crecidos en escasez de la fuente de N (capítulo III). Particularmente, la cepa LP 3021 se comportó de manera similar a la cepa LP 3020, independientemente de la incapacidad de formar un EPS normal. Así, pudimos correlacionar de manera indirecta, la disminución del número de células viables en fase estacionaria tardía con una concomitante disminución del contenido de PHB

Como dijimos anteriormente, la síntesis aumentada de EPS en detrimento de PHB por parte de las cepas *aniA*⁻ en cultivos en fase estacionaria tardía también se observó en cultivos sometidos a microaerobiosis, lo que sugiere que *aniA* también actuaría en la cepa salvaje en condiciones de anoxia similares a las que describieron Povolo y Casella (2000) en *S. meliloti*.

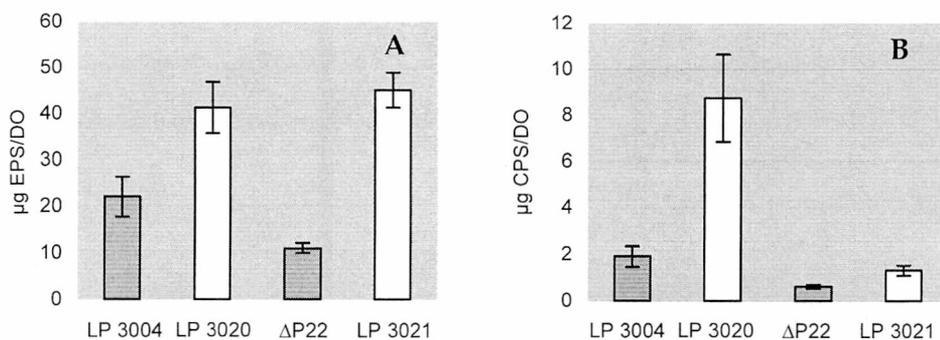


Figura IV.7 Cantidades de EPS (A) y CPS (B) relativas a DO_{500} de las cepas de *B. japonicum* LP 3004 y $\Delta P22$ crecidas en Götz manitol como única fuente de C (barras grises) y sus respectivos mutantes *aniA*⁻ (barras blancas). Los cultivos en batch fueron cosechados luego de 25 días de crecimiento. (fase estacionaria tardía)

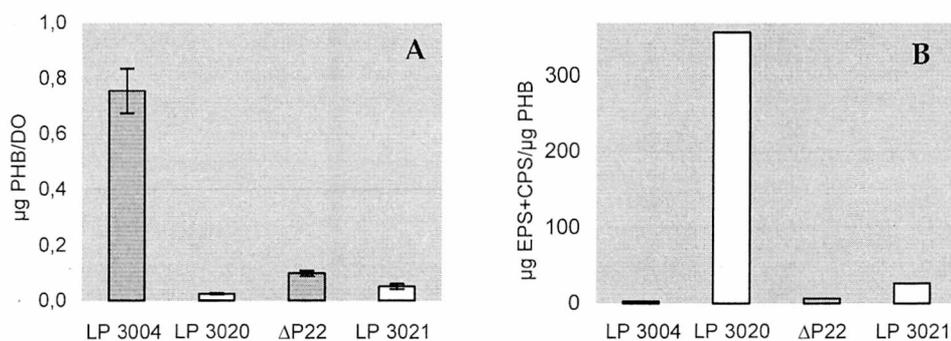


Figura IV.8 Cantidades de PHB relativas a DO_{500} (A) y cantidades de EPS + CPS relativas a PHB (B) de las cepas de *B. japonicum* LP 3004 y $\Delta P22$ crecidas en Götz manitol como única fuente de C (barras grises) y sus respectivos mutantes *aniA*⁻ (barras blancas). Los cultivos en batch fueron cosechados luego de 25 días de crecimiento. (fase estacionaria tardía)

IV.7 Crecimiento en diferentes fuentes de C

Dado que, como dijimos anteriormente, AniA se reportaba como un factor reponsable del flujo de C intracelular, decidimos caracterizar su crecimiento en 8 fuentes de C diferentes, a saber, manitol, arabinosa, acetato, malato, glucosa, glicerol, succinato y galactosa. Así, se plaquearon diluciones de cultivos líquidos de las cepas LP 3004 y LP

3020 en fase exponencial tal que crecieran entre 100 y 200 UFC en cajas Götz-agar suplementadas con la fuente de C respectiva.

En la Tabla V.1 se muestran los resultados obtenidos donde, a pesar de existir diferencias en el crecimiento, ambas cepas, salvaje y mutante, fueron capaces de crecer en todas las fuentes de C estudiadas, con excepción del mutante *aniA* en acetato donde su crecimiento fue muy pobre.

En paralelo, se realizó el mismo ensayo pero incubando las cajas en condiciones microaeróbicas. En ellas, generalmente la cepa mutante se veía más mucosa que la salvaje (datos no mostrados). Particularmente, y a diferencia de los cultivos aeróbicos, ni la cepa salvaje ni la mutante pudieron crecer en acetato como única fuente de C.

Tabla V.1 Crecimiento de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3004 *aniA*⁻ en diferentes fuentes de C en medio sólido de Götz a 28°C

	manitol	malato	succinato	acetato	glucosa	arabinosa	glicerol	galactosa
LP 3004	+++	++++	+++	++	++	++++	++	+++
LP 3020	+++	++++	+++	+/-	+	+++	+	++

Tipos de crecimiento:

++++ óptimo, +++ bueno, ++ regular, + pobre, +/- muy pobre

IV.8 Cuantificación de biofilms en la cepa LP 3020

Como detallamos en la introducción de este trabajo, las comunidades bacterianas suelen sobrevivir en cúmulos denominados comúnmente como biofilms. Estas películas biológicas constituyen entonces nichos ecológicos complejos donde habitan los procariotas rodeados por una matriz formada esencialmente por EPS (Hirsch *et al.*,

2005; Wosniak *et al.*, 2007). En este sentido, y teniendo en cuenta que los mutantes *aniA* sintetizaron más cantidades de EPS en relación con la cepa salvaje, decidimos estudiar si este desvío del C hacia la síntesis de EPS se veía relacionado con un aumento en la capacidad de estas cepas para formar biofilms.

La Figura IV.9 muestra la cuantificación de biofilms de cultivos bacterianos de la cepa salvaje LP 3004 y de la mutante LP 3020 donde se observa que ambas fueron capaces de formar biofilms, y que entre las 48 y 96 horas se llegó a los niveles máximos, no existiendo diferencias significativas entre ellas. Estos ensayos se repitieron en dos oportunidades independientes, dando resultados similares.

En este sentido, una mayor cantidad de exopolisacáridos producidas por las cepas mutantes a los 25 días de crecimiento en el medio de cultivo no se correlacionó con un aumento en la capacidad de formar biofilms, en discordancia con datos reportados en mutantes sobreproductores de EPS I en *S. meliloti* R1021 en los que se observó un aumento de dos veces con respecto a la cepa salvaje (Hirsch *et al.*, 2005). Sin embargo, estos datos realizados en el medio RDM (por *Rhizobium Defined Medium* (Vincent, 1970)) tienen amplia desviación estándar debido a la gran cantidad de grumos formados por la cepa mutante (Hirsch *et al.*, 2005) y es conocida la sensibilidad de los biofilms a los diferentes medios de cultivo (Stoodley y Stoodley, 2002).

Además, uno de los medios por los que el biofilm crece y se desarrolla precisamente es la división binaria de las células adheridas a una superficie (Heydorn *et al.*, 2000; Tolker Nielson *et al.*, 2000). Como vimos en la Figura IV. 6, la viabilidad de la cepa LP 3020 a los 25 días de crecimiento está disminuida con respecto a la cepa salvaje, y quizá este aspecto condicione entonces la formación de biofilm.

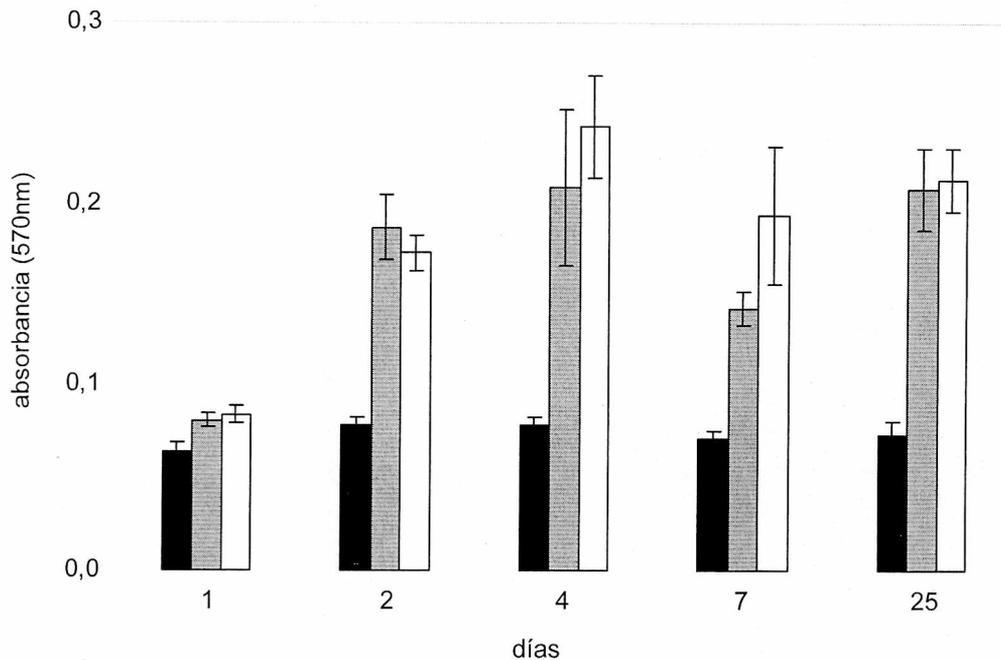


Figura IV.9 Producción de biofilms en función del tiempo por las cepas de *B. japonicum* LP 3004 (barras grises) y LP 3020 (barras blancas) crecidas en el medio de Götz con manitol como única fuente de C. Las barras negras representan el mismo medio de Götz sin adición de bacterias. Las barras representan la media de cuatro repeticiones y las barras de error corresponden al desvío estándar entre las mismas.

IV.9 La inactivación de *aniA* tiene un efecto en las propiedades simbióticas de *B. japonicum* en plantas de soja

Povolo y Casella (2000) demostraron en *S. meliloti* que *aniA* se transcribió en cultivos líquidos sometidos a estrés de O₂, mientras que en cultivos aeróbicos no se detectaron señales de *aniA*. Esto sugiere que el producto de *aniA* juega un rol importante en la fisiología celular cuando la concentración de O₂ es baja. Estas condiciones microaeróbicas se observan también cuando los rizobios están diferenciados a bacteroides dentro de los nódulos de leguminosas para mantener la actividad de la

enzima nitrogenasa (Boistard y Batut, 1994; Dunn, 1998; Udvardi *et al.*, 2002). En este sentido, Povolo y Casella (2000) vieron que los mutantes *aniA* de *S. meliloti* alteraron drásticamente los niveles de fijación de N₂ a niveles basales a juzgar por medidas de reducción de acetileno, incluso muchas plantas de alfalfa formaron pseudonódulos vacíos y el fenotipo no pudo revertirse por introducción del plásmido llevando el gen *aniA*. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en las medidas de reducción de acetileno en los mutantes *aniA* de *R. etli* en nódulos de poroto (Encarnación *et al.*, 2002) en coincidencia con la independencia de *aniA* con los niveles de O₂ en los cultivos.

A pesar de estos estudios con mutantes en genes homólogos a *blr0227*, en ningún trabajo previo se mostró la estructura de los nódulos de leguminosas infectados por las cepas *aniA*⁻. En este trabajo de Tesis estudiamos la capacidad de nodulación de los mutantes LP 3020 y LP 3021 y la estructura y ultraestructura de los nódulos inducidos por la cepa salvaje LP 3004 y el mutante LP 3020 en *Glycine max* (soja).

Para caracterizar los estadios tardíos de la simbiosis con plantas de soja, se inocularon suspensiones de las cepas LP 3004, ΔP22 y los mutantes *aniA*⁻ LP 3020 y LP 3021. Luego se dispusieron en invernáculo y se cosecharon a los 45 días post-inoculación. Así, se determinó la cantidad de nódulos por planta y se determinó el peso seco de la parte aérea. Los resultados sobre 30 plantas cosechadas por condición se muestran en la Tabla IV.2 y representan el promedio de tres ensayos independientes.

En todos los casos, los nódulos cosechados tuvieron el color rosado característico de los nódulos activos fijadores de N₂ siendo las hojas de un color verde fuerte, sin rastros de necrosis tisular (al menos externamente). Luego de la cosecha, la mayoría de estos nódulos fueron esterilizados superficialmente, macerados en placas

multipocillo y plaqueados en YEM-agar con sus correspondientes antibióticos corroborando que la invasión nodular fue debida a la cepa inoculada y que no hubo eventos de contaminación externa.

Tabla IV.2 Determinación del peso seco de tallos y hojas de *G. max* y el promedio de nódulos totales por planta de plantas inoculadas sobre raíces con suspensiones bacterianas de 5×10^5 UFC.

cepa	peso seco (mg) parte aérea \pm DEM	nódulos/planta \pm DEM
sin inocular	0,658 \pm 0,09 ^a	—
LP 3004	1,186 \pm 0,16 ^b	23,1 \pm 3,34 ^b
LP 3020	1,453 \pm 0,15 ^c	19,1 \pm 3,71 ^b
Δ P22	1,091 \pm 0,21 ^b	20,4 \pm 4,30 ^b
LP 3021	0,944 \pm 0,15 ^b	18,9 \pm 4,89 ^b

DEM: desvío estándar de la media.

Los superíndices a b y c indican diferencias significativas con un $p > 0,05$ mediante análisis de varianza múltiple.

Las plantas de soja inoculadas tanto por la cepa LP 3004 como la Δ P22 y sus respectivos mutantes *aniA*⁻ fueron indistinguibles entre sí con respecto al número de nódulos por planta. Sin embargo, el peso seco de la parte aérea de la mutante LP 3020 tuvo un aumento estadísticamente significativo con respecto a la cepa salvaje.

Por otro lado, los nódulos inducidos por las cepas *aniA*⁻ fueron indistinguibles externamente (figura IV.11 A y B) con respecto a aquellos inducidos por las cepas salvajes, no observándose nódulos blancos en los mutantes como se reporta para el caso de *S. meliloti* (Povolo y Casella, 2000) y en concordancia con lo observado por Encarnación *et al* (2002) en la simbiosis *R. etli aniA*⁻-poroto. Cabe recordar en este punto que tanto poroto como soja forman nódulos determinados (cita) y las plantas de

alfalfa, indeterminados, y tal vez estas diferencias en el fenotipo de nodulación se deban a diferencias en la organización de los mismos.

Se analizó a través de microscopía óptica de nódulos ocupados por LP 3004 y LP LP 3020 la organización del tejido vegetal infectado y la morfología bacteriana. En la Figura IV.10 C y D se muestran fotografías de cortes transversales de nódulos infectados por la cepa salvaje (C) y mutante (D), donde no se observan diferencias en su estructura, a excepción de una aparente reacción de defensa de la planta sugerida por las amplias paredes celulares teñidas con tetróxido de osmio en las células corticales más externas. Este tipo de morfología fue observado previamente en leguminosas infectadas con rizobios mutantes (Parniske *et al.*, 1994) y no rizobios (Benhamou *et al.*, 1996), donde se confirmó la respuesta de defensa.

Esta probable respuesta de defensa en las plantas inoculadas con la cepa mutante, por un lado, y la capacidad disminuída de derivar el exceso de C hacia la síntesis de PHB en cultivos limitados en O₂, nos motivó a estudiar la ultraestructura del nódulo. Con el microscopio electrónico de transmisión se observó que, mientras los bacteroides de la cepa salvaje LP 3004 sintetizaron grandes cantidades de PHB (gránulos amorfos electrotransparentes) típicas de los nódulos de soja (Wong y Evans, 1971), los de la cepa mutante sintetizaron menores cantidades o se mostraron incapaces de hacerlo (Figura IV.10 A y B), recordando bacteroides de nódulos indeterminados (Hirsch *et al.*, 1983; Trainer y Charles, 2006). Alternativamente, en la cepa mutante se observan pequeños gránulos electrodensos que recuerdan los gránulos de glucógeno (Tsien y Schmidt, 1977), lo que indica que la mutación en *aniA* implicaría un redireccionamiento del C intracelular hacia la síntesis de glucógeno. Esto podría

deberse a que los bacteroides de *B. japonicum* USDA 110 no sintetizan exopolisacáridos (NPS) dentro del simbiosoma (Streeter *et al.*, 1992), y a que el metabolismo de glucógeno y PHB estaría ligado en los bacteroides de una manera similar a lo que ocurre en los rizobios en vida libre con el EPS (Povolo y Casella, 2000; Encarnación *et al.*, 2002; Dunn *et al.*, 2002).

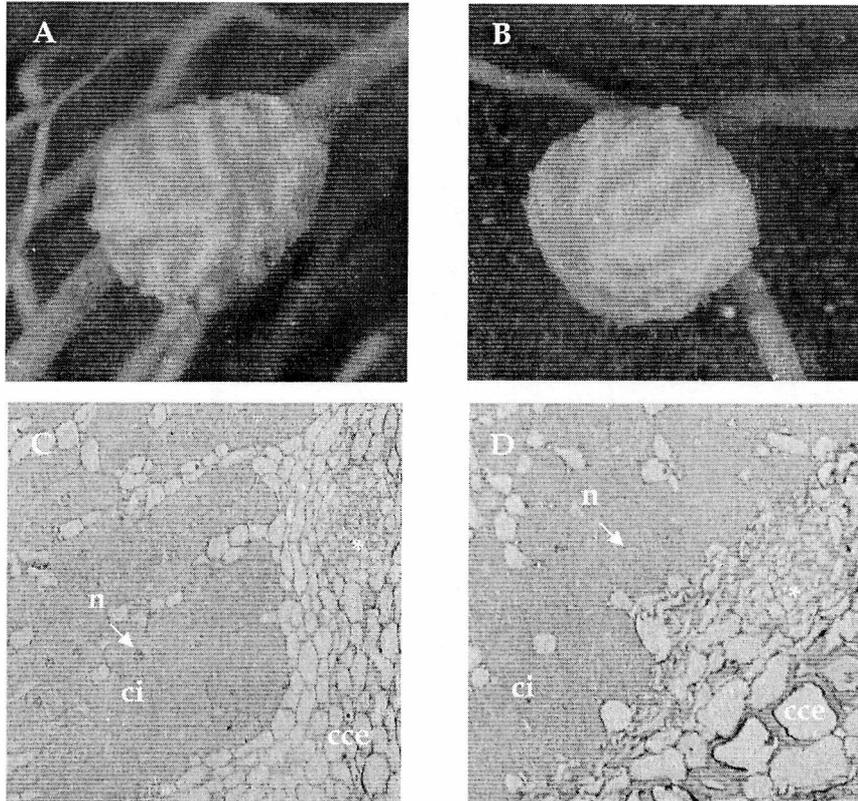


Figura IV.10 Fotografías que muestran la morfología externa (A y B) e interna (C y D) de nódulos de soja (*G. max*) ocupados por *B. japonicum* LP 3004 (A y C) y LP LP 3020 (B y D). Las fotos del panel superior fueron tomadas con una cámara adaptada a una lupa Leika mientras que las del panel inferior representan cortes transversales con una magnificación de aproximadamente 1.000X. El asterisco indica un haz vascular. ci: célula vegetal infectada, cce: célula cortical externa, n: núcleo vegetal.

La ausencia de gránulos de PHB en los bacteroides (Figura IV.11) y la mayor biomasa alcanzada por las plantas de soja inoculadas con la cepa mutante LP 3004 *aniA*⁻ (Tabla IV.2) indicarían que actividad nitrogenasa y la síntesis de PHB parecieran competir por las mismas fuentes de poder reductor (Trainer y Charles, 2006). Esta hipótesis de competencia entre la PHB sintasa (codificada por *phaC*) y la nitrogenasa fue propuesta a partir del estudio de mutantes de *R. etli phaC*⁻ que se muestran incapaces de generar PHB en los nódulos de *Phaseolus vulgaris* y aumentan la fijación de N₂ y en mutantes Tn5 en *B. japonicum* incapaces de producir nitrogenasa, que acumulan grandes cantidades de PHB con respecto a la cepa salvaje (Hahn *et al.*, 1984).

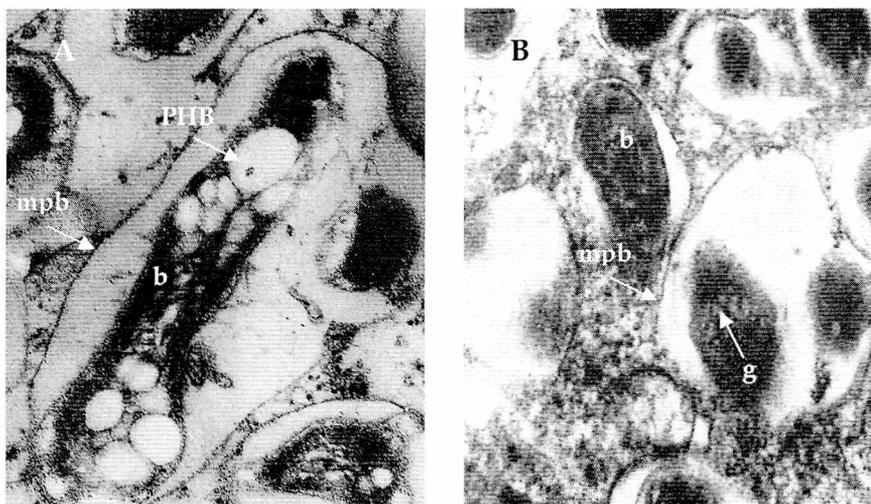


Figura IV.11 Micrográficas de secciones transversales de nódulos infectados por *B. japonicum* LP 3004 (A) y LP 3020 (B) vistas al microscopio electrónico de transmisión donde puede visualizarse que los bacteroides (b) de la cepa mutante no contienen los típicos gránulos de PHB visibles en la cepa salvaje. mpb: membrana peribacteroidal, g: glucógeno.

A pesar de estos trabajos, existe todavía amplia discusión con respecto a este tema, debido a evidencias que indican que la fijación de N₂ no estaría ligada directamente al metabolismo del PHB. Por ejemplo, se encontraron mutantes *phaC* de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* incapaces de producir PHB en nódulos de poroto (Lodwig *et al.*, 2005) que mantienen la misma *performance* simbiótica con respecto a la cepa salvaje.

En muchas bacterias, incluidas algunos rizobios, se sabe que la síntesis y degradación del polihidroxibutirato están amplia y complejamente reguladas (Cevallos *et al.*, 1996; Pötter *et al.*, 2004; Stubbe *et al.*, 2005). El rol de estos polímeros en la simbiosis, tanto glucógeno como PHB, no es claro y difiere según se trate de leguminosas que forman nódulos indeterminados o determinados (Trainer y Charles, 2006). Particularmente en estos últimos, la relevancia del PHB como reserva en el metabolismo del bacteroide es ampliamente debatida (Lodwig y Poole, 2003). Más estudios serán necesarios para ahondar de manera más acabada sobre el metabolismo del C en *B. japonicum* dentro de los nódulos de soja. En este sentido, los estudios proteómicos y el uso de microarreglos (*microarrays*) de ADN de *B. japonicum* (muchos de ellos comerciales) en vida libre y simbiótica que se han llevado a cabo en los últimos años, arrojan amplias perspectivas sobre este tema (Sarma y Emerich, 2005; Chang *et al.*, 2007; Socorro Mesa *et al.*, 2008).

Capítulo V

INFLUENCIA CUALITATIVA Y CUANTITATIVA DE LA COMPOSICIÓN DEL EPS SOBRE DIFERENTES PARÁMETROS SIMBIÓTICOS

V.1 Introducción

La estructura de los EPS ácidos de *B. japonicum* USDA 110 consta de unidades pentaméricas de glucosa, galactosa, ácido galacturónico y manosa en una proporción 2:1:1:1 (Mort y Bauer, 1980) y/o 6:3:3:1 (véase Capítulo III).

Como se observó en el capítulo III, el análisis cromatográfico de los EPS producidos por la cepa mutante $\Delta P22$ mostró que los mismos no tenían galactosa pero poseían niveles normales de ácido galacturónico.

Debido a que la vía de Leloir (UDP-glucosa \rightleftharpoons UDP-galactosa) no está presente en rizobios (cita), podría hipotetizarse entonces que la vía de síntesis de los UDP-galactósidos para formar los exopolisacáridos en *B. japonicum* estaría separada. Así, probablemente la síntesis del ácido UDP-galacturónico para el EPS provendría de una oxidación de UDP-glucosa a ácido UDP-glucurónico seguida de una epimerización del ácido UDP-glucurónico a ácido UDP-galacturónico. Esta vía, independiente de la síntesis de UDP-galactosa, ha sido observada en *S. meliloti* Rm 41 para la síntesis compartida de KdoPS y LPS (Kereszt *et al.*, 1998).

Mediante el uso de herramientas bioinformáticas hemos encarado el estudio de los genes implicados en la síntesis de estas enzimas en *B. japonicum*

V.2 Análisis bioinformáticos

La primer pregunta que nos hicimos al conocer la composición del EPS de la cepa mutante $\Delta P22$ fue casi obvia y conducente a otras: ¿Por qué mostró niveles normales

de ácido galacturónico en su EPS? ¿Esto quiere decir que la vía de síntesis de los UDP-galactósidos está separada? La gran mayoría de los EPS y LPS rizobianos son ácidos, y esta acidez normalmente se la confiere el ácido galacturónico o el ácido glucurónico (aunque a veces los sustituyentes piruvilo y succinilo). Esta carga negativa, ¿Es esencial para la infección y nodulación a plantas de soja?

Así, decidimos realizar una búsqueda preliminar a través de la base de datos del genoma de *B. japonicum* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002) tratando de encontrar genes posiblemente homólogos con genes relacionados a la síntesis de ácido UDP-glucurónico y/o ácido UDP-galacturónico en otras especies de rizobios más estudiados como *S. meliloti*. Dicha búsqueda arrojó dos genes parálogos para cada una de las funciones UDP-glucosa-6-deshidrogenasa (anotadas como *ugdH*) y ácido UDP-glucurónico epimerasa (anotadas como *lspL*). Dentro de los primeros, es decir, los genes *ugdH*, encontramos una identidad nucleotídica y aminoacídica del 99%, con lo cual suponemos que es el mismo gen duplicado en el genoma. Por otro lado, los genes parálogos *lspL* presentaron una identidad nucleotídica de 74 % y aminoacídica de 53,7%. Sin embargo, al momento de realizar los alineamientos, observamos que uno de los genes *ugdH* (*blr2383*) y uno de los *lspL* (*blr2382*) se encontraban contiguos. Esto nos motivó a realizar los estudios de mutagénesis en estos dos genes suponiendo que la cercanía secuencial implicaba una misma vía funcional y porque además, los genes vecinos (en especial río abajo) tienen relación con la producción (*exoZ*) y exportación (*bll2379*) de EPS, como así también con la biosíntesis (*bll2375*) y transferencia de residuos glucosídicos (*bll2381*, *bll2380*, *bll2377*, *bll2376* y *bll2374*), estas últimas con funciones putativas.

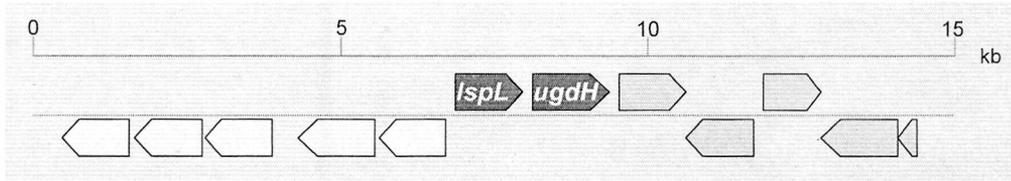


Figura V.1 Cluster de genes de *B. japonicum* USDA 110 involucrado en una parte de la síntesis del EPS. En rojo se marcan los genes candidatos para la mutagénesis y en amarillo aquellos relacionados con funciones putativas respecto a la síntesis de exopolisacáridos, en su mayoría glicosil transferasas.

En la Figura V.1 se muestra el arreglo de los genes a los que hacemos referencia con especial énfasis en los genes *ugdH* y *lspL*.

V.3 Construcción de las cepas mutantes de *B. japonicum* LP 3010, 3011 y 3012

El protocolo para realizar la mutagénesis sitio-específica se detalla en la Figura V.2. En breve, se amplificaron por PCR (Figura V.2, gel a) secuencias intergénicas río arriba y río abajo de los genes *lspL* (A) y *ugdH* (B) y se clonaron por separado en pGemT-Easy siguiendo las instrucciones del fabricante. El plásmido llevando el inserto A (pIQ09) se corroboró utilizando una mezcla de cebadores específicos del plásmido y del inserto (Figura V.2, gel b). La misma metodología se utilizó para el caso del chequeo del plásmido pIQ10 llevando el inserto B (no se muestra). Luego, se liberó el inserto A por digestión con *EcoRI* y se introdujo en el plásmido pK18mob (Figura V.2, gel c) suicida en rizobios originando el plásmido pIQ11 y en paralelo se liberó el inserto B por digestión *EcoRI* y se introdujo en el plásmido pBBR1MCS5 originando el plásmido pIQ12 (Figura V.2, gel d). Este último plásmido fue digerido con *BamHI* y *HindIII* para liberar el inserto B y ligarlo posteriormente en pIQ11. Esta última construcción,

llamada pIQ13, se corroboró utilizando mezclas de cebadores adecuadas (Figura V.2, gel e). Por último, se liberó mediante digestión con *Sma*I el cassette de resistencia a Sm/Spc del plásmido pHP45Ω para introducirlo en el plásmido pIQ13 (figura V.2, gel f) y así construir el plásmido pIQ14 corroborado por PCR (figura V.2, gel g) y secuenciación.

Dicha construcción, llevada por *E. coli* DH5α, se movilizó a *B. japonicum* USDA 110 por conjugación triparental utilizando el plásmido asistente pRK2013 (Figura V.2). De aproximadamente 3.000 colonias, se seleccionaron 3 transconjugantes resistentes a Sm/Spc y sensibles a Km, se corroboraron por PCR con cebadores específicos de una porción del cassette de resistencia y de porciones río arriba y río abajo de los genes *ugdH* y *lspL* respectivamente (Figura V.2, gel h).

Una vez obtenidos y chequeados estos tres clones mutantes (llamados LP 3010, LP 3011 y LP 3012), se realizó una PCR con cebadores BoxAR-1 para obtener su huella digital de ADN (*fingerprint*) no encontrándose diferencias en el bandeo entre la cepa salvaje y las mutantes (Figura V.3). Esta PCR se realizó para corroborar que los transconjugantes no provengan de posibles colonias contaminantes.

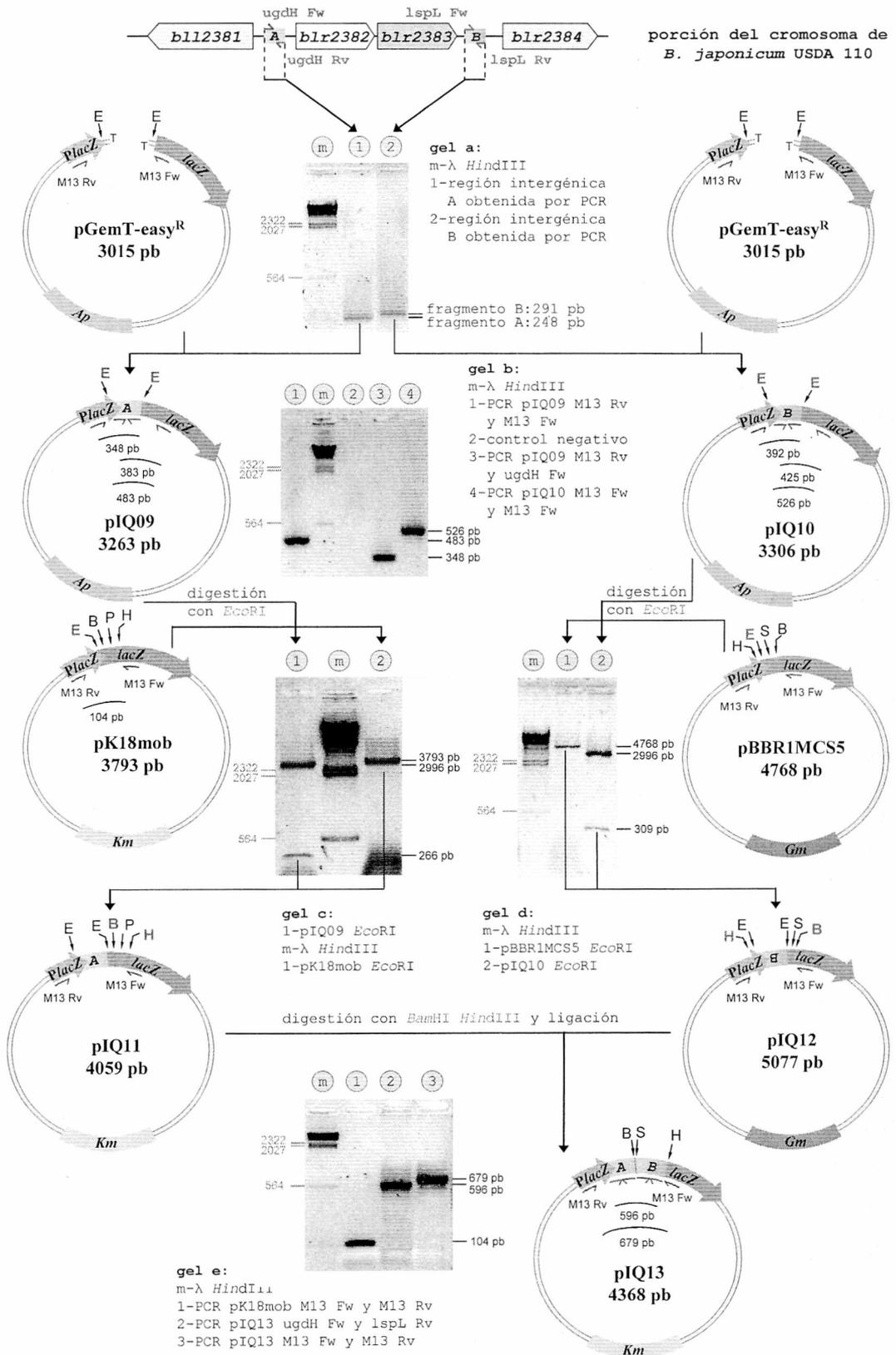


Figura V.2 Ver pie de figura en la página XX

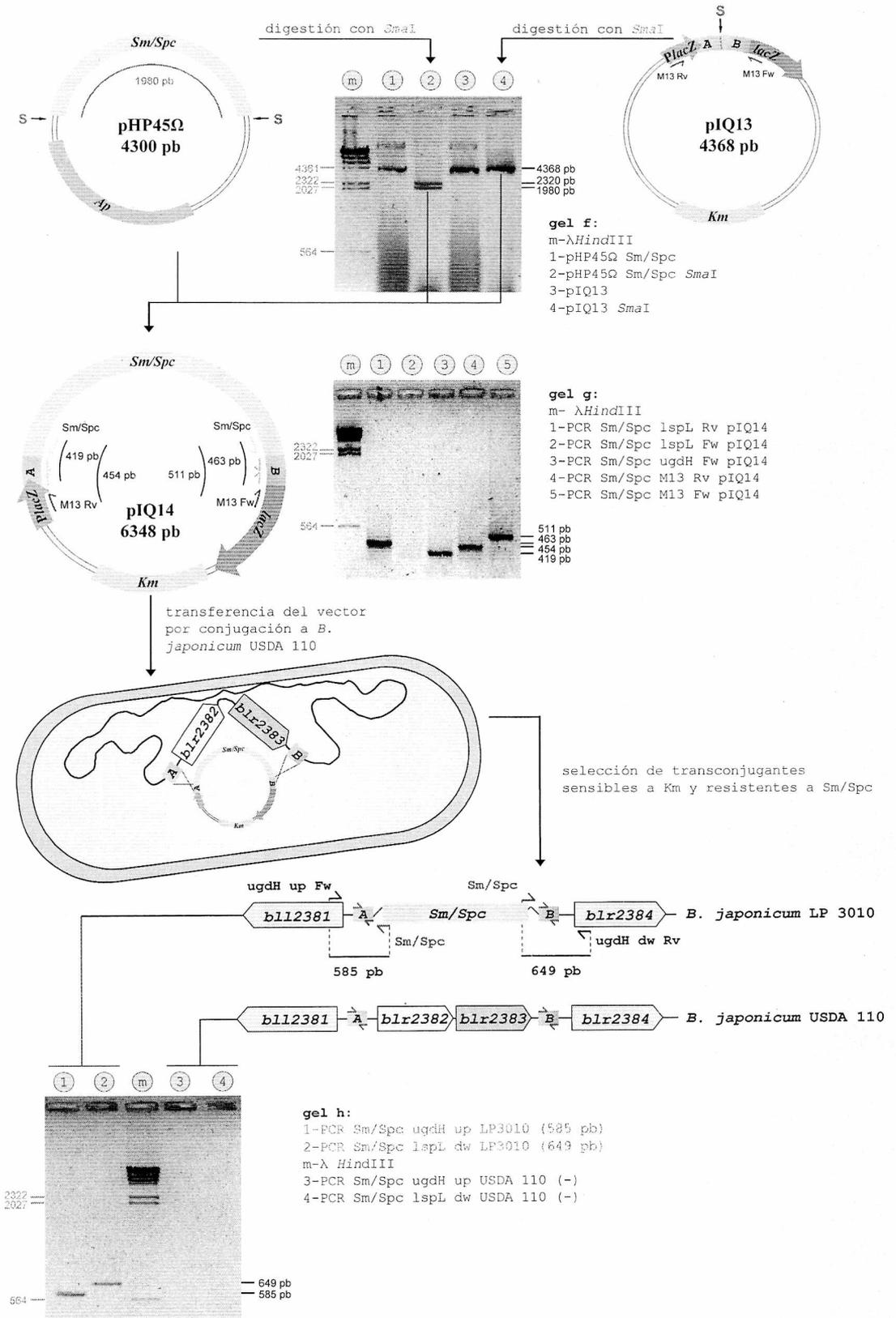


Figura V.2 (continuación) Ver pie de figura en la página siguiente

Por otro lado, se amplificó por PCR con la enzima Pfx un fragmento de *B. japonicum* USDA 110 de 3172 pares de bases con los cebadores *ugdH* up Fw y *lspL* dw Rv (Figura V.4, gel a) que contenía los genes *ugdH* y *lspL* enteros con su/s posible/s promotor/es inferidos por el programa Promoter Finder. Este fragmento con extremos romos se ligó en el vector pBBR1MCS2 digerido con *EcoRV* (figura V.4, gel b). Esta última construcción, llamada pIQ15 se corroboró por digestiones con enzimas de restricción que reconocieran sitios dentro y fuera del inserto (figuras V.4 c y d). Así, este plásmido se introdujo en la cepa mutante LP 3010 (figura V.4) por conjugación triparental, seleccionando aquellas colonias resistentes a Sm, Spc y Km.

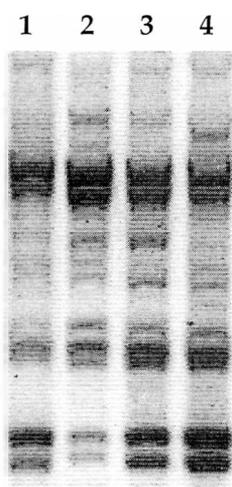


Figura V.3 Identidad de las cepas derivadas de *B. japonicum* USDA 110. Perfil de bandas de amplificación obtenido por PCR con cebadores Box-AR-1. 1-USD 110, 2-LP 3010, 3-LP 3011 y 4-LP 3012

Figura V.2 y V.2 continuación (páginas XX y XX) Construcción de los vectores pIQ13 llevando regiones intergénicas de los genes *ugdH* y *lspL* y pIQ14 llevando el gen de resistencia a Sm/Spc y transferencia de este último a *B. japonicum* USDA 110. A la izquierda de cada gel se indican los pesos moleculares del fago λ digerido con *HindIII* y a la derecha se indican los pesos moleculares de los fragmentos de interés. Enzimas de restricción: B: *BamHI*, E: *EcoRI*, H: *HindIII*, P: *PstI*, S: *SmaI*, Sp: *SphI*

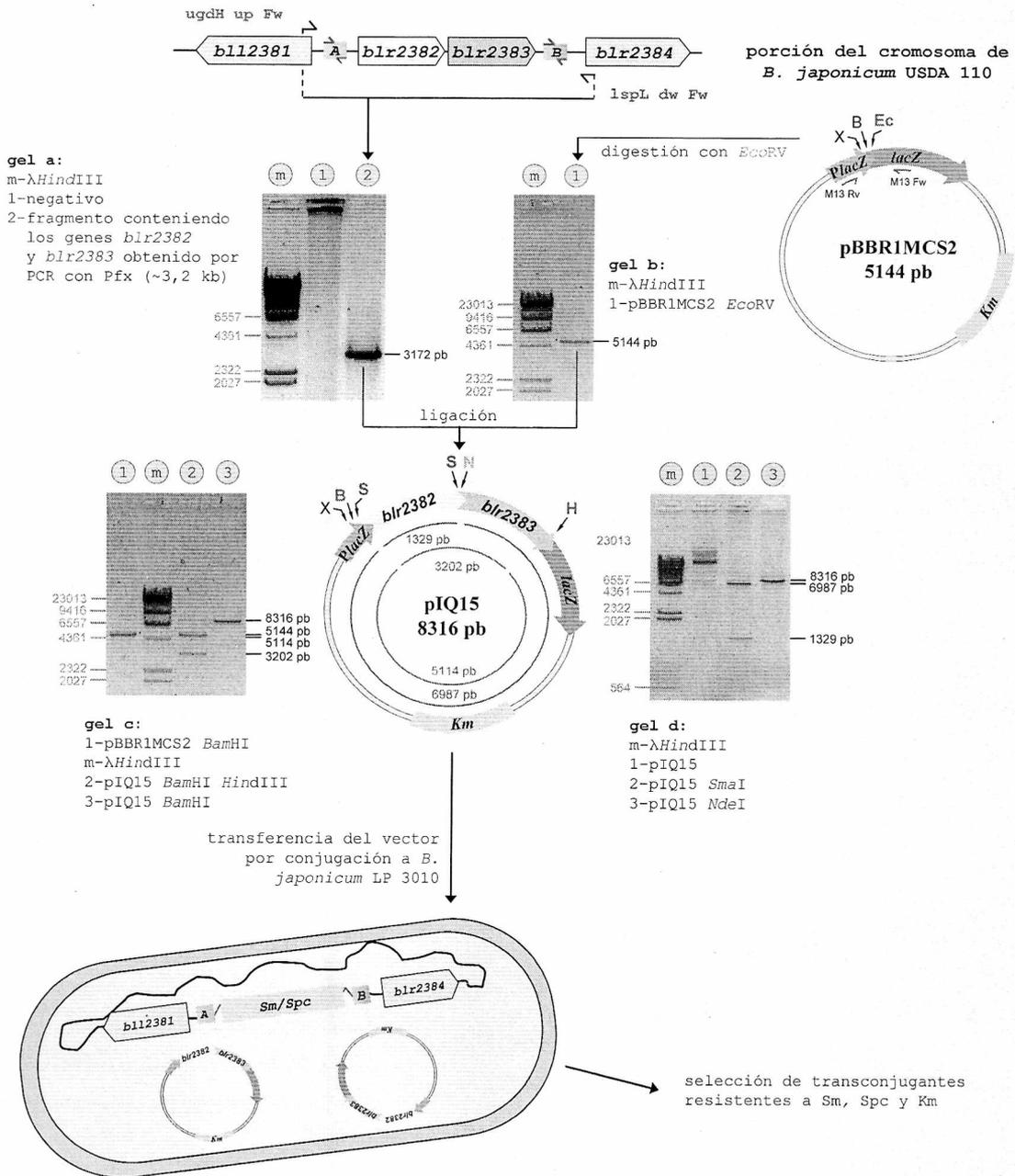


Figura V.4 Esquema que muestra la estrategia utilizada para obtener los genes *blr2382* y *blr2383* en trans en los mutantes de *B. japonicum* LP 3010.

A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *Hind*III y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

Enzimas de restricción: B: *Bam*HI, Ec: *Eco*RV, H: *Hind*III, N: *Nde*I, P: *Pst*I, S: *Sma*I, X: *Xba*I

V.4 Las cepas mutantes LP 3010, LP 3011 y LP3012 sintetizan menos cantidades de EPS en relación con la cepa salvaje

Una vez que las cepas mutantes fueron aisladas y chequeadas por PCR, se repicaron en medio YEM agarizado suplementado con rojo congo con sus correspondientes antibióticos. Tanto la cepa salvaje como las mutantes, formaron estructuras mucoides que no absorbieron el rojo congo, teniendo una tonalidad blanquecina a rosada. Sin embargo, cultivos líquidos en el medio de Götz cosechados en fase exponencial (7 días) mostraron que las cepas mutantes sintetizaron y exportaron significativamente menos cantidades de EPS al medio de cultivo, como lo muestra la figura V.5. Este fenotipo resultó similar al observado previamente con la cepa mutante $\Delta P22$ cultivada en el mismo medio sin limitación de N (capítulo III).

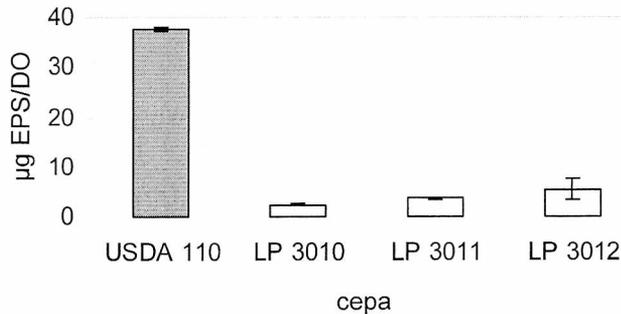


Figura V.5 Producción de EPS de *B. japonicum* USDA 110 (barra gris) y los mutantes (barras blancas) en fase exponencial (7 días de crecimiento) en el medio de Götz.

V.5 Los mutantes LP 3010, LP 3011 y LP3012 tienen alterado su EPS pero no su LPS

Parte de los EPS analizados por métodos químicos también se analizaron por métodos cromatográficos para corroborar la ausencia de ácido galacturónico y si ésta alteraría

la proporción de las demás hexosas que forman la estructura del EPS de *B. japonicum* (Mort y Bauer, 1982). Así, alícuotas de los polisacáridos extracelulares de los tres clones mutantes LP 3010, LP 3011 y LP 3012 y de la cepa salvaje fueron hidrolizados y analizados a través de HPAEC en colaboración con el grupo de la Dra. Alicia Couto del Centro de Investigaciones en Hidratos de Carbono (CIHIDECAR-UBA). En la Figura V.6 se muestran los cromatogramas obtenidos que representan al menos 5 experimentos independientes. Todos ellos mostraron patrones cromatográficos como el que muestra la Figura V.6. Allí puede observarse que mientras el EPS de la cepa salvaje presentó una composición similar a la obtenida en el capítulo III, el de las cepas mutantes careció de ácido galacturónico y de cualquier otra hexosa con características ácidas. A partir de aquí, todos los ensayos, a menos que se indique lo contrario, se hicieron con la cepa LP 3010. Esto se corroboró además por análisis electroforéticos de los EPS en geles de poliacrilamida en los cuáles los polisacáridos de las cepas mutantes no mostraron la capacidad migratoria típica de los polisacáridos de la cepa salvaje (datos no mostrados).

En paralelo, un análisis de masa realizado calculando el área bajo las curvas que representan a cada una de las hexosas, mostró que las cepas mutantes fueron incapaces de agregar otro azúcar en lugar del ácido galacturónico, aún cuando el mismo tiene una localización en el eje central de las unidades pentaméricas del exopolisacárido (Mort y Bauer, 1982, pág tal de la intro). La relación en moles calculada y esperada de cada una de estas hexosas se muestra en la tabla V.2.

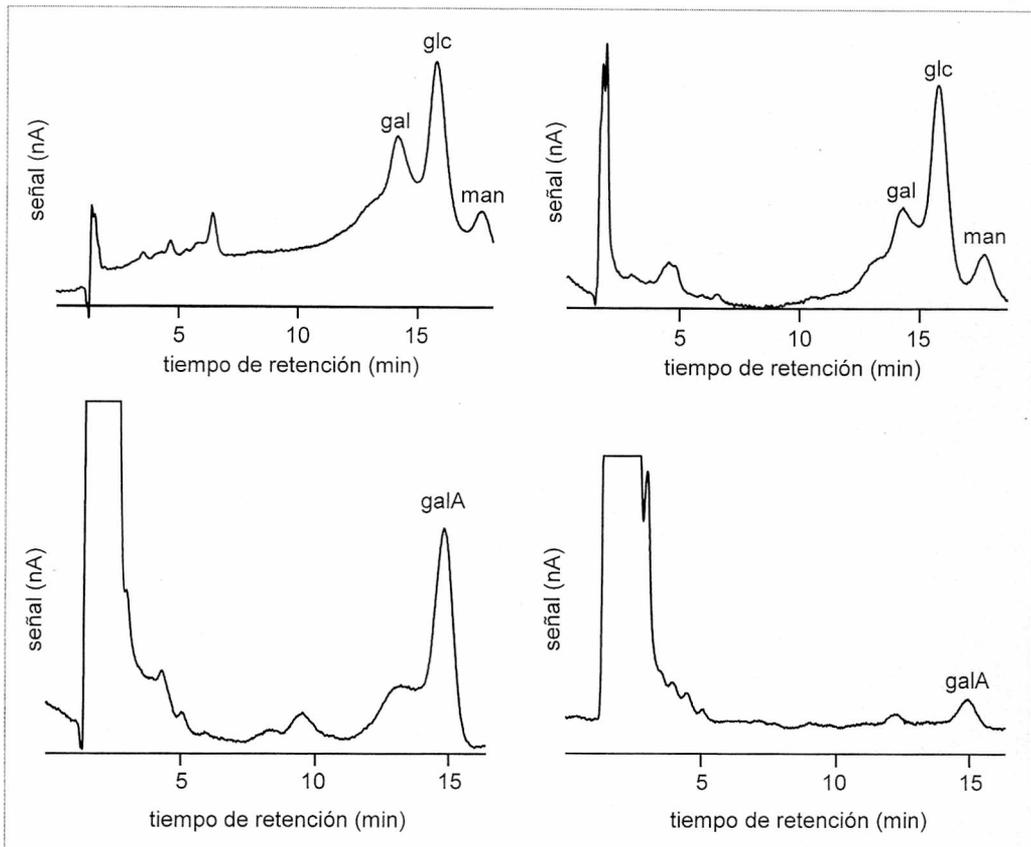


Figura V.6 Perfiles cromatográficos de EPS hidrolizados con ácido trifluoroacético de *B. japonicum* USDA 110 (paneles izquierdos) y LP 3010 (paneles derechos) donde se muestran los azúcares neutros (paneles superiores) y ácidos (paneles inferiores)

Tabla V.1 Relación molar de las hexosas que forman los EPS de *B. japonicum* USDA 110 y LP 3010 deducidas de los cromatogramas obtenidos por HPAEC.

azúcar	cepa	
	USDA 110	LP 3010
glucosa	5,2 (6)	5,9 (6)
galactosa	2,6 (3)	2,9 (3)
ácido galacturónico	3,5 (3)	0,1 (0)
manosa	1,0 (1)	0,8 (1)

Entre paréntesis se indica el número entero más cercano al valor esperado.

Así, se podría inferir que la estructura del EPS de la cepa mutante LP 3010 muestra una arquitectura como la que se muestra en la Figura V.7, en donde ahora la manosa se une a glucosa a ambos lados debido a la ausencia de ácido galacturónico. Posiblemente una de estas uniones sea tipo β debido a que la única glicanasa putativa que posee *B. japonicum* USDA 110 es de tipo 1,3-1,4-beta-glicanasa (codificadas por el gen *blr1364*) y que en *S. meliloti* sólo reconocen este tipo de unión y no otro (Glucksmann *et al.*, 1997; York y Walker, 1997). En esta última especie, este tipo de enzima es imprescindible para clivar los polisacáridos de alto peso molecular (HMW) en polisacáridos de bajo peso molecular (LMW) activos en los procesos de simbiosis (Battisti *et al.*, 1992; Urzainqui y Walker, 1992).

Por otro lado, los genes parálogos a los reemplazados en la mutagénesis por el gen de resistencia a Km (*blr2382* y *blr2383*) o por lo menos el primero, codificante de la enzima encargada de epimerizar el ácido glucurónico a ácido galacturónico, no posee

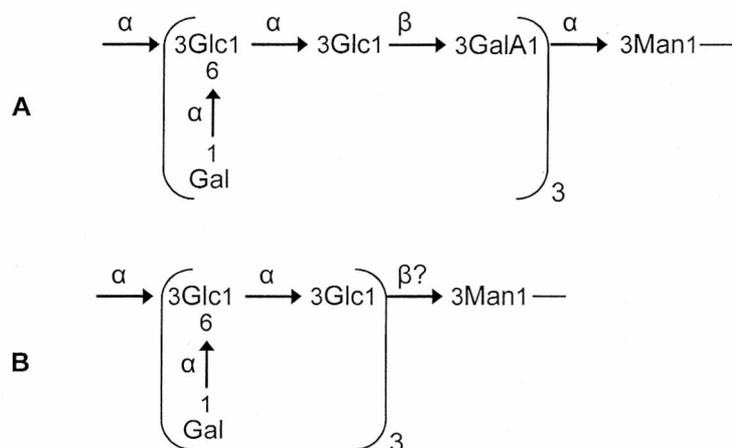


Figura V.7 Posible estructura de la unidad repetitiva del EPS de *B japonicum* USDA 110 (A) y LP 3010 (B). Por cada tres unidades de las hexosas entre paréntesis existe una manosa.

Abreviaturas: Glc: glucosa, Gal: galactosa; GalA: ácido galacturónico, Man: manosa.

actividad en *B. japonicum* o que dicha enzima no está involucrada en la síntesis de EPS debido a que en la cepa mutante LP 3010 y sus clones LP 3011 y LP 3012 no se detectan o se detectan trazas de ácido galacturónico en la hidrólisis de los mismos.

Debido a la posibilidad de que las cepas mutantes también muestren una alteración en otra molécula simbióticamente activa como lo es el LPS, se obtuvieron dichos polímeros del sedimento de cultivos bacterianos crecidos en fase exponencial mediante el método fenol-agua (Westphal y Jann, 1965) ligeramente modificado (véase Materiales y métodos). Similarmente a datos previos, el LPS de estas cepas se situó tanto en la fase acuosa como en la fenólica (Puvanesarajah *et al.*, 1987; Carrion *et al.*, 1990). Los perfiles obtenidos por el método fenol-agua se muestran en la Figura V.8, y son consistentes con perfiles de LPS obtenidos de *B. japonicum* USDA 110 mostrando dos regiones, una con múltiples bandas de menor movilidad (LPS I) y otra con tres bandas de mayor movilidad (LPS II) (Carrion *et al.*, 1990).

Así, la mutación de los genes *blr2382* y *blr2383* no tuvo influencias en los perfiles de LPS, los cuales no mostraron diferencias en el bandeo entre la cepa salvaje y la mutante. Este resultado era previsible, dado que *B. japonicum* USDA 110 no posee ácidos urónicos en su LPS mientras que sí los presenta en el EPS (Puvanesarajah *et al.*, 1987; Carrion *et al.*, 1990).

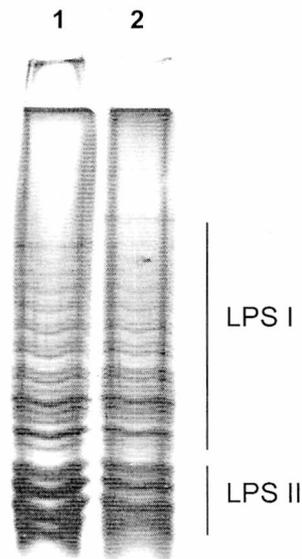


Figura V.8 SDS-PAGE de LPS obtenidos del sedimento de cultivos líquidos de *B japonicum* USDA 110 (calle 1) y LP 3010 (calle 2).

V. 6 La cepa LP 3010 revierte su fenotipo cuando lleva el plásmido con los genes salvajes *ugdH* y *lspL*

Como se comentó en la página XX, la cepa mutante LP 3010 fue complementada con el plásmido pBBR1MCS5 llevando los genes *ugdH* y *lspL* salvajes. Los EPS excretados en el sobrenadante de cultivo fueron aislados como se describió para las cepas mutantes y salvajes (véase sección V.4) y analizados a través de HPAEC. En la Figura V.9 se muestran los cromatogramas obtenidos para aquellos azúcares neutros (panel A) y ácidos (panel B). Estos perfiles fueron similares a los perfiles de la cepa salvaje (Figura V.6, paneles izquierdos) siendo los niveles de ácido galacturónico equivalentes.

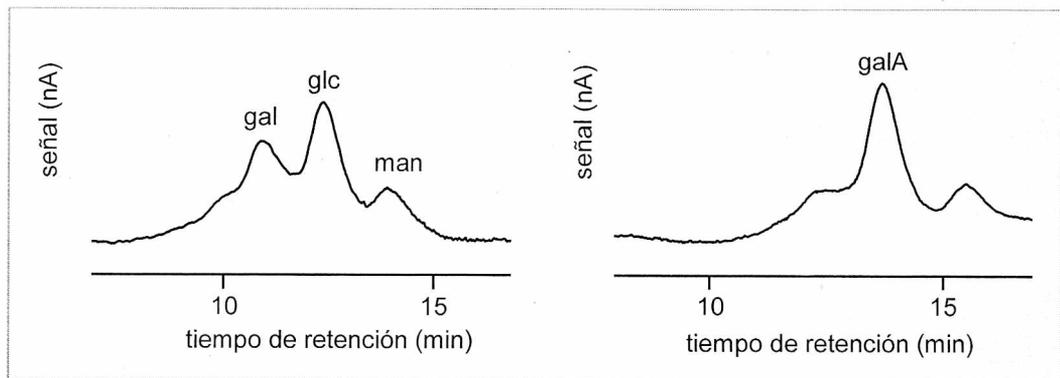


Figura V.9 Perfiles cromatográficos de EPS hidrolizados con ácido trifluoroacético de *B. japonicum* LP 3010 complementada en *trans* con los genes salvajes *blr2382* y *blr2383* donde se muestran los azúcares neutros (panel izquierdo) y ácidos (panel derecho)

Sin embargo, luego de la señal de ácido galacturónico, es decir, a tiempos de retención mayores, hubo una pequeña señal de un compuesto que no pudimos determinar y que creemos, resulta de la metilación del mismo.

V.7 La cepa LP 3010 no tiene alterada su capacidad de formar biofilms

Con el propósito de correlacionar la baja producción de EPS de la cepa LP 3010 con la capacidad para formar biofilms, se cuantificó la cantidad de los mismos en placas multipocillo de poliestireno según el método desarrollado por Fujishige (2006) ya empleado en esta Tesis para otros mutantes (véase Capítulo IV, página tal). Luego de inocular en las placas multipocillo, se cuantificó el biofilm a diferentes tiempos. Los resultados se muestran en la Figura V.10, que representa uno de los experimentos de los dos que se hicieron y que arrojaron similares resultados.

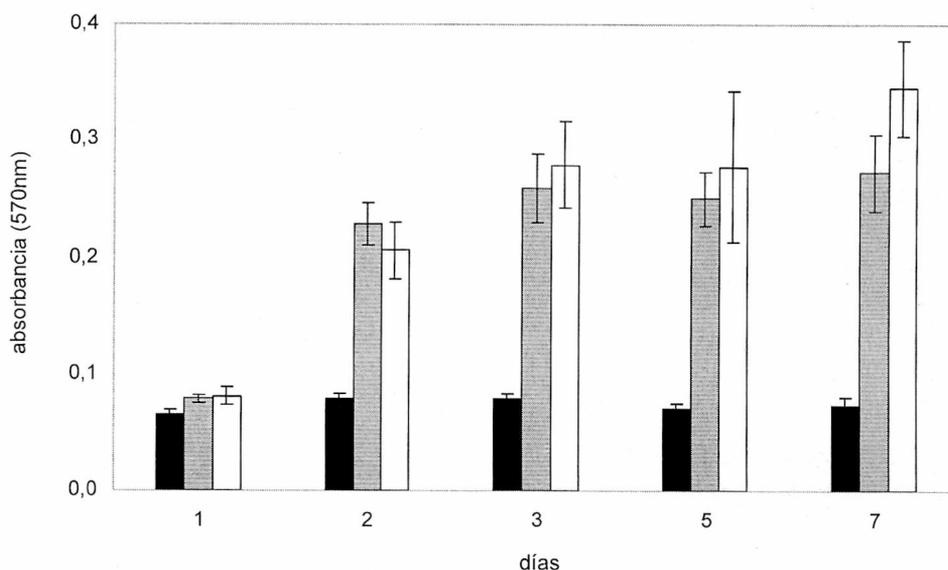


Figura V.10 Producción de biofilms en función del tiempo por las cepas de *B. japonicum* USDA 110 (barras grises) y LP 3010 (barras blancas) crecidas en el medio de Götz con manitol como única fuente de C. Las barras negras representan el mismo medio de Götz sin adición de bacterias. Las barras representan la media de cuatro repeticiones y las barras de error corresponden al desvío estándar entre las mismas.

De la Figura V.10 pueden desprenderse dos conclusiones, a saber: a- no hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la cantidad de biofilm formado por las cepas USDA 110 y LP 3010 a lo largo de los días ensayados b- ambas cepas lograron formar cantidades considerables de biofilm. Particularmente este último punto resulta de relevancia, ya que se esperaba que una menor síntesis de EPS (Figura V.5) resulte en una menor biomasa de biofilm, ya que estos polisacáridos constituyen alrededor del 95 % de su masa total (cita). Sin embargo, la ausencia de carga negativa en el EPS de la cepa mutante tal vez interfiera en la unión de las bacterias a la superficie de poliestireno debido a su característica fuertemente hidrofóbica. Más estudios serán necesarios para conocer el inicio y el desarrollo del biofilm en esta

mutante trabajando con otras técnicas tales como microscopía confocal para observar dinámicamente la estructura de los mismos.

V.8 Análisis simbióticos

Es ampliamente conocido el rol que juegan los exopolisacáridos en la simbiosis rizobio-leguminosa. Mucho de lo que hoy se sabe, sin embargo, ha derivado de estudios realizados en el par simbiótico modelo *S. meliloti*-alfalfa (Fraysee *et al.*, 2003; Skorupska *et al.*, 2006). En cuanto a la simbiosis *B. japonicum*-soja, existen pocos estudios sobre la importancia de los EPS (Parniske *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1998) que se han llevado a cabo mediante el análisis de mutaciones a través de la inserción de transposones (particularmente Tn5). Nosotros vamos a referirnos en los párrafos siguientes al estudio de los mutantes de *B. japonicum* USDA 110 incapaces de agregar ácido galacturónico en su EPS en relación con dos especies de plantas de soja, a saber, *G. max* y *G. soja*.

V.8.1 Infectividad

Para comenzar a caracterizar el efecto de estas mutaciones sobre las etapas de infección y nodulación en plantas de soja, decidimos realizar estudios de infectividad (Bhuvaneshwari *et al.*, 1980). La cepa mutante LP 3010 y la parental USDA 110 se crecieron en el medio de Götz con manitol como única fuente de C hasta fase de crecimiento exponencial y se inocularon en plantas de soja con una concentración de

aproximadamente 5×10^3 y 5×10^5 UFC.ml⁻¹. Estos ensayos se realizaron en bolsas plásticas de crecimiento (ver materiales y métodos) con 30 plantas por condición y en dos oportunidades diferentes, obteniéndose resultados similares en ambas. En la Figura V.10 se muestra uno de ellos como representativo.

De los gráficos de la Figura V.10 puede desprenderse que se observa un aumento de infectividad independientemente de la cepa pero dependiente del tamaño del inóculo inicial en donde los nódulos se sitúan alrededor de las zonas infectables al momento de la inoculación (esto es, cercanos a 0, paneles C y D). Sin embargo, en concentraciones de inóculos bajos (del orden de 10^3 UFC.ml⁻¹, paneles A y B) la cepa USDA 110 fue más infectiva que la cepa mutante, cuyos nódulos tuvieron una fuerte dispersión hacia zonas por debajo de la PR (números negativos, panel B). Esto se puso de manifiesto además en que las medidas de la distancia del nódulo más alto a PR fueron de -1,77 para la cepa salvaje y de -2,34 para la mutante, mientras que para inóculos altos (del orden de 10^5 UFC.ml⁻¹) las medidas fueron de +0,12 y -0,20 respectivamente.

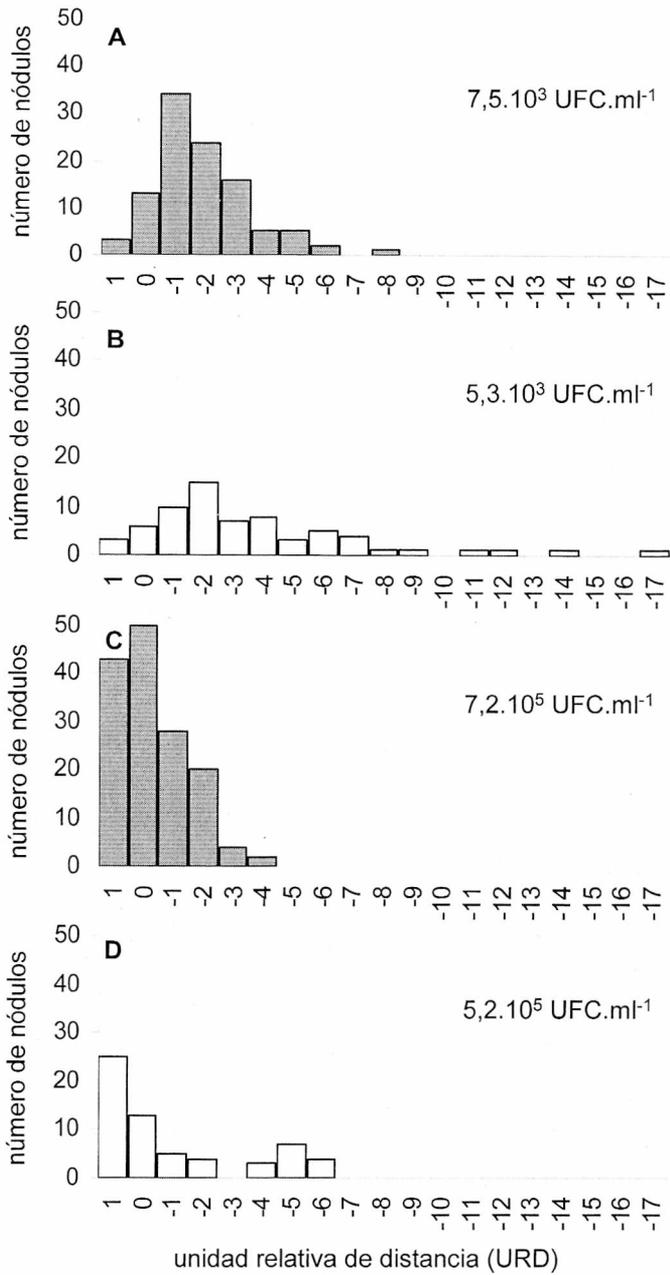


Figura V.10 Infectividad de *B. japonicum* USDA 110 (barras grises, paneles A y C) y LP 3010 (barras blancas, paneles B y D) en dos concentraciones, como se indica a la derecha. Los valores negativos indican distancias relativas de nódulos situados en regiones de la raíz ausentes al momento de la inoculación (debajo de la punta de la raíz).

Paralelamente, el número total de nódulos inducidos por la cepa parental fue de 250 mientras que la mutante sólo produjo 128, esto es, un 51,2 % menos.

Los ensayos de infectividad en bolsas plásticas de crecimiento también mostraron que la cepa mutante produjo una menor cantidad de nódulos en la raíz primaria de cada planta nodulada con respecto a la parental (Figura V.11), siendo el número de nódulos promedio de $2,58 \pm 0,28$ y $2,65 \pm 0,31$ para el caso de la mutante y $3,53 \pm 0,33$ y $4,90 \pm 0,49$ para la salvaje, con inóculos bajos y altos respectivamente. Mientras que con USDA 110 aumentó el número de nódulos a medida que se inocularon más bacterias, con LP 3010 el número de nódulos sobre la raíz principal se mantuvo casi constante (Figura V.11). El número de nódulos por planta alcanzó los valores de la cepa salvaje cuando el mutante fue complementado con el plásmido conteniendo los dos genes salvajes (datos no mostrados).

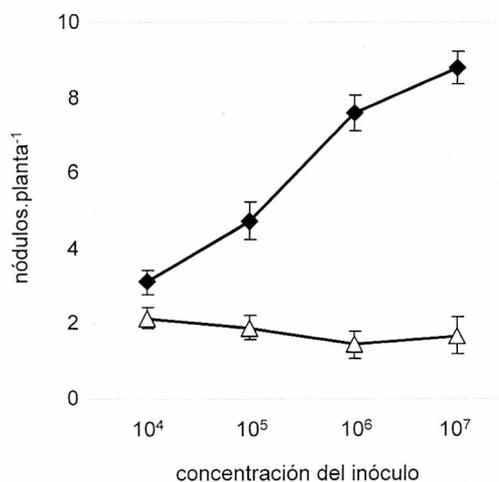


Figura V.11 Promedio del número de nódulos en raíz primaria por planta total ocupados por USDA 110 (rombos) y LP 3010 (triángulos) en función del inóculo bacteriano inicial.

Por último, la Figura V.12 muestra la distribución de frecuencias en función del número de nódulos por planta. Allí se observa la notable diferencia entre la cepa parental y la mutante debido a que la primera fue capaz de inducir más de 3 nódulos por planta en un 74,5% de los casos, mientras que este porcentaje fue de 13,5% para la cepa mutante.

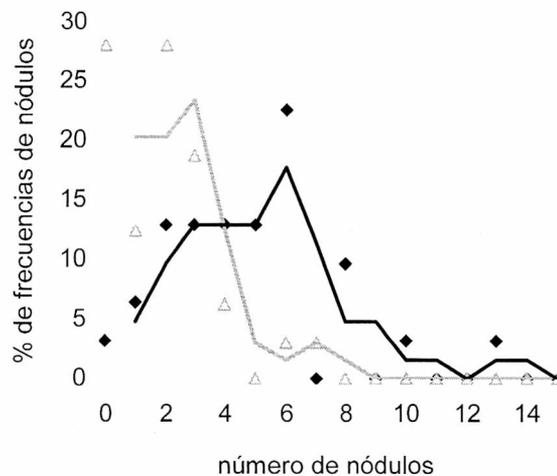


Figura V.12 Distribución de frecuencias de nódulos en función del número de nódulos por planta. La línea que une los puntos representa la media móvil

V.8.2 Estudios de competición para la nodulación

El hecho de que la cepa mutante posea escasa cantidad de nódulos por planta nos planteó la posibilidad de que tal vez posea una capacidad disminuída para la competición para la nodulación. Así, para determinar si la deficiencia en el EPS se corresponde con una disminución en la competición para la formación de nódulos, se coinocularon rizobios mutantes y salvajes en macetas que contenían plántulas de soja y posteriormente, se cuantificó el grado en que cada cepa ocupó los nódulos. Para distinguir de qué tratamiento provenían los rizobios ocupantes de cada nódulo, se

utilizó la resistencia a antibióticos. Dichas cepas fueron USDA 110 (sin resistencia) y LP 3010 ($Sm^r Spc^r$). Sin embargo, es de destacar que en este caso en particular, no pudo establecerse el porcentaje de doble ocupación debido a la imposibilidad de diferenciar la cepa salvaje de la mutante en cajas sin agregado del antibiótico selectivo. A pesar de ello, en los resultados mostrados a continuación se verá que como máximo, este porcentaje fue de 10% para el caso de la cepa mutante.

Para realizar estos ensayos se prepararon mezclas de los rizobios competidores provenientes de cultivos de 7 días en Götz con manitol como única fuente de C. Los rizobios se suspendieron en el medio mineral de Fåhreaus, se mezclaron en proporción 1:1 y se distribuyeron en forma homogénea en macetas conteniendo vermiculita estéril (ver materiales y métodos). La concentración elegida fue de alrededor de 5×10^{-5} UFC.ml⁻¹ para cada cepa competidora.

Tabla V.2 Porcentaje de ocupación de nódulos de la cepa LP 3010 frente a la cepa USDA 110 de plantas de soja crecidas en macetas con vermiculita

UFC.ml ⁻¹ inoculados		% ocupación de nódulos		nódulos totales	nódulos. planta ⁻¹
USDA 110	LP 3010	USDA 110	LP 3010		
1,23 x 10 ⁵	1,85 x 10 ⁵	89,6	10,4	331	26,6 ± 6,4
1,23 x 10 ⁵	—	100	—	102	34,0 ± 2,6
—	1,85 x 10 ⁵	—	100	73	24,3 ± 2,3
—	—	0	0	0	0

Los porcentajes de ocupación se determinaron por plaqueo en YEM-agar de homogenatos de nódulos con resistencia a Sm y Spc (LP 3010) o sin resistencia (USDA 110). La ocupación de nódulos fue significativamente diferente ($p < 0,05$) entre las dos cepas. Debido a la imposibilidad de diferenciar ambas cepas en cajas sin antibiótico, no se pudieron establecer los eventos de doble ocupación.

Los estudios de competición para la nodulación no se llevaron a cabo con la cepa LP 3010 complementada en *trans* debido a que estudios previos en nuestro laboratorio indicaron que la modificación del metabolismo bacteriano por introducción de ADN plasmídico dificulta la correcta interpretación de los resultados si no se cuenta con cepas isogénicas (Mongiardini *et al.*, enviado).

V.8.3 Ultraestructura de los nódulos invadidos por la cepa mutante LP 3010

Con el objetivo de observar si la mutación en el EPS causaba algún tipo de deterioro en la estructura de los nódulos de soja, éstos fueron seccionados transversalmente, fijados y teñidos para su posterior visualización al microscopio óptico y electrónico. A través de una primera inspección al microscopio óptico, pudimos observar que la morfología de los nódulos era normal, con numerosas células vegetales infectadas en el tejido central. Sin embargo, se evidenciaron los típicos síntomas que desencadenan mutantes de EPS en *B. japonicum* como una acentuada vacuolización de las células vegetales infectadas, particularmente localizadas en la periferia del núcleo (Figura V.13, B) y la presencia de paredes más engrosadas con respecto a los nódulos infectados por la cepa salvaje en las células corticales más externas (Figura V.13, A) (Parniske *et al.*, 1994; Eggleston *et al.*, 1996).

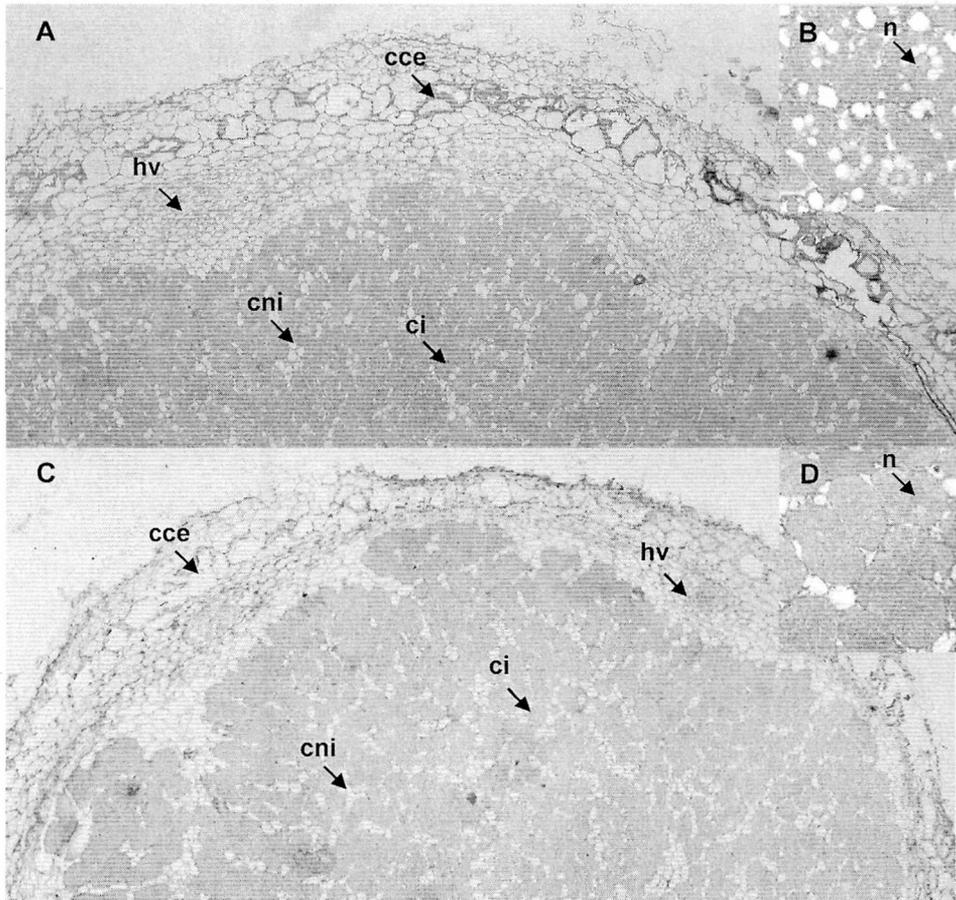


Figura V.13 Micrografías de cortes transversales de nódulos de *G. max* inducidos por las cepas LP 3010 (A y B) y USDA 110 (C y D). Las imágenes A y C fueron tomadas con 400 aumentos y las imágenes B y D con 1000 aumentos. En los paneles B y D se marca el núcleo de una célula vegetal infectada (n) que en B está rodeado de vacuolas.

Abreviaturas: cce: célula cortical externa, ci: célula vegetal infectada, cni: célula vegetal no infectada, hv: haz vascular.

Un análisis más profundo de la ultraestructura de los simbiosomas, evidenció una marcada disgregación de la membrana peribacteroidal (MPB), resultando en simbiosomas formados por múltiples bacteroides -probablemente resultado de la fusión de varios simbiosomas a nivel de la MPB-(Fedorova et al., 1999) (Figura V.14).

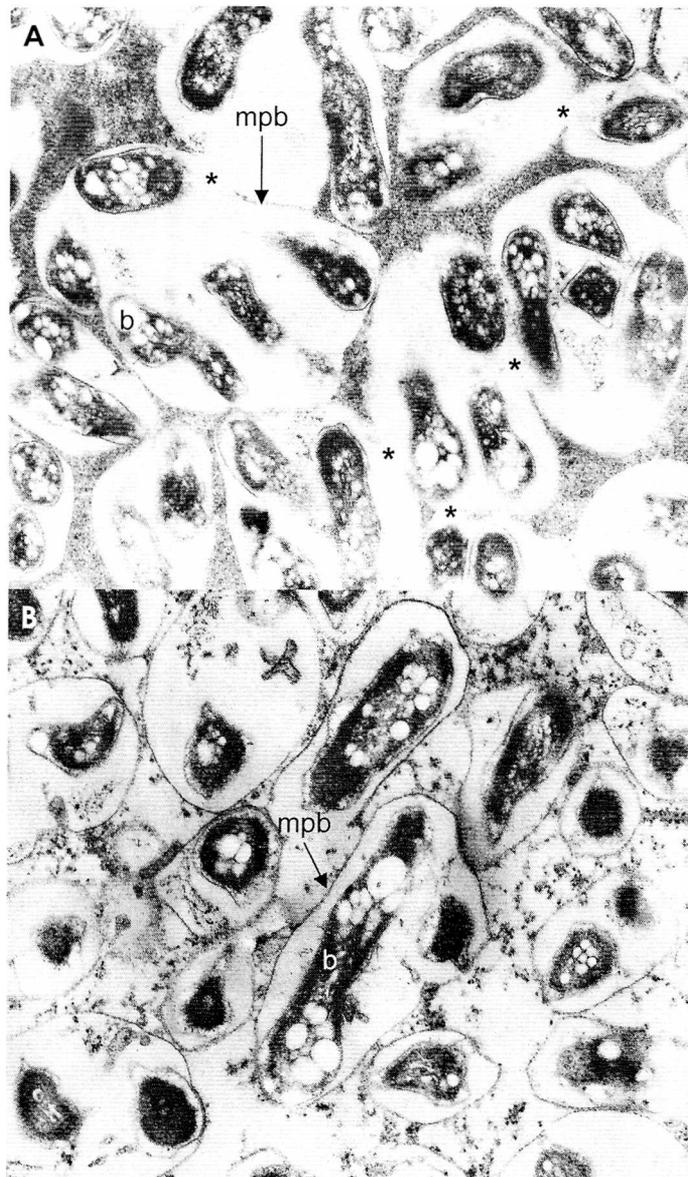


Figura V.14 Micrográficas de secciones transversales de nódulos infectados por *B. japonicum* LP 3010 (A) y USDA 110 (B) vistas al microscopio electrónico de transmisión a 12.000 aumentos. Los asteriscos en A marcan las zonas entre diferentes simbiosomas donde la membrana peribacteroidal (mpb) está parcialmente degradada, resultando en simbiosomas múltiples. b: bacteroide.

Como se detalló en la Figura V.4, la cepa LP 3010 se complementó con el plásmido pBBR1MCS2 llevando los genes *ugdH* y *lspL* salvajes. Esta cepa complementada fue crecida en las mismas condiciones que los ensayos anteriores y posteriormente fue inoculada en plantas de soja a razón de 10^8 UFC.ml sobre la raíz. Las plantas se

incubaron 60 días en invernáculo y luego se seccionaron los nódulos para posteriormente fijarlos con la misma metodología utilizada en la sección precedente. En la figura V.14 se muestra una micrografía en donde puede observarse que la cepa LP 3010 complementada fue capaz de revertir el fenotipo observado en la mutante.

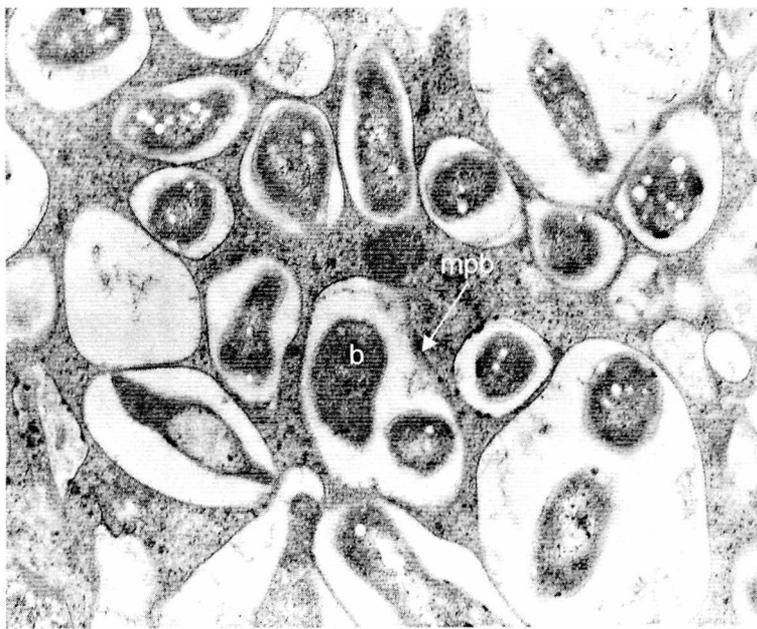


Figura V.14 Micrografía de una sección transversal de nódulo infectado por *B. japonicum* LP 3010 complementada con el plásmido pIQ15 llevando los genes salvajes *ugdH* y *lspL* (12.000 aumentos). Abreviaturas: b: bacterioide, mpb: membrana peribacteroidal.

V.8.4 Las cepas mutantes no tienen alterada la capacidad de fijar N₂ atmosférico

La escasa infectividad mostrada por la cepa mutante LP 3010, pero sobre todo el bajo potencial de nodulación que mostró en plantas de soja en bolsas plásticas, nos hizo pensar que tal vez este fenotipo tenga influencia en la fijación biológica de N₂.

Con el propósito de dilucidar este aspecto, diseñamos un experimento en el cual se inocularon plantines de soja (*G. max*) con la cepa salvaje USDA 110 y con la mutante LP 3010. Se inoculó 1 ml por planta (9×10^8 bacterias) directamente sobre la raíz principal dispuestas en macetas conteniendo vermiculita estéril como sustrato (en ambos casos provinieron de cultivos líquidos en Götz-manitol en fase exponencial de crecimiento). Este ensayo se repitió en tres oportunidades diferentes, también incorporando las mutantes LP 3011 y LP 3012, dando similares resultados. A continuación se muestra uno de los ensayos (Tabla V.3). La diferencia del peso seco entre el control sin inocular y aquellos inoculados con las cepas salvaje y mutante resultaron estadísticamente significativas.

Tabla V.3 Promedio del peso seco de la parte aérea (tallo y hojas) y del número de nódulos por planta de plantas de soja con 63 días inoculadas con USDA 110, LP 3010 e inoculada con *Fähraeus* como control negativo (sin inocular)

cepa	número de plantas	color de hojas	nódulos. planta ⁻¹ ± DE	peso seco (g. planta ⁻¹) ± DE
sin inocular	5	amarillo	—	0,69 ± 0,03
USDA 110	18	verde	34,33 ± 1,33	1,05 ± 0,08
LP 3010	60	verde	25,66 ± 1,45	1,04 ± 0,04

DE: desvío estándar de la media

Las plantas fueron cosechadas luego de 63 días en invernáculo, determinándose posteriormente el peso seco de la parte aérea (tallo y hojas) como una medida de la fijación biológica de nitrógeno. Todas las plantas inoculadas con la cepa mutante fueron indistinguibles de las inoculadas con la cepa salvaje a juzgar por el color de sus hojas, y, como se ve en la tabla V.3, también por el peso seco.

En estos ensayos donde las plantas se colocaron en macetas con vermiculita, si bien la cepa mutante noduló alrededor de un 25% menos, el número de nódulos por planta fue mayor que para el ensayo en bolsas plásticas de crecimiento y particularmente los nódulos invadidos por la cepa mutante presentaron un tamaño mayor que aquellos ocupados por la cepa salvaje. Cabe notar aquí que esta disminución del 25% en la cantidad de nódulos por planta no se capitalizó en una merma de biomasa por parte de aquellas plantas de soja invadidas por la cepa mutante (Tabla V.3).

Resumen

En este Capítulo se caracterizó una cepa de *B. japonicum* incapaz de sintetizar EPS con carga por la ausencia de ácido galacturónico. Esta incapacidad se tradujo en una disminución de las cantidades de EPS exportadas al medio de cultivo que finalmente resultó en una baja infectividad en plantas de soja con respecto a la cepa salvaje. La mutación no afectó la capacidad de infectar nódulos en plantas de soja (*G max* y *G. soja*). Estos nódulos, externamente similares a los inducidos por la cepa salvaje, mostraron una disgregación de la membrana peribacteroidal probablemente traducida en la fusión de diferentes simbiosomas en una única estructura. Esta alteración sin

embargo, no se tradujo en una menor tasa de fijación de N₂ a juzgar por medidas de peso seco de la parte aérea con respecto a la cepa salvaje.

El gen *blr 2382* llamado *lspL* probablemente se encuentre anotado de manera errónea en las bases de datos. Nosotros creemos que esta anotación quizá haga referencia a su alta similitud de secuencia nucleotídica y aminoacídica con los genes implicados en la síntesis de LPS en otras especies de rizobios que sí tienen azúcares ácidos en su estructura (Kereszt *et al.*, 1995) los cuales se llaman *lpsL* y no *lspL* tanto en *S. meliloti* como en *R. etli*. Estos genes *lpsL* que codifican UDP-ácido galacturónico epimerasas a su vez, tienen alta similitud con genes implicados en la síntesis de polisacáridos capsulares (CPS o KPS) de bacterias no emparentadas como *Staphylococcus aureus* (Lin *et al.*, 1994) y *Streptococcus pneumoniae* (Muñoz *et al.*, 1997). Así, la nomenclatura trivial de los genes nombrados por abreviaturas (*gene symbol* en las bases de datos), como es el caso de los implicados en el metabolismo de los UDP-azúcares, tienden a confusión sobre sus posibles funciones dentro de las vías de síntesis de los diferentes polisacáridos en las bacterias.

Para evitar estas confusiones, en este trabajo de Tesis se propone el nombre de *galAEp* para el gen *blr2382* de *B. japonicum* USDA 110.

Capítulo VI

*MUTANTES SITIO-ESPECÍFICOS
EN EL GEN *exoB* EN *B. JAPONICUM*
Y SU INFLUENCIA EN LA
NODULACIÓN EN SOJA*

VI.1 Introducción

Como se observó en el capítulo III, $\Delta P22$ fue menos infectiva en plantas de soja que USDA 110 (Parniske *et al.*, 1993; Quelas *et al.*, 2006). En este punto nosotros no sabíamos si este defecto era consecuencia de que el EPS carecía de galactosa debido a la delección parcial del gen *exoB* o que el EPS producido era de cadena corta debido al posible efecto que causarían las mutaciones de los genes *exoP* y *exoT* (Becker *et al.*, 1993 y 1995). En este sentido, estudios anteriores indicaron que el tamaño del EPS producido por $\Delta P22$ es consistente con una única unidad repetitiva (Becker *et al.*, 1998). Generalmente en los rizobios los EPS constan de dos fracciones, una de alto peso molecular (HMW, por *high molecular weight*) y una de bajo peso molecular (LMW, por *low molecular weight*) que incluso en *S. meliloti* tienen vías de síntesis separadas (González *et al.*, 1998). Varias evidencias sugieren que en *B. japonicum* y otros rizobios las formas simbióticamente activas del EPS son formas LMW a las cuales llamaron EOS (por *exooligosacáridos*) (Battisti *et al.*, 1992; Urzainqui y Walker, 1992; González *et al.*, 1996a, b). Adicionalmente, *S. meliloti* puede modular la síntesis de EPS HMW en respuesta a factores ambientales (Breedveld *et al.*, 1990). Los EOS provendrían de la acción de glicanasas sobre los EPS y/o de una pobre polimerización de las unidades repetitivas, dando formas con una, dos, tres o cuatro unidades, todas ellas simbióticamente activas (York y Walker, 1997). La dimerización y trimerización de las unidades repetitivas del succinoglucano I en *S. meliloti* es controlada por el gen *exoT* (Louch y Miller, 2001) y así, la delección de éste en $\Delta P22$ podría explicar que el EPS producido por esta cepa consiste en una sola unidad (Becker *et al.*, 1998) si uno supone

que estos genes son homólogos y cumplen la misma función en estas dos especies de rizobios. Alternativamente, la polimerización de las unidades repetitivas podría interrumpirse debido a la ausencia de galactosa, independientemente de *exoT*. La deleción en $\Delta P22$ también incluye la porción C-terminal de *exoP*, el cual compromete el dominio citoplasmático de la proteína que codifica. Por otro lado, si bien esta deleción, que abarca los genes *exoP*, *exoT* y *exoB* en $\Delta P22$, puede tener influencia sobre la polimerización del EPS (Niemeyer y Becker, 2001), las cepas mutantes de *B. japonicum* $\Delta P9$ y $\Delta P23$, las cuales presentan una inserción en la misma porción C-terminal de *exoP* como en $\Delta P22$ pero sin defectos en *exoT* y *exoB*, tienen un fenotipo similar a la cepa salvaje en cuanto a las propiedades de su EPS y sus características simbióticas (Becker *et al.*, 1998).

Debido a que el fenotipo observado previamente por nosotros en $\Delta P22$ no se podía atribuir a un único gen, decidimos construir mutantes sitio-específicos de *B. japonicum* USDA 110 en el gen *exoB* (anotado como *blr7578*) para corroborar si las propiedades simbióticas de la cepa $\Delta P22$ se debían sólo a la ausencia de este gen o si los genes *exoT* y *exoP* tenían algún tipo de influencia.

V.2 Construcción de las cepas de *B. japonicum* LP 3013 y LP 3017 mutantes en el gen *exoB*

La estrategia utilizada para la construcción de *B. japonicum* mutantes en el gen *exoB* fue similar a la realizada por Becker *et al.* (1998) en el mutante $\Delta P22$, en la cual se aprovechó el mismo sitio de corte con la enzima de restricción *Pst*I situada en el gen *exoB* para la inserción de un cassette de resistencia a antibiótico (Figura VI.1).

Brevemente, el procedimiento consistió en la amplificación de un fragmento interno al gen de 683 pares de bases (Figura VI.2, gel a) y su ligación en el plásmido pG18mobLK digerido con *Sma*I, originando el plásmido pIQ05 (Figura VI.2, gel b). Posteriormente, se liberó el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pUC-4K digerido con *Pst*I (Figura VI.2, gel c) y se ligó en el vector pIQ05 también digerido con *Pst*I. Así, se construyó el vector pIQ06 que se corroboró por PCR utilizando mezclas de cebadores que amplifiquen por fuera del vector y por dentro del gen de resistencia al antibiótico (Figura VI.2, gel d) y también por digestión con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Cl*aI por una lado y *Hind*III y *Kpn*I por otro (Figura V.2, gel e).

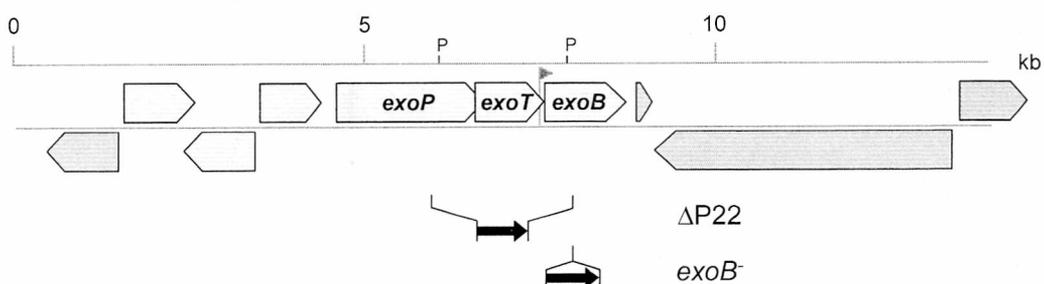


Figura VI.1 Cluster de genes asociados a funciones en la síntesis de EPS en *B. japonicum* (cajas amarillas). El corchete superior marca la amplitud de la deleción en $\Delta P22$, el corchete inferior marca el sitio donde nosotros realizamos la inserción del gen de resistencia a kanamicina (en ambos corchetes, indicado por flechas negras). La bandera señala el posible promotor del gen *exoB* inferido por el programa Promoter Finder. P: sitios de la enzima de restricción *Pst*I.

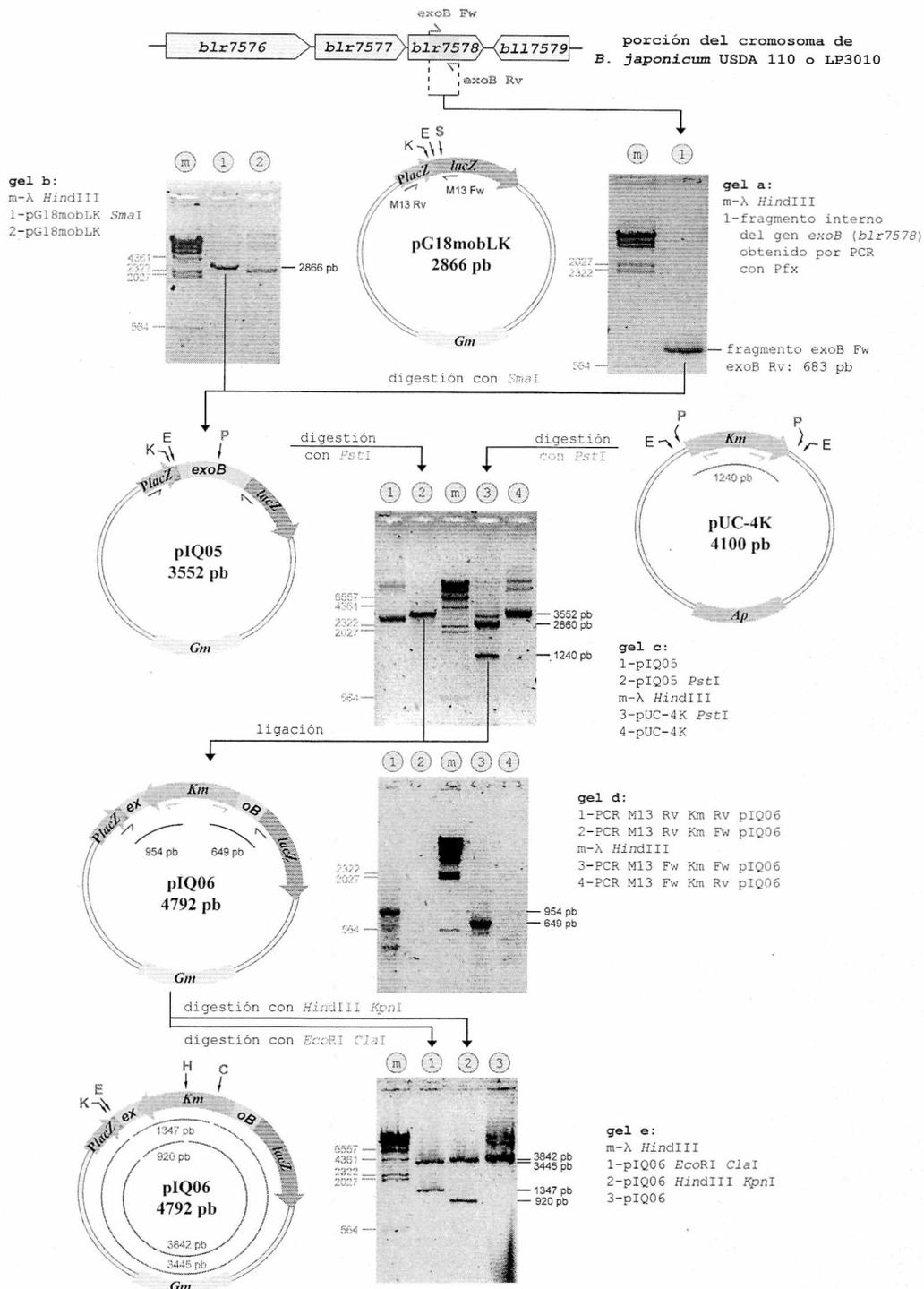


Figura VI.2 Estrategia de clonado y subclonado de un fragmento interno al gen *exoB* y del cassette de resistencia a kanamicina en el vector pG18mobLK suicida en rizobios.

A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *Hind*III y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

Enzimas de restricción: C: *Cla*I, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, K: *Kpn*I, P: *Pst*I, S: *Sma*I.

Posteriormente, el vector pIQ06 llevado por la cepa de *E. coli* DH5 α fue transferido a las cepas de *B. japonicum* USDA 110 y LP 3010 por conjugación triparental utilizando la cepa de *E. coli* llevando el plásmido pRK2013 como asistente (Figura V.3). Una vez crecidos los transconjugantes, se seleccionaron aquellas colonias que hayan recombinado de manera doble homóloga siendo resistentes a Km (para USDA 110) o Km, Sm y Spc (para LP 3010) y en ambos casos sensibles a Gm. El genotipo fue confirmado por PCR utilizando cebadores que amplifiquen por dentro y por fuera del gen *exoB* para confirmar que el evento de doble recombinación homóloga haya ocurrido en el lugar deseado (Figura VI.3, gel a). Así, se seleccionaron 4 clones de USDA 110 *exoB*⁻ (denominados LP 3013, LP 3014, LP 3015 y LP 3016) y dos clones LP 3010 *exoB*⁻ (denominados LP 3017 y LP 3018). En la Figura VI.3 se muestra el chequeo de algunos de estos clones.

Por otro lado, para complementar estos mutantes, amplificamos el gen *exoB* entero con su posible promotor (Figura VI.1) por PCR con Pfx (Figura VI.4, gel a). Este fragmento de 1172 pares de bases fue ligado en el plásmido pBBR1MCS5 digerido con *EcoRV* originando el plásmido pIQ07. Esta construcción fue chequeada por PCR con cebadores específicos como lo muestra la Figura VI.4, gel b. Una vez corroborada dicha construcción, se digirió con las enzimas *XbaI* y *BglII* para liberar el fragmento de interés y ligarlo en el plásmido pCB303 digerido con *XbaI* y *BamHI* (Figura VI, gel c), dando origen al plásmido pIQ08.

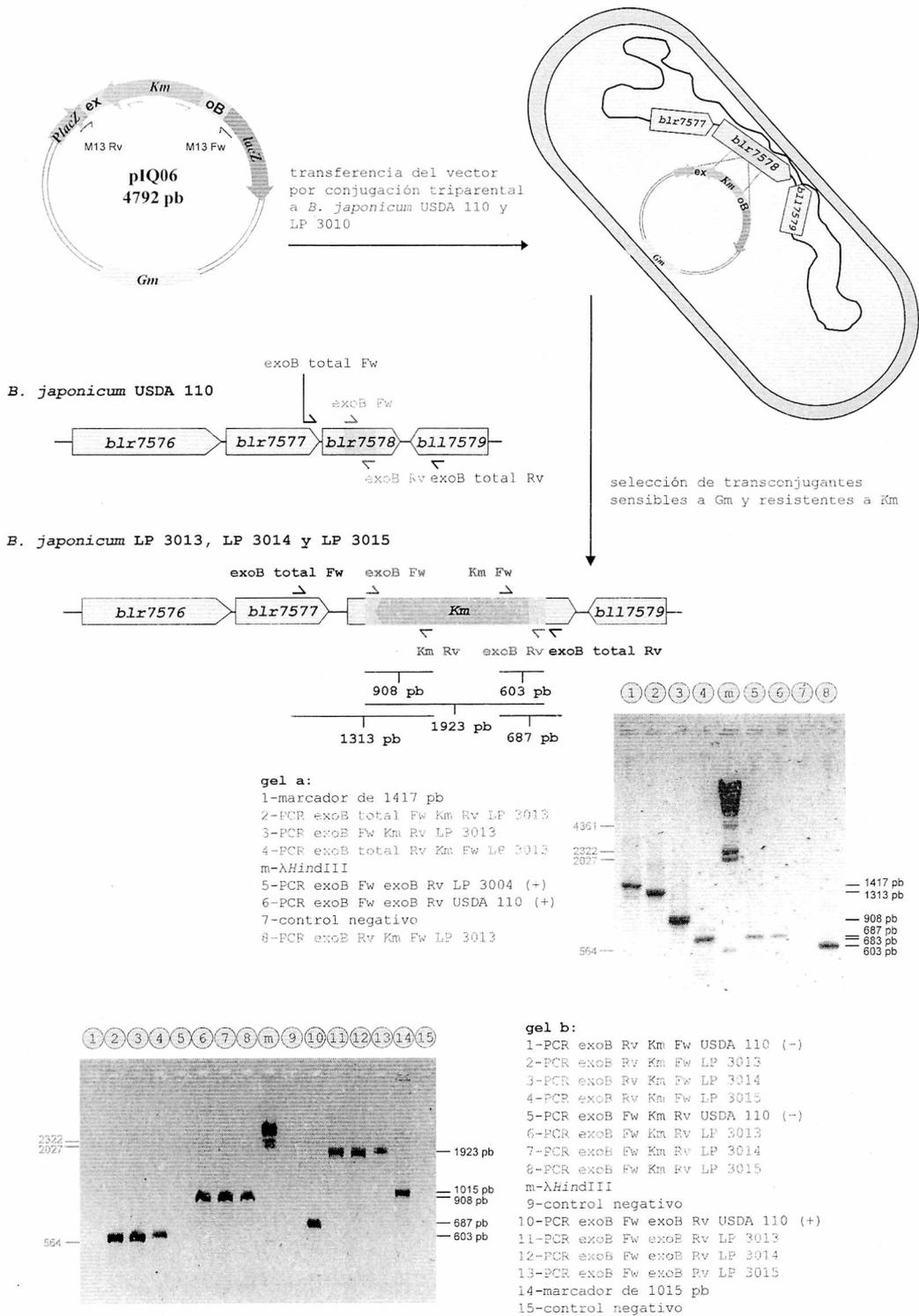


Figura VI.3 Construcción de los mutantes delecionales de USDA 110 y LP 3010 en el gen *exoB* y verificación de la deleción por PCR.

A la izquierda de los gels se muestra el ADN del fago λ digerido con *Hind*III y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

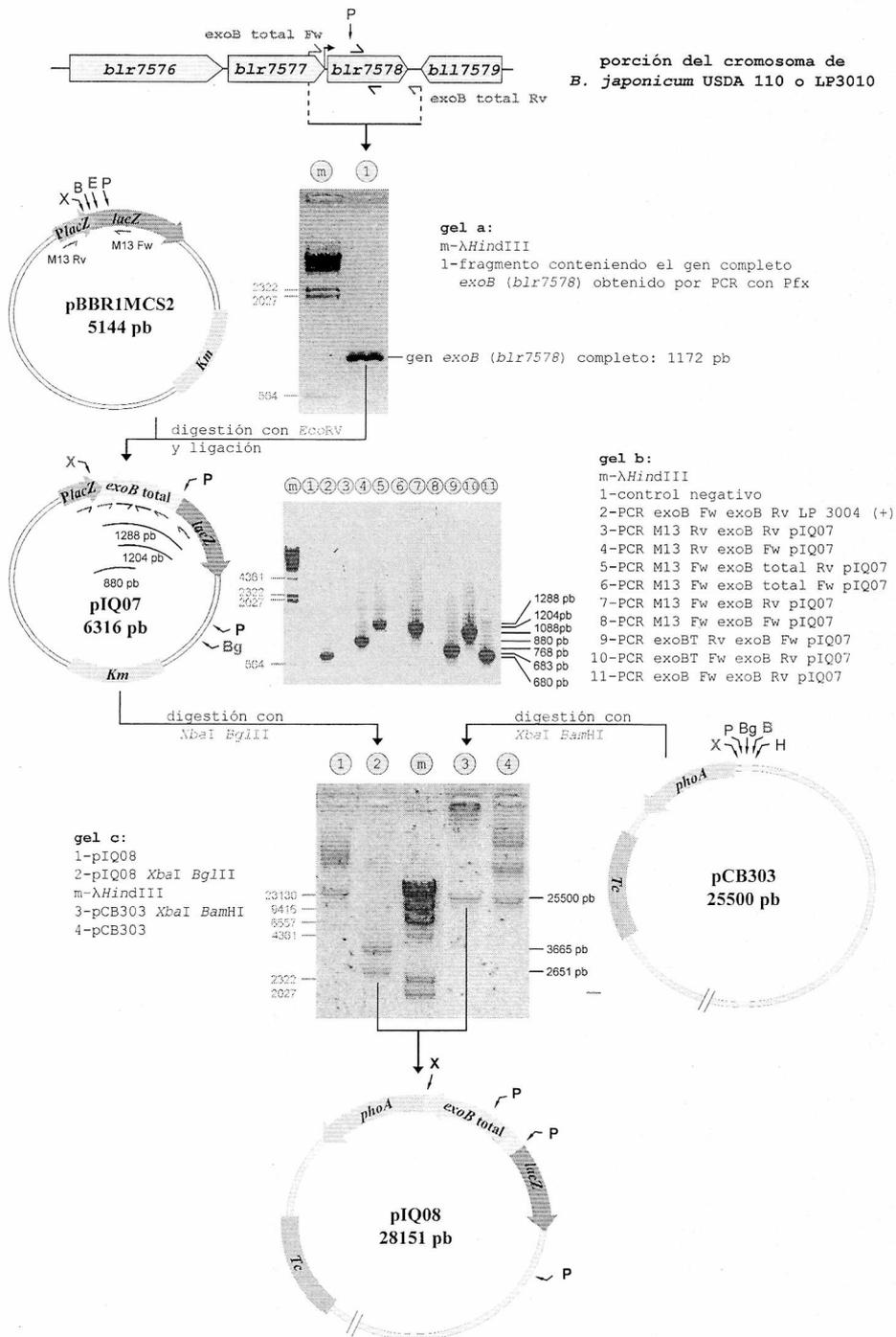


Figura VI.4 Construcción del plásmido pIQ08 llevando el gen *exoB*.

A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *HindIII* y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

Enzimas de restricción: B: *Bam*HI, Bg: *Bgl*III, E: *Eco*RI, H: *Hind*III, P: *Pst*I, S: *Sma*I, X: *Xba*I.

Por último, el plásmido pIQ08 fue transferido a las cepas mutantes LP 3013 y LP 3017 por conjugación triparental usando el plásmido pRK2013 como asistente y los transconjugantes seleccionados por su resistencia a Tc (llevada por el plásmido) y Km (para la cepa LP 3013) o Sm, Spc y Km (para la cepa LP 3017) (Figura VI.5). Las cepas complementadas fueron crecidas en cajas YEM-agar adicionadas con X-P o X-gal para chequear la orientación del gen y la funcionalidad de su propio promotor. Así, como era de esperar, los repiques en X-P dieron coloración azul (dada por el gen *phoA*, Figura VI.4) mientras los repiques en X-gal no dieron coloración.

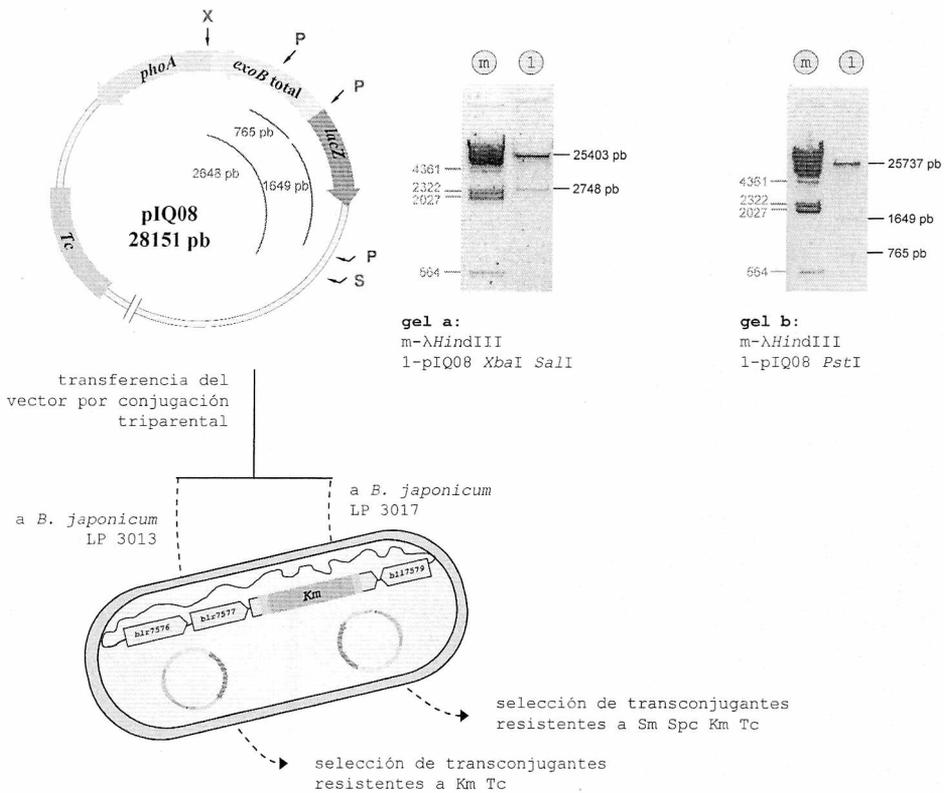


Figura VI.5 Chequeo e introducción del plásmido pIQ08 a las cepas LP 3013 y LP 3017. Los geles muestran digestiones del plásmido pIQ08 aislado de cultivos de *B. japonicum*.

A la izquierda de los geles se muestra el ADN del fago λ digerido con *HindIII* y a la derecha el peso molecular de los fragmentos de interés.

Enzimas de restricción: P: *PstI*, S: *Sall*, X: *XbaI*.

En todos los casos, las cepas mutantes complementadas, a diferencia de las parentales, presentaron color blanquecino y apariencia mucóide en cajas YEM-agar, confirmando indirectamente la expresión del gen *exoB* llevado por el plásmido. En este sentido, el plásmido pCB303 sin el inserto también fue introducido en la cepa mutante LP 3013 y en $\Delta P22$ y en ninguno de los casos se observó cambio de color ni cambios en la morfología de las colonias (datos no mostrados).

La identidad de las cepas se corroboró también por PCR con cebadores BoxAR-1 para obtener la huella digital de ADN (fingerprint) para chequear que los transconjugantes seleccionados no provinieran de una posible contaminación, no encontrándose diferencias en el bandeo entre las cepas salvajes y mutantes (datos no mostrados).

V.3 Los EPS de las cepas LP 3013 y LP 3017 no presentan galactosa en su estructura y los perfiles de sus LPS son similares al de la cepa salvaje

Con el objetivo de caracterizar los EPS producidos por las cepas mutantes construidas, las mismas se crecieron en el medio de Götz manitol hasta fase exponencial (7 días) y se analizó por HPAEC el EPS liberado al sobrenadante. En la Figura VI.6 se muestran los cromatogramas de los azúcares neutros y ácidos de las cepas USDA 110, LP 3013 y LP 3017. Allí puede observarse que las cepas mutantes en el gen *exoB* no son capaces de agregar galactosa en su EPS (Figura VI.6 B y C), similarmente a lo que ocurrió en $\Delta P22$ (véase Figura III.4 B del capítulo III). En paralelo, como ya se había demostrado, la doble mutante LP 3017 además fue incapaz de agregar ácido galacturónico (véase Figura V.6 del Capítulo V).

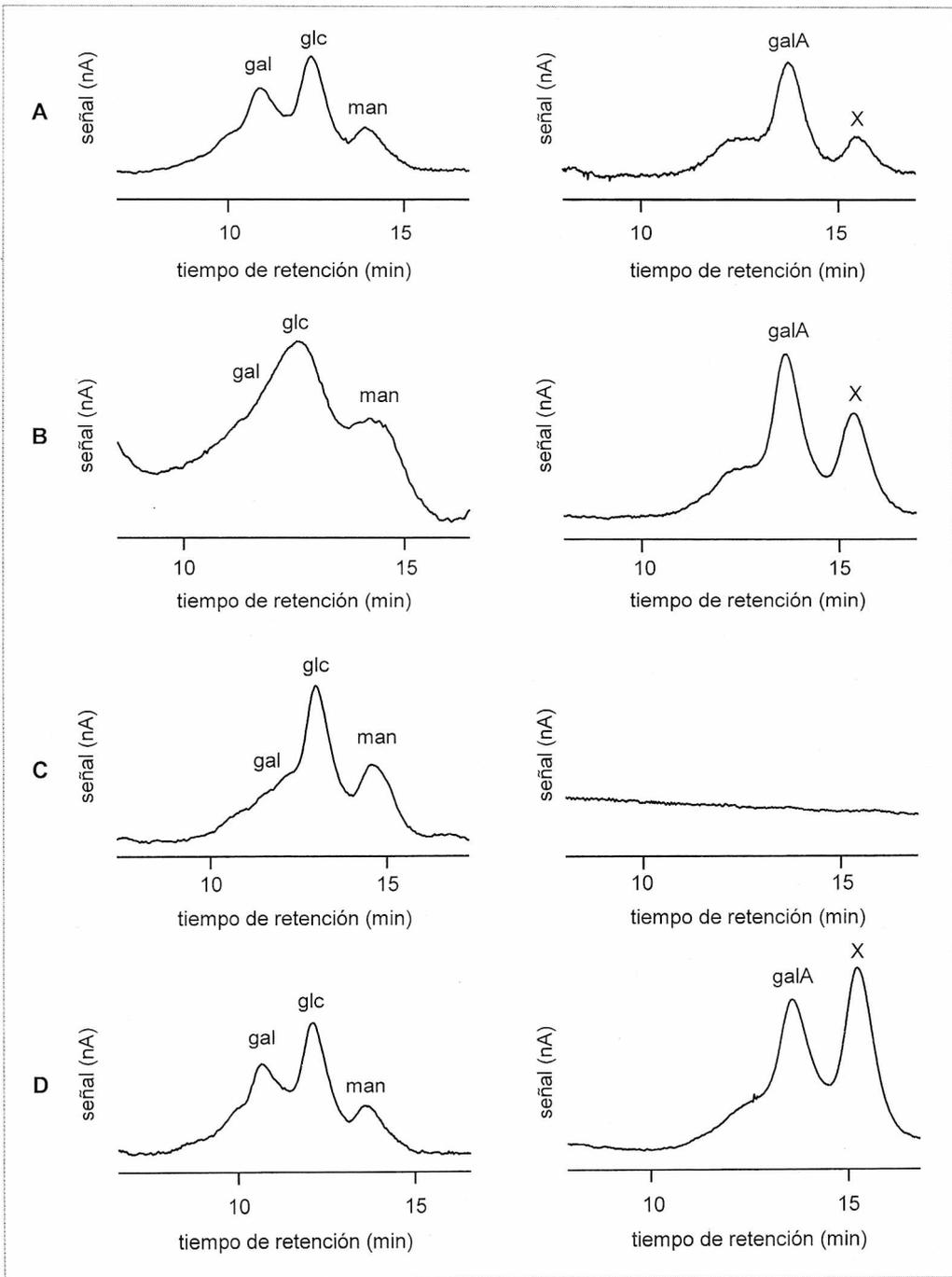


Figura VI.6 Perfiles cromatográficos de EPS purificados de *B. japonicum* hidrolizados con ácido trifluoroacético en condiciones neutras (paneles izquierdos) y ácidas (paneles derechos) A: USDA 110, B: LP 3013, C: LP 3017, D: LP 3013 complementada.

gal: galactosa, glc: glucosa, man: manosa, galA: ácido galacturónico.

Sin embargo, los primeros análisis de los cromatogramas de la mutante LP 3013 mostraron una amplia señal a tiempos de retención similares a galactosa, mientras las señales de glucosa y manosa fueron muy pobres (no mostrado). Esta señal amplia fue desplazada hacia glucosa cuando los EPS fueron tratados previamente con metóxido de sodio (y esto ocurrió sólo en el mutante LP 3013), lo que indicó que la señal amplia a tiempos similares a galactosa era glucosa acetilada. En estos ensayos de EPS tratados con metóxido de sodio, se evaluaron los EPS de la cepa salvaje y controles con galactosa libre, no observándose en ninguno de estos casos desplazamientos que indiquen acetilaciones. Las acetilaciones y/o metilaciones en la estructura de los EPS hasta ahora fueron reportadas para los azúcares galactosa y ácido galacturónico (Mort y Bauer, 1980) pero nunca en residuos de glucosa (lo que sí sucede en los EPSI y EPSII de *S. meliloti*). El hecho de encontrar glucosa acetilada en la cepa mutante LP 3013 tal vez se deba a que al no poder incluir galactosa en la estructura del EPS, la enzima transferasa responsable de agregar los grupos acetilo coloque este residuo sobre la glucosa.

La cepa LP 3013 complementada con el gen *exoB* presentó una composición similar a la cepa salvaje, sin presentar acetilaciones (Figura VI.6, B). Cabe destacar aquí que en LP 3013, el gen *exoT* que se ubica río arriba del gen *exoB* es funcional y podría estar codificando para la enzima responsable de estas acetilaciones. Dicho gen no está presente en la cepa $\Delta P22$ y quizá sea por ello que esta mutante no presente este fenotipo.

Por otro lado, el EPS sintetizado por la cepa doble mutante LP 3017 no presentó estas acetilaciones características y mostró el doble de manosa que la cepa salvaje, quizá

reemplazando esta hexosa por la imposibilidad de colocar galactosa y/o ácido galacturónico (Figura VI.6, C).

En condiciones ácidas, la presencia de una segunda señal a tiempos de retención mayores que el ácido galacturónico (aproximadamente 15,5 minutos), se visualizaron en los EPS de las cepas LP 3013 (menor que la del ácido galacturónico, Figura VI.6, B) y la cepa LP 3013 complementada con el gen *exoB* (en este caso mayor que la señal de ácido galacturónico, Figura VI.6, D).

Nosotros no pudimos determinar de qué se trataba esta señal, que fue inmutable al tratamiento con metóxido. Sin embargo, en algunas oportunidades, pudimos observar esta misma señal en los EPS de las cepas USDA 110 (como lo muestra la Figura VI.6, A) y $\Delta P22$, por lo que se trataría de ácido galacturónico modificado, tal vez metilado.

En paralelo con la determinación de los azúcares constituyentes del EPS de estas cepas, también aislamos y determinamos el perfil de bandas del LPS para confirmar que la delección del gen *exoB* no influyera en este polisacárido. En ninguno de los casos pudimos observar diferencias en cuanto al patrón del bandeo de los LPS en geles de poliacrilamida (Figura VI.7). Esto era esperable, ya que, como dijimos, el LPS de *B. japonicum* no presenta galactosa ni ácidos urónicos en su estructura (Carrion *et al.*, 1990).

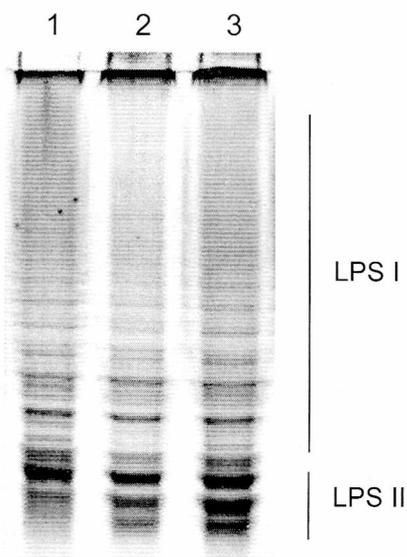


Figura VI.7 SDS-PAGE de LPS obtenidos de cultivos líquidos de *B. japonicum* USDA 110 (calle 1), LP 3013 (calle 2) y LP 3017 (calle 3).

Cuando se seleccionaron las colonias transconjugantes en cajas YEM-agar suplementadas con rojo congo, se observó que tanto la cepa LP 3013 como LP 3017 fueron de coloración rojiza y no mucosas (“secas”) en relación con la cepa salvaje USDA 110 y la mutante LP 3010 (Capítulo V). Posteriores repiques corroboraron este fenotipo, similar al observado en la $\Delta P22$ (Figura VI.8). Cuando a estas cepas “secas” se les incorporó el plásmido PCB303 llevando el gen *exoB* completo, las colonias revirtieron el fenotipo mucoso (datos no mostrados).

Las cantidades de EPS sintetizadas por los mutantes LP 3013 y LP 3017 crecidas en el medio de Götz y cosechados en fase exponencial (7 días) fueron significativamente menores con respecto a la cepa salvaje (Figura V.9).

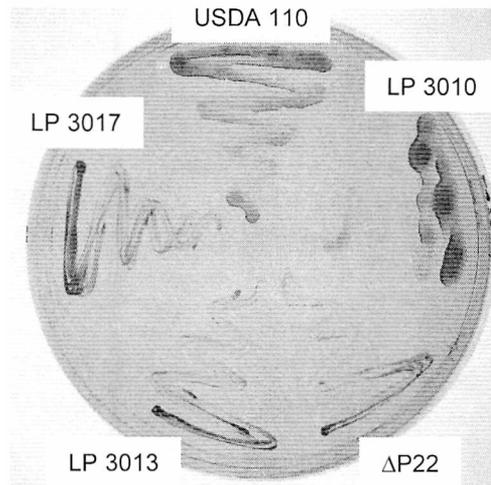


Figura VI.8 Caja YEM-agar suplementada con rojo congo, donde se muestra el fenotipo mucoso de las cepas USDA 110 y LP3010 en comparación con el fenotipo “seco” de las mutantes LP 3013, LP 3017 y $\Delta P22$ dado por la ausencia de galactosa en su EPS.

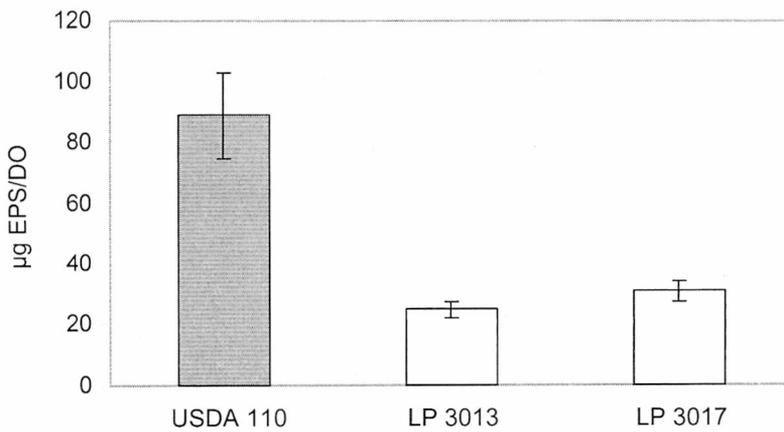


Figura VI.9 Producción de EPS de *B. japonicum* USDA 110 (barra gris) y los mutantes (barras blancas) en fase exponencial (7 días) en el medio de Götz. Las barras de error representan el

V.4 Las cepas LP 3013 y LP 3017 son incapaces de formar biofilms como la cepa salvaje

Generalmente, aquellos rizobios que forman escasas cantidades de EPS o son incapaces de sintetizarlo, no forman biofilms (Fujishige *et al.*, 2004). Sin embargo, como hemos observado en el Capítulo V, no siempre una escasa cantidad de EPS implica una merma en la capacidad de formar biofilms, a juzgar por el método desarrollado por Hirsch y colaboradores que utilizamos nosotros y que se detalla en Materiales y Métodos. En este sentido, decidimos cuantificar la cantidad de biofilm a lo largo de 23 días de crecimiento en el medio de Götz con manitol como única fuente de C de nuestras mutantes LP 3013 y LP 3017 debido a la escasa cantidad de EPS sintetizado por ellas en relación con la salvaje (véase Figura VI.9).

En estos experimentos, se utilizó la cepa USDA 110 como control positivo (véase Figura VI.9 del Capítulo IV) y como controles negativos se utilizaron la cepa $\Delta P22$ (Pérez Giménez *et al.*, enviado) y el medio de crecimiento sin adición de bacterias. Estos ensayos se repitieron en tres oportunidades diferentes, dando resultados similares. En la Figura VI.10 se grafica uno de ellos en el que se observa claramente que las cepas LP 3013 y LP 3017 fueron incapaces de formar biofilms, al igual que la cepa $\Delta P22$ usada como control negativo.

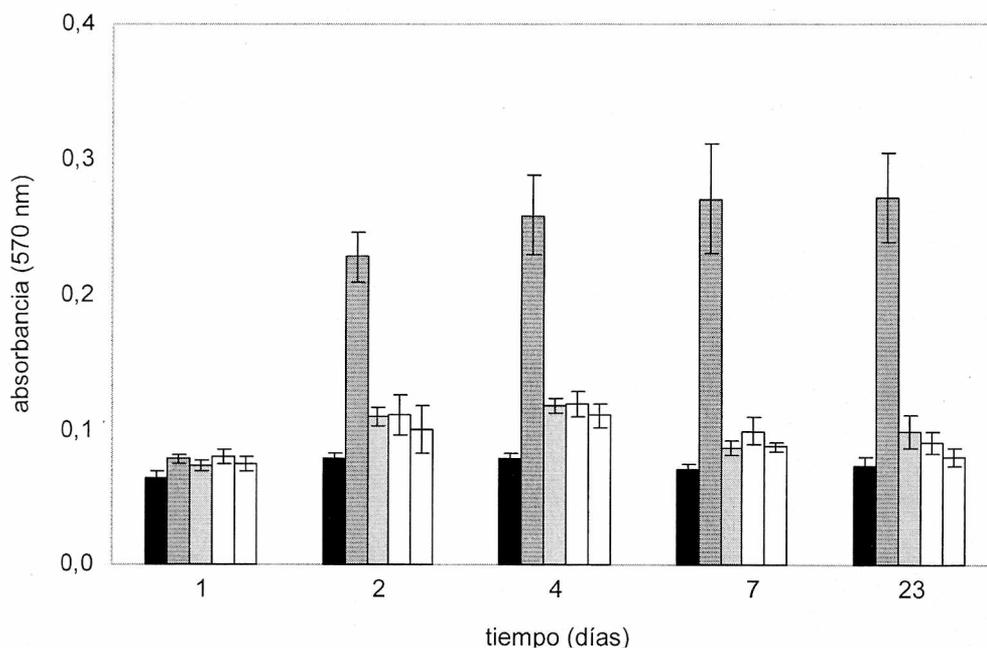


Figura VI.10 Producción de biofilms en función del tiempo por las cepas de *B. japonicum* USDA 110 (barras grises oscuras), $\Delta P22$ (barras grises claras), LP 3013 y LP 3017 (en ese orden, barras blancas) crecidas en el medio de Götzt con manitol como única fuente de C. Las barras negras representan el mismo medio de Götzt sin adición de bacterias. Las barras de error representan el desvío estándar.

V.5 La mutación del gen *exoB* induce un fenotipo Nod⁺ Fix⁻ en plantas de soja

Hasta aquí, el fenotipo de las cepas LP 3013 y LP 3017, (mutante en el gen *exoB*, y doble mutante *galA exoB*) se mostraron similares al observado en $\Delta P22$ por Parniske *et al.* (1993). Sin embargo, cuando suspensiones de estos rizobios se inocularon en plantines de soja para realizar estudios de nodulación, al cabo de 39 días en invernáculo, las plantas externamente se vieron amarillentas, similares a los controles sin inocular (Figura VI.11).

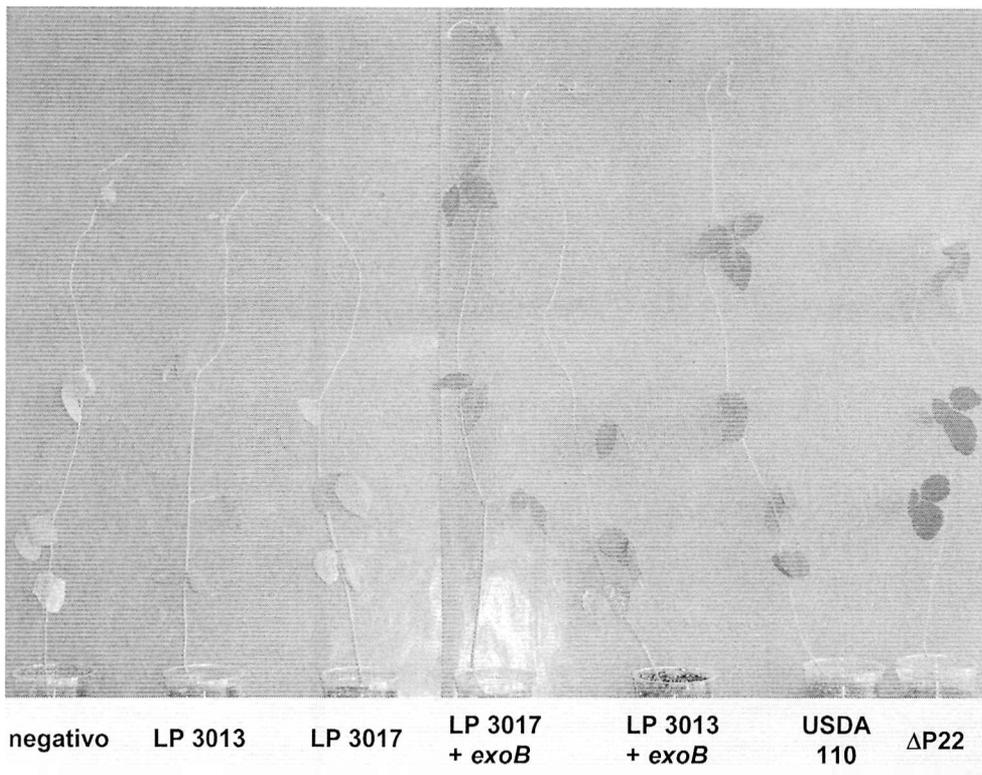


Figura VI.11 Fotografía de plantas de soja (*G. max*) de 39 días inoculadas con solución de Fåhraeus (negativo) o con suspensiones bacterianas (del orden de 10^8 bacterias planta⁻¹) de las cepas que se listan debajo de cada una de las plantas.

Por otro lado, las plantas inoculadas con las cepas LP 3013 y LP 3017 complementadas con el plásmido pIQ08 llevando el gen *exoB* completo (véase Figura VI.5), se vieron verdes, similares a las plantas inoculadas con la cepa salvaje (Figura VI.11). Estas inoculaciones se llevaron a cabo agregando 1 ml de cultivo en fase exponencial tardía (10 días) directamente sobre las raíces (10^8 bacterias planta⁻¹).

La parte aérea de las plantas (4 por condición), se secó y se determinó la biomasa a través del peso seco. Los resultados se muestran en la Figura VI.12, donde puede observarse que, por un lado, el peso seco de las plantas inoculadas con las mutantes LP 3013 y LP 3017 fueron similares al control sin inocular, y por otro, aquellas plantas

inoculadas con USDA 110, $\Delta P22$ y las mutantes complementadas tuvieron un incremento significativo de su biomasa, especialmente las plantas inoculadas con la cepa LP 3013 complementada. Estos ensayos se repitieron en dos oportunidades, dando resultados similares.

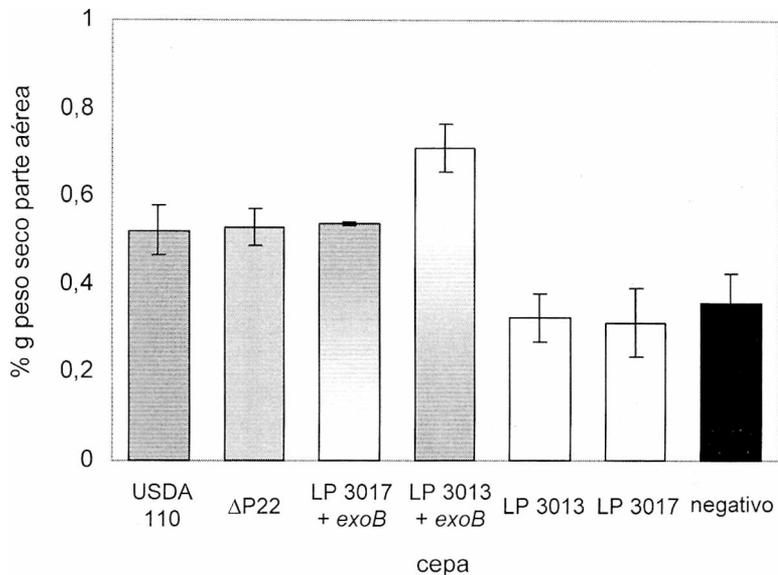


Figura VI.12 Peso seco de la parte aérea de plantas de soja con 39 días inoculadas con USDA 110 (barra gris oscuro), mutantes en *exoB* (barra gris claro y barras blancas y grises), mutantes complementados (barras blancas) y control negativo inoculado con solución de Fåhreaus (barra negra). Cada barra representa la media de 6 plantas y la barra de error, su correspondiente desvío estándar.

Es importante señalar también que ambas cepas complementadas lograron infectar y desarrollar nódulos fijadores similares a los de la cepa salvaje en plantas de *G. soja* (Figura V.13).

El color amarillo de las hojas sumado a la menor biomasa presentada por las plantas inoculadas con las cepas LP 3013 y LP 3017 se debió a que presentaron gran cantidad de pequeños nódulos (pseudonódulos) de color blanquecino-amarillento, sin

ornamentaciones externas, aparentemente no invadidos y situados sobre las raíces secundarias (Figura VI.13).

Una vez cosechados, los nódulos fueron dispuestos en placas multipocillo de manera individual, se esterilizaron superficialmente y se homogeneizaron para liberar su contenido y así determinar en base a su resistencia a antibióticos, la identidad de las cepas en cajas YEM-agar.

Aquellos nódulos blanquecinos inducidos por las plantas inoculadas con las cepas LP 3013 y LP 3017 no mostraron crecimiento alguno tanto en ausencia como en presencia de antibióticos, mientras que los nódulos recuperados de las plantas invadidas por la cepa salvaje, $\Delta P22$, o las mutantes complementadas, mostraron crecimiento a los 5-6 días, recuperando así la cepa inoculada y no existiendo eventos de contaminación cruzada. Las plantas inoculadas con solución de Fåhraeus (controles negativos) no nodularon.

V.6 Las cepas LP 3013 y LP 3017 muestran el mismo fenotipo en otras variedades de *G. max* y también en *G. soja*

Los ensayos de nodulación se repitieron en otras variedades de soja e inclusive en otra especie para determinar si la mutación en el gen *exoB* mostraba fenotipos similares. Se testearon variedades de *G. max* Don Mario 3100, Don Mario 4600 y A7321RG y también plantas de *G. soja* variedad PI 339871A. Las semillas germinadas fueron inoculadas con suspensiones del orden de 10^7 bacterias planta⁻¹. Las plantas fueron cosechadas luego de 28 días en invernáculo. En ninguno de los casos, las plantas de

soja inoculadas con las cepas mutantes mostraron nódulos rojizos, sino por el contrario, fueron pequeños, blanquecinos y localizados en las axilas entre la raíz principal y las raíces laterales. Los controles positivos, esto es, plantas inoculadas con USDA 110 o $\Delta P22$, mostraron nódulos grandes, rojizos y situados mayoritariamente en las raíces principales (Parniske *et al.*, 1993). Los mutantes LP 3013 y LP 3017 complementados con el gen *exoB* completo llevado por el plásmido pIQ08 (véase Figura VI.5) fueron capaces de inducir nódulos rojizos y fijadores similares a la cepa salvaje en cuanto a la forma externa y número de nódulos por planta. El interior de los nódulos, liberado por homogeneización de los mismos, mostró crecimiento en los antibióticos respectivos para las cepas USDA 110, $\Delta P22$ y las mutantes complementadas, mientras que no hubo crecimiento para las cepas LP 3013 y LP 3017. A continuación, en la Figura VI.13 se muestran nódulos inducidos por USDA 110 (A),

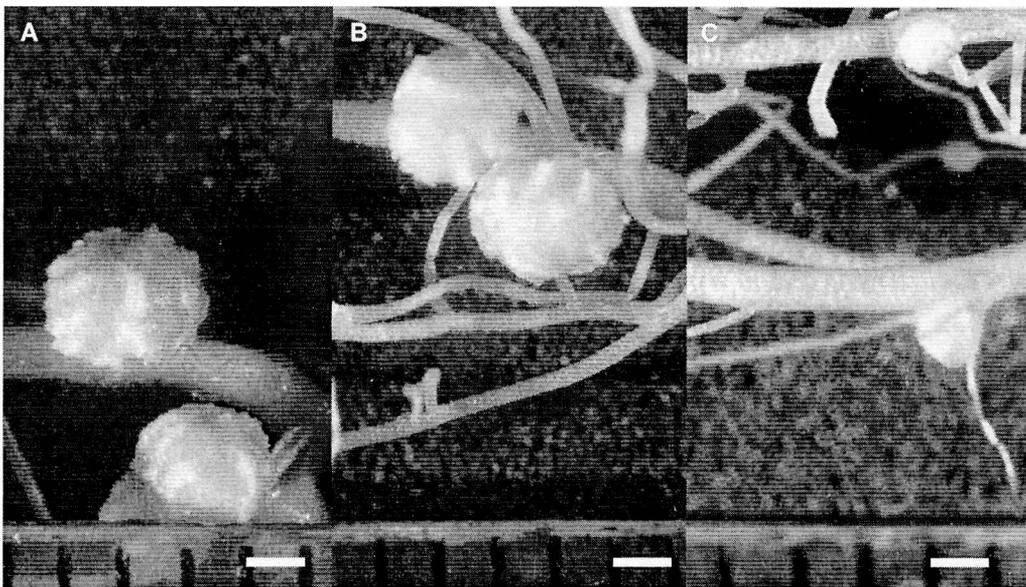


Figura VI.13 Fotografía tomada con lupa donde se muestran nódulos rojizos invadidos por USDA 110 (A) y LP3013 complementada (B) y nódulos blanquecinos inducidos por LP 3013 (C) y. La barra blanca a la derecha y abajo indica 1 milímetro.

LP 3013 complementada llevando el plásmido con el gen *exoB* (B) y LP 3013 (C) en *G. soja*. El mismo fenotipo se observó en plantas de *G. max* (no mostrado).

V.7 La adición de EPS salvaje a los cultivos de las cepas LP 3013 previo a su inoculación en plantas de soja no restaura el fenotipo Fix⁺

La reversión del fenotipo Fix⁻ por las cepas LP3013 y LP 3017 complementadas con el gen *exoB* completo nos llevó a preguntarnos si también era posible revertirlo por la adición de EPS de manera exógena. Así, se agregó EPS purificado de USDA 110 o ΔP22 a un mililitro de cultivo de LP 3013 en dos tiempos diferentes previo a su inoculación en plantas de soja: 4 horas antes e inmediatamente antes de la inoculación. La cantidad añadida de EPS fue de 50 μg.ml cultivo⁻¹.planta⁻¹ (Djordjevic *et al.*, 1987). En paralelo, se inocularon los correspondientes controles positivos con USDA 110 o ΔP22 y negativos con LP 3013 o solución de Fåhraeus. Posteriormente, se dejaron crecer las plantas en invernáculo durante 35 días.

Las plantas inoculadas con la cepa mutante LP 3013 y con LP 3013 + EPS salvaje se vieron amarillas, similares al control sin inocular, mientras que las inoculadas con USDA 110 y ΔP22 se vieron verdes. Sin embargo, las plantas inoculadas con LP 3013 + EPS salvaje presentaron regularmente un nódulo grande y amorfo por planta en la raíz principal sumado a numerosos nódulos blanquecinos en raíces secundarias. Todos ellos fueron homogeneizados y crecidos en cajas YEM-agar con sus respectivos antibióticos y, mientras el contenido de los nódulos blanquecinos no mostró crecimiento, el de los nódulos rojizos sí lo hizo, presentando las colonias el fenotipo

“seco” característico de la cepa mutante. Estas colonias, crecidas en kanamicina, fueron repicadas durante dos ciclos y posteriormente se realizó una PCR específica constatando la identidad de la cepa LP 3013.

Así, la adición exógena de 100 µg de EPS salvaje en el inóculo de la cepa mutante, logró que la misma fuera capaz de infectar al menos un nódulo por planta, pero no fue suficiente para fijar una cantidad significativa de N₂.

V.8 Microestructura de los nódulos de *G. max* inducidos por las cepas LP 3013 y LP 3017

Los nódulos blanquecinos y vacíos de bacterias inducidos por las cepas LP 3013 y LP 3017 en *G. max* fueron seccionados longitudinalmente para corroborar que no hubieran células vegetales infectadas por rizobios. En la Figura VI.14 se muestran cortes de los mismos observados al microscopio óptico en donde puede observarse que tanto la cepa LP 3013 como LP 3017 fueron incapaces de invadir la estructura pseudonodular formada en las raíces de las plantas (Figura VI.14 B y C). Esta morfología histológica es similar a las formadas en otras interacciones rizobio-leguminosas en donde se inoculan las plantas con mutantes defectivos en EPS o LPS, como *Rhizobium sp.* NGR 234 en *Leucaena leucocephala* (Djordjevic *et al.*, 1987; Gray *et al.*, 2001), *B. japonicum* ΔP22 en *G. soja* (Parniske *et al.*, 1994), *B. japonicum* EH3 en *G. max* (Parniske *et al.*, 1998) y *R. leguminosarum* en *Vicia sativa* subesp. *nigra* (Laus *et al.*, 2004). Si bien los nódulos de las plantas inoculadas con las cepas mutantes LP 3013 y LP 3017 son evidentes, el proceso de crecimiento y diferenciación de los mismos son

detenidos en etapas tempranas de la interacción, debido a que en los cortes histológicos no se observan estructuras vasculares asociadas ni tampoco ningún

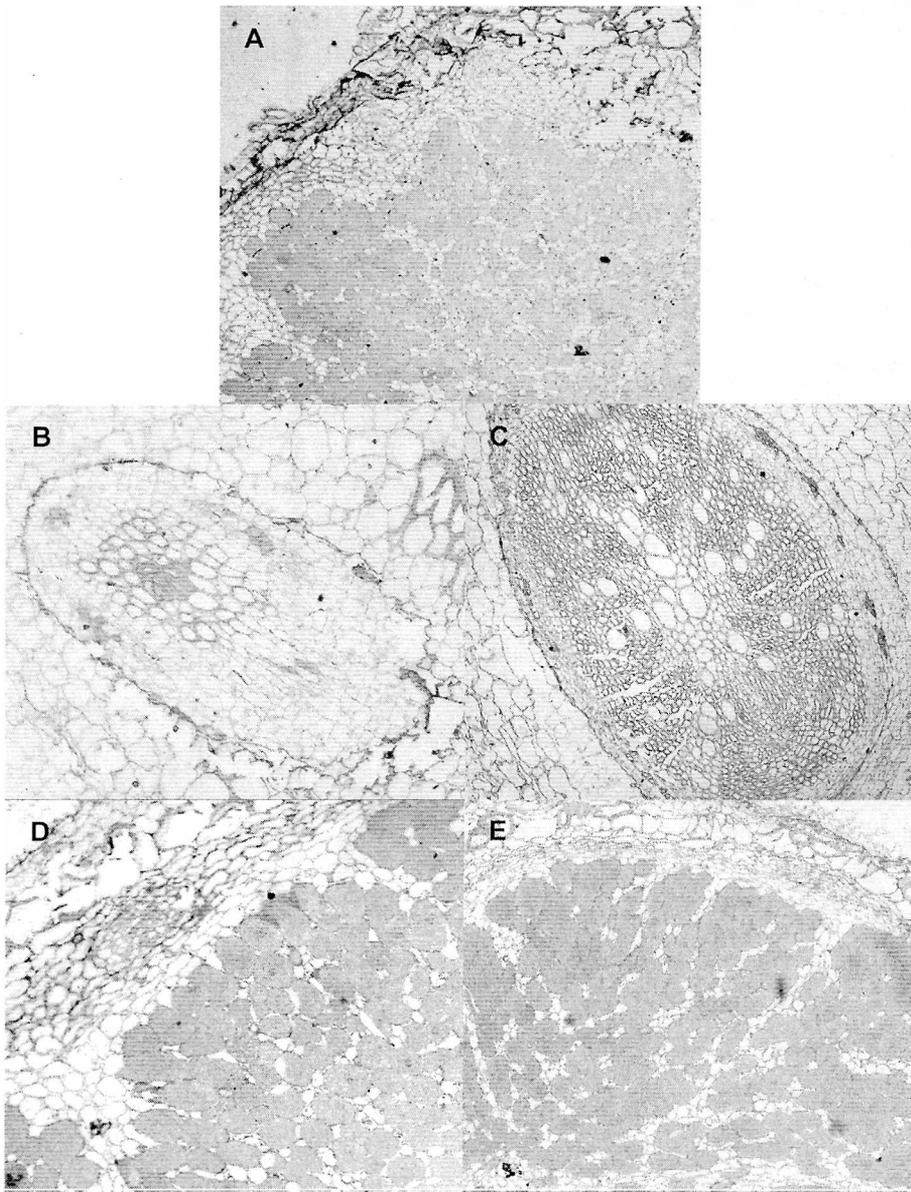


Figura VI.14 Microfotografías de cortes transversales (A, D y E) y longitudinales (B y C) de nódulos de *G. max* inducidos por las cepas USDA 110 (A), LP 3013 (B), LP 3017 (C), LP 3013 complementada (D) y LP 3017 complementada (E). Las imágenes fueron tomadas con 100 aumentos.

indicio de hilos de infección, ni siquiera abortivos. La formación de nódulos vacíos indica que la infección se bloquea en etapas tempranas de la simbiosis (Parveen *et al.*, 1997) por lo que la inactivación del gen *exoB* podría tener efectos sobre las etapas de adhesión y/o colonización a raíces de soja, pero esta hipótesis se mantiene en terreno especulativo, si bien ensayos preliminares indicarían que es la etapa de adhesión a raíces de soja la que está seriamente alterada.

Resumen

Las cepas mutantes LP 3013 y LP 3017, al igual que $\Delta P22$, son incapaces de agregar galactosa a su EPS, pero a diferencia de esta última, la mutación se restringe sólo al gen *exoB*.

Esta alteración causa grandes disturbios en las propiedades de estas cepas de *B. japonicum* tanto en vida libre como simbiótica, incluyendo la escasa síntesis de EPS liberado al medio de cultivo en cultivos con manitol como única fuente de C, la acetilación en los residuos de glucosa puesta de manifiesto por los análisis con HPAEC, la escasa o nula formación de biofilms en superficies de poliestireno y la incapacidad de invadir e infectar raíces de *G. max* y *G. soja*. En este sentido, este trabajo aporta evidencia que se suma a los escasos estudios en los que se documentaron mutantes defectivos en la síntesis de EPS o CPS con alteraciones en la capacidad de fijación de N₂ en plantas que forman nódulos determinados (Djordjevic *et al.*, 1987; Eggleston *et al.*, 1996; Parveen *et al.*, 1997; Parniske *et al.*, 1998).

Referencias Bibliográficas

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcondeguy, T., R. Jack y M. Merrick. 2001. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 80-105.
- Allaway, D., E. M. Lodwig, L. A. Crompton, M. Wood, R. Parsons, T. R. Wheeler y P. S. Poole. 2000. Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* **36**: 508-15.
- Andersson SG, Zomorodipour A, Andersson JO, Sicheritz-Ponten T, Alsmark UC, Podowski RM, Naslund AK, Eriksson AS, Winkler HH, Kurland CG. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**:133-140.
- Appleby CA. 1984. Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annu Rev Plant Physiol* **35**:443-478
- Ausmees, N., K. Jacobsson y M. Lindberg. 2001. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiol.* **147**: 549-559.
- Banfalvi, Z., A. Nieuwkoop, M. Schell, L. Besl, y G. Stacey. 1988. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 420-424.
- Barbour, W. M., D. R. Hatterman y G. Stacey. 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2635-2639.
- Becker, B. U., K. Kosch, M. Parniske y P. Müller. 1998. Exopolysaccharide (EPS) síntesis in *Bradyrhizobium japonicum*: sequence, operon structure and mutational analysis of an *exo* gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 161-71.
- Becker, A. y A. Pühler. 1998. Production of Exopolysaccharides. En: *The Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas (Eds.), pp 97-118. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bender, R. A., K. A. Janssen, A. D. Resnick, M. Blumemberg, F. Foor y B. Magasanik 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **129**: 1001-1009.
- Bhagwat, A. A., K. C. Gross, R. E. Tully y D. L. Keister. 1996. Beta-glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing beta-(1-6) linkages. *J. Bacteriol.* **178**: 4635-42.
- Bhattacharya D, Medlin L. 1995. The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J Phycol.* **31**:489-498.
- Bhuvaneswari, T. V., S. Pueppke y W. D. Bauer. 1977. Role of lectins in plant-microorganism interactions. *Plant Physiol.* **60**: 486-491.
- Bhuvaneswari, T. V., B. G. Turgeon y W. D. Bauer. 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum* I. Localization of infective root cells. *Plant Physiol.* **66**: 1027-1031.

- Bhuvanewari, B. V., K. K. Mills, D. K. Crist, W. R. Evans, y W. D. Bauer. 1983. Effects of culture age on symbiotic infectivity of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **153**: 443-451.
- Bianciotto, V, S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante y S. Perotto. 2001. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. Eur J Histochem. **45**: 39-49.
- Blume, H., H. Beier y H. J. Gross. 1987. An improved method for silver staining of polypeptides in polyacrilamide gels. Electrophoresis. **8**: 93-99.
- Boiardi, J. L., N. Moreni y M. L. Galar. 1988. Survival and infectivity of a *Rhizobium meliloti* strain maintained in water and buffer suspensions. J. Appl. Bacteriol. **65**:189-193.
- Boogerdt, F. C. y D. van Rossum. 1997. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. FEMS Microbiol. Rev. **21**: 5-27.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248-254.
- Bravo, A. y J. Mora. 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate pathway. J. Bacteriol. **170**: 980-984
- Breedveld, M. W. y K. J. Miller. 1994. Cyclic β -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. Microbiol. Rev. **58**: 145-161.
- Brelles Mariño, G. y J. L. Boiardi. 1996. Nitrogen limitation of chemostat-grown *Rhizobium etli* elicits higher infection-thread formation in *Phaseolus vulgaris*. Microbiology **142**: 1067-1070.
- Broughton, W. J., S. Jabbouri y X. Perret. 2000. Keys to symbiotic harmony. J. Bacteriol. **182**: 5641-5652.
- Broughton, W. J. 2003. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae*. J. Bacteriol. **185**: 2975-2979.
- Caetano-Anollés, G. 1985. La Asociación Simbiótica de Rizobios y Leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Caetano-Anollés, G. y G. Favelukes. 1986a. Quantitation of adsorption of Rhizobia in low numbers to small legume roots. Appl. Environ. Microbiol. **52**: 371-376.
- Caetano-Anollés, G., D. K. Crist Estes y W. D. Bauer. 1988. Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. J. Bacteriol. **170**: 3164-3169.
- Caetano Anollés G., A. Lagares y G. Favelukes. 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: dependence on divalent cations and pH. Plant Soil. **117**: 67-74.
- Caetano-Anollés, G. y P. M. Gresshoff. 1991a. Alfalfa controls nodulation during the onset of *rhizobium*-induced cortical cell division. Plant Physiol. **95**: 366-373.
- Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff. 1991b. Plant genetic control of nodulation. Ann. Rev. Microbiol. **45**: 345-382
- Caetano-Anollés, G., E. Wrobel-Boerner, y W. D. Bauer. 1992. Growth and movement of spot inoculated *Rhizobium meliloti* on the root surface of alfalfa. Plant Physiol. **98**: 1181-1189.

- Cardenas L., T. L. Holdaway-Clarke, F. Sanchez, C. Quinto, J. A. Feijo, J. G. Kunkel y P. K. Hepler. 2000. Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant. Physiol.* **123**: 443-452.
- Cardenas L., J. E. Thomas-Oates, N. Nava, I. M. Lopez-Lara, P. K. Hepler y C. Quinto. 2003. The role of nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 326-34.
- Carlson, T. A., G. B. Martin, y B. K. Chelm. 1987. Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **169**: 5861-5866.
- Cebolla A. y A. J. Palomares. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Microbiologia.* **10**: 371-84.
- Cermola M., E. Fedorova, R. Tate, A. Riccio, R. Favre y E. J. Patriarca. 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **13**: 733-741.
- Cevallos, M. A, S. Encarnacion, A. Leija, Y. Mora y J. Mora. 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **178**: 1646-1654.
- Cohn, J., R. B. Day y G. Stacey. 1998. Legume nodule organogenesis. *Trends Plant Sci.* **3**: 105-110.
- Crist, D. K., R. E. Wyza y K. K. Mills. 1984. Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 895-900.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., y J. J. Bono. 2001. Perception of lipo-chitooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* **6**: 24-30.
- Chen, R., A. A. Bhagwat y D. L. Keister. 2003. A motility revertant of the *nodB* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Curr. Microbiol.* **47**: 431-3.
- Chiurazzi, M., R. Meza, M. Lara, A. Lahm, R. Defez, M. Iaccarino y G. Espin. 1992. The *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. *Gene.* **119** (1):1-8.
- Dardanelli, M., J. Angelini y A. Fabra. 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Can J Microbiol.* **49**: 399-405.
- Darrow, R. A. y R. R. Knotts 1977. two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **78**: 554-559.
- Dazzo, F. B. y G. Truchet. 1983. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium-legume* symbiosis. *J. Membr. Biol.* **73**: 1-16.
- de Bruijn F. J., S. Rossbach, M. Schneider, P. Ratet, S. Messmer, W. W. Szeto, F. M. Ausubel y J. Schell. 1989. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **171**: 1673-1682.
- Dénarié, J., F. Debellé y C. Rosenberg. 1992. Signalling and host range in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 497-525.

- Dénarié, J y J. Cullimore. 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**: 951-954.
- Denton, M. D., Coventry, D. R., Bellotti, W. D., and Howieson, J. G. 2000. Distribution, abundance and symbiotic effectiveness of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* from alkaline pasture soils in South Australia. *Aust. J. Exp. Agric.*, **40**, 25-35.
- Díaz, C. L. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. PhD Thesis. Leiden University, The Netherlands.
- Díaz, C. L., L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg y J. W. Kijne. 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Nature*. **338**: 579-581.
- Díaz-Marrero A. R., M. Santamaría, Poveda A., J. Jiménez Barbero y J. Corzo. 1998. Electroforetic behavior and size distribution of the acidic polysaccharides produced by the bacteria *Bradyrhizobium* (*Chamaecytisus*) strain BGA-1 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Electrophoresis*. **19**: 2621-2624.
- Dockendorff, T. C., J. Sanjuan, P. Grob, y G. Stacey. 1994. NolA represses *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:596-602.
- Dowling, D. N., and Broughton, W. J. 1986. Competition for nodulation of legumes. *Annu. Rev. Microbiol.*, **40**, 131-157.
- Downie J. A. 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Curr Biol.* **15**(6):R196-8.
- Dusha, I., A. Bakos, A. Kondorosi, F. de Bruijn y J. Schell. 1989. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated. Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on Alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genetics.* **219**: 89-96.
- Dusha, I. y A. Kondorosi. 1993. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet.* **240**: 435-44.
- Dusha, I. 2002. Nitrogen control of bacterial signal production in *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Indian. J. Exp. Biol.* **40**: 981-988.
- Evans, C. G. T., D. Herbest y D. W. Tempest. 1970. *Methods in Microbiology.* **2**: 275-327.
- Ewald, PW. 1987. Transmission modes and evolution of the parasitism-mutualism continuum. *Ann N Y Acad Sci.* **503**:295-306.
- Fåhraeus, G. 1957. The infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 374-381.
- Fell, D. 1997. *Understanding the control of metabolism.* Portland Press, London, Inglaterra.
- Felle, H. H., A. Kondorosi, E. Kondorosi y M. Schultze. 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant J.* **7**: 939-947.
- Fischer, H. M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**: 352-386.

- Foucher F. y E. Kondorosi.** 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in *Medicago*. *Plant Mol Biol.* **43**: 773-86.
- Frayse, N. F., F. Couderc y V. Poinso.** 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1365-1380.
- Gage D. J. y W. Margolin.** 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 613-617.
- Goebel W. Y R. Gross.** 2001. Intracellular survival strategies of mutualistic and parasitic prokaryotes. *Trends Microbiol.* **9**: 267-273.
- Göttfert, M., D. Holsduser y H. Hennecke.** 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* **87**: 2680-2684.
- Göttfert M., D. Holzhauser, D. Bani y H. Hennecke.** 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **5**: 257-65.
- Götz, R., N. Limmer, K. Ober y R. Schmitt** 1982. Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 789-798.
- Greaves, M. P. y J. F. Darbyshire.** 1972. The ultrastructure of the mucilaginous layer on plant roots. *Soil Biol. Biochem.* **4**: 443-449.
- Green, L. S. y D. W. Emerich.** 1997. *Bradyrhizobium japonicum* does not require alpha-ketoglutarate dehydrogenase for growth on succinate or malate. *J. Bacteriol.* **179**: 194-201.
- Guirard, B. M. y E. E. Snell.** 1981. Biochemical factors in growth. En: *Manual of methods for general bacteriology.* Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.E. Krieg, and G. B. Phillips, eds. American Society for Microbiology. Washington, EEUU. pp 79-111.
- Gyorgyey, J., D. Vaubert, J. I. Jimenez-Zurdo, C. Charon, L. Troussard, A. Kondorosi y E. Kondorosi.** 2000. Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 62-71.
- Hablieb, C. M. y P. W. Luden.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* **130**: 1081-1084.
- Halverson, L.J. y G. Stacey.** 1986a. Effect of lectin on nodulation by wild-type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation defective mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 753-760.
- Halverson, L. J. y G. Stacey.** 1986b. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* **50**: 193-225.
- Hageman RV, Burris RH.** 1978. Dinitrogenase and nitrogenase reductase associate and dissociate with each catalytic cycle. *Proc Natl Acad Sci USA.* **75**: 2699-2702
- Harris J. M, R. Wais y S. R. Long.** 2003. Rhizobium-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **16**: 335-341.

- Heidstra, R., R. geurts, H. Franssen, H. P. Spalink, A. van Kammen y Bisseling, T. 1994. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**: 787-797.
- Heldt, H.W. 1997. *Plant Biochemistry and molecular Biology*. Oxford Univeristy Press. Oxford, Reino Unido.
- Hentschel, U., M. Steinert y J. Hacker. 2000. Common molecular mechanisms of symbiosis and pathogenesis. *Trends Microbiol.* **8**:226-231.
- Hernández, L. E., S. Perotto, N. J. Brewin y B. K Drobak. 1995. A novel inositol-lipid in plant-bacteria symbiosis. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 582S.
- Hilgert, U., J. Schell, y F. J. de Bruijn. 1987. Isolation and characterization of Tn5-induced NADPH-glutamate synthase (GOGAT⁻) mutants of *Azorhizobium sesbaniae* ORS571 and cloning of the corresponding *glt* locus. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 195-202.
- Hirsch, A. M. 1992. Tansley Review No. 40. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist.* **122**: 211-237.
- Hirsch, A. M. 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 320-326.
- Hirsch, Ann M., M. R. Lum y J. A. Downie. 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. *Plant Physiology.* **127**: 1484-1492,
- Ho, S. C., J. L. Wang y M. Schindler. 1990. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. II. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin. *J. Cell. Biol.* **111**: 1639-1643.
- Hoch, J. A. y T. J. Silhavy. 1995. Two-component signal transduction. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- Horken, K. M. y F. R. Tabita. 1999. Closely related form I ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase molecules that possess different CO₂/O₂ substrate specificities. *Arch Biochem Biophys.* **361**: 183-94.
- Howitt, S. M., and P. M. Gresshoff. 1985. Ammonia regulation of glutamine synthetase in *Rhizobium* sp. ANU289. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1433-1440.
- Humbeck C., H. Thierfelder, P. M. Gresshoff y D. Werner. 1985. Competitive growth of slow growing *Rhizobium japonicum* against fast growing *Enterobacter* and *Pseudomonas* species at low concentrations of succinate and other substrates in dialysis culture. *Arch. Microbiol.* **142**: 223-228.
- Ielpi, L., T. Dylan, G. S. Ditta, D. R. Helinski y S. W. Stanfield. 1990. The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of β -(1,2)-glucan. *J. Biol. Chem.* **265**: 2843-2851.
- Jordan, D. C. 1984. The Rhizobiaceae. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (9th. edn.) Vol. 1. (eds J.G. Holt y N.R. Kreig), Willians y Wilkins, London pp. 24-43.
- Kaneko, T, Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T.

- Wada, M. Yamada, S. Tabata. 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA. Res. **9**: 189-197.
- Kannenberg, E. L., Reuhs, B. L., Forsberg, L. S. and Carlson, R. W. 1998. Lipopolysaccharides and K antigens: their structures, biosynthesis and functions. En: The *Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas (Eds.). pp 119-1154. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kape, R., M. Parniske y D. Werner. 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydrocinnamic acids and isoflavonoids. Appl. Environ. Microbiol. **57**: 316-319.
- Karr, D. B., R- T. Liang, B. L. Reuhs, y D. W. Emerich. 2000. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. Planta **211**: 218-226.
- Kashefi, K. y D. R. Lovley. 2003. Extending the upper temperature limit for life. Science. **301**: 934.
- Kiers ET, Rousseau RA, West SA, Denison RF. 2003. Host sanctions and the legume-rhizobium mutualism. Nature. 2003 Sep 4;425(6953):78-81.
- Kijne, J. W., G. Smit, C. L. Díaz y B. J. J. Lugtenberg. 1988. Lectin-enhanced accumulation of manganese-limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. J. Bacteriol. **170**: 2994-3000.
- Kijne, J. W. 1992. The *Rhizobium* infection process. pp. 349-398. En G. Stacey, R. Burris & H.J. Evans (eds). Biological nitrogen fixation. Chapman and hall, New York, USA.
- Kijne, J. W., M. A. Bauchrowitz y C. L. Diaz. 1997. Root lectins and rhizobia. Plant Physiol. **115**: 869-873.
- Kluepfel, D. A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. Ann. Rev. Phytopatol. **31**: 441-472.
- Kosslak, R. M, R. Bookland, J. Barker, H. E. Paaren y E. R. Applebaum. 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. **84**: 7428-7432.
- Krusell, L., L. H. Madsen, S. Sato, G. Aubert, A. Genua, K. Szczyglowski, G. Duc, T. Kaneko, S. Tabata, F. de Bruijn, E. Pajuelo, N. Sandal y J. Stougaard. 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. Nature. **420**: 422-426.
- Kundu, S., J. T. 3rd Trent y M. S. Hargrove. 2003. Plants, humans and hemoglobins. Trends. Plant. Sci. **8**: 387-393.
- Laemli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.
- Lagares, A. 1989. La asociación simbiótica rizobio-leguminosa: componentes superficiales bacterianos involucrados en las etapas tempranas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

- Lam, H. M., K. Coschigano, C. Schultz, R. Melo-Oliveira, G. Tjaden, I. Oliveira, N. Ngai, M. H. Hsieh y G. Coruzzi. 1995. Use of *Arabidopsis* mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. *Plant Cell*. **7**: 887-898.
- Law, J. H. y R. A. Slepecky. 1961. Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* **82**: 33-36.
- Lerogue, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J.C. Promé y J. Dénarié. 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature*. **344**: 781-784.
- Limpens, E. y T. Bisseling. 2003. Signaling in symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**: 343-350
- Lison, L. 1976. Estadística aplicada a la biología experimental. Eudeba Manuales. Bs As.
- Lodeiro, A. R. 1994. Fisiología de las interacciones tempranas planta-bacteria: asociación de rizobios y leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno. Tesis Doctoral. UNLP.
- Lodeiro, A. R., A. Lagares, E. N. Martínez, y G. Favelukes. 1995. Early Interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli and bean roots: specificity in the process of adsorption and its requeriment of Ca^{2+} and Mg^{+2} ions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1571-1579.
- Lodeiro A. R., A. Peticari y G. Favelukes. 1996. Efectos de la lectina y la harina de soja sobre la infectividad y competitividad de *Bradyrhizobium japonicum* para la nodulación. Memorias. XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. pp. 287-290
- Lodeiro, A. R. y G. Favelukes. 1999. Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 1405-1411.
- Lodeiro, A., S. López García, T. Vázquez, y G. Favelukes. 2000. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its treatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiol. Lett.*, **188**: 177-184.
- Lodeiro, A. R., S. L. López García, E. Mongiardini, J. I. Quelas y A. Peticari. 2003. "Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno". En: Microbiología agrícola: un aporte de la investigación argentina. Comité Editor: Albanesi A., Anriquez A., Luna S., Kunst C. y Ledesma R. Págs. 159-193. Editorial: Universidad Nacional de Santiago del Estero. ISBN: 987- 99083-5-X. Argentina. Julio 2003.
- Lodwig, E. M., A. H. Hosie, A. Bourdes, K. Findlay, D. Allaway, R. Karunakaran, J. A. Downie y P. S. Poole. 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*. **422**: 722-726.
- Lodwig, E. y P. Poole. 2003. Metabolism of rhizobium bacteroids. *Crit. Rev. Plant Sciences*. **22**: 37-78.
- Loh, J. T., S. C. Ho, A. W. de Feijter, J. L. Wang y M. Schindler. 1993. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*: unipolar localization of the lectin BJ38 on the bacterial cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 3033-3037.

- Loh, J., M. García, y G. Stacey. 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **179**: 3013-3020.
- Loh, J., M. G. Stacey, M. J. Sadowsky, y G. Stacey. 1999a. The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene encodes three functionally distinct proteins. J. Bacteriol. **181**: 1544-1554
- Loh, J., J. P. Y. Yuen; M. G. Stacey y G. Stacey. 1999b. Unique aspect of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Highlights of Nitrogen Fixation Research. Ed.: Martínez y Hernández. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pág. 115-120.
- Loh, J., J. P. Y. Yuen-Tsai, A. Welborn, y G. Stacey. 2001. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. Mol. Microbiol. **42**: 37-46.
- Loh, J., R. W. Carlson, W. S. York, y G. Stacey. 2002. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**: 14446-14451.
- Loh, J., D. Lohar, B. Andersen, y G. Stacey. 2002. A two-component regulator mediates population density dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. J. Bacteriol. **184**: 1759-1766
- Loh, J. y G. Stacey. 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. Appl. Environ. Microbiol. **69**: 10-17
- Lotan, R., H. W. Siegelman, H. Lis y N. Sharon. 1974. Subunit structure of soybean agglutinin. J Biol Chem. **249**: 1219-1224.
- Lucinski, R., W. Polcyn y L. Ratajczak. 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. Acta Biochimica Polonica. **49**: 537-546.
- Ludwig, R. A. 1978. Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32H1. J. Bacteriol. **135**:114-123.
- McRae, D. G., R. W. Miller, W. B. Berndt y K. Joy. 1989. Transport of C4-dicarboxylic and amino acids by *Rhizobium meliloti* bacteroids. Mol. Plant-Microbe Int. **2**: 273-278.
- Madison, L. L., y G. W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **63**: 21-53.
- Madsen, E. L. y M. Alexander. 1982. Transport of *Rhizobium* and *pseudomonas* through soil. Soil Sci. Soc. Am. J. **46**: 557-560.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., y Stougaard J. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. Nature. **425**: 637-640.
- Margulis, L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. 1975. Symp Soc Exp Biol. **29**:21-38.
- Martin W, Muller M. 1998. The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature. **392**:37-41.
- Martin, G. B., K. A. Chapman y B. K. Chelm. 1988. Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). J. Bacteriol. **170**: 5452-5459.

- Martínez-Drets, G., A. Gardiol y A. Arias.** 1977. 6-Phospho-D-gluconate: NAD⁺ 2-oxidoreductase (decarboxylating) from slow-growing rhizobia. *J. Bacteriol.* **130**: 1139-1143.
- Matamoros, M., L. M. Baird, P. R. Escuredo, D. A. Dalton, F. R. Minchin, I. Iturbe-Ormaetxe, M. C. Rubio, J. F. Moran, A. J. Gordon, and M. Becana.** 1999. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, Biochemical, and Structural alterations. *Plant Physiol.* **121**: 97-111.
- McDermott, T. R. y P. H. Graham.** 1989. *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2493-2498.
- McLoughlin, T. J., S. G. Alt y P. A. Merlo.** 1990. Persistence of introduced *bradyrhizobium japonicum* strains in subsequent years after inoculation in Wisconsin Soils. *Can. J. Microbiol.* **36**: 794-800.
- Mendoza, A., A. Leija, E. Martínez-Romero, G. Hernández, y J. Mora.** 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 584- 592.
- Mergaert P., M. van Montagu, J. C. Promé y M. Holsters.** 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbomoyl group are present on Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1551-1555.
- Metting, F. B.** 1993. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. Metting, F.B. (ed). En: *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management.* Marcel Dekker, Inc. New York - Basel - Hong Kong. 3-25.
- Miller, J. H.** 1972. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EEUU.
- Mort, A. J., y W. D. Bauer.** 1980. Composition of the capsular and extra-cellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: changes with culture age and correlations with binding of soybean seed lectin to the bacteria. *Plant Physiol.* **66**: 158-163.
- Mort, A. J., y W. D. Bauer.** 1982. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* that bind soybean lectin. *J. Biol. Chem.* **257**: 1870-1875.
- Natera, S. H. A., N. Guerreiro y M. Djordjevic.** 2000. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 995-1009.
- Newcomb, W., D. Sippel y R. L. Peterson.** 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **57**: 2603-2616.
- Ninfa, A. J., M. R. Atkinson, E. S. Kamberov, J. Feng y E. G. Ninfa.** 1995. Control of nitrogen assimilation by the NRI-NRII two-component system of enteric bacteria. En: *Two-component signal transduction.* Hoch, J.A. and Silhavy T.J., eds. American Society for Microbiology. Washington, EEUU. pp 67-88.

- Nowotny, A.** 1979. Basic exercises in immuno chemistry. Laboratory manual. 2° Ed. Springer-Verlag Heidelberg, Alemania.
- O'Gara, F., S. Manian, y J. Meade.** 1984. Isolation of an *Asm*-mutant of *Rhizobium japonicum* defective in symbiotic N₂ [nitrogen]-fixation. FEMS Microbiol. Lett. **24**: 241-245.
- O'Gara, F., F. Birkenhead, Y. P. Wang, C. Condon y S. S. Manian.** 1988. Dicarboxylic acid utilization and nitrogen fixation efficiency in *Rhizobium* legume symbiosis. pp.149-157. In F. O'Gara (ed.), Physiological limitations and the genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Odum, E. P.** 1959. Fundamentals of ecology. 2° ed. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Oke, V. y S. R. Long.** 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. Curr. Opin. Microbiol. **2**: 641-6.
- Parniske, M., K. Kosch, D. Werner y P. Müller** 1993. ExoB mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced competitiveness for nodulation of *Glycine max*. Mol. Plant-Microbe Int. **6**: 99-106.
- Parniske, M., P. E. Schmidt, K. Kosch y P. Müller.** 1994. Plant defense response of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Interact. **7**: 631-638.
- Parniske M. y J. A. Downie.** 2003. Plant biology: locks, keys and symbioses. Nature. **425**: 569-570.
- Pate, J. S.** 1986. Economy of symbiotic nitrogen fixation. In T.J. Givnish (Ed.), On the economy of plant form and function pp. 299-326. Cambridge, UK: Cambridge University Press.
- Patriarca, E. J., R. Tate y M. Iaccarino.** 2002. Key role of bacterial NH₄⁺ metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **66**: 203-22.
- Perret, X., C. Staehelin y W. J. Broughton.** 2002. Molecular basis of symbiotic promiscuity. Microbiol. Mol. Biol.. Rev. **64**: 180-201.
- Paul, E. A. y F. E. Clark.** 1996. Soil Microbiology and Biochemistry 2° Ed. Academic Press. San Diego, EEUU.
- Pueppke, S. G.** 1996. The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. Crit. Rev. Biotechnol. **16**: 1-51.
- Peters, N. K. y D. P. S. Verma.** 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. **3**: 4-8.
- Poole, P. y D. Allaway.** 2000. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. Adv Microb Physiol. **43**: 117-63.
- Portais, J. C., P. Tavernier, I. Gosselin y J. N. Barbotin.** 1999. Cyclic organization of the carbohydrate metabolism in *Sinorhizobium meliloti*. Eur. J. Biochem. **265**: 473-480.
- Pueppke, S. G.** 1996. The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. Crit. Rev. Biotechnol. **16**: 1-51.
- Quelas, J.I., S.L. López García, A. Casabuono, M.J. Althabegoiti, E.J. Mongiardini, J. Pérez Giménez, A. Couto y Lodeiro, A.R.** 2006. Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium*

- japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots 2006. Arch Microbiol. 186(2):119-28.
- Quispel, A.** 1974. The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Company, Amsterdam, Holanda.
- Radutoiu, S., L. H. Madsen, E. B. Madsen, H. H. Felle, Y. Umehara, M. Gronlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, y J. Stougaard.** 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. Nature. **425**: 585-592.
- Reddy, P. M., J. K. Ladha, R. B. So, R. J. Hernandez, M. C. Ramos, O. R. Angeles, F. B. Dazzo y F. J. de Bruijn.** 1997. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. Plant Soil. **194**: 81-98.
- Relic, B., F. Talmont, J. Kopcinska, W. Golinowski, J. C. Promé y W. J. Broughton.** 1993. Biological activity of *Rhizobiurn* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. Mol. Plant-Microbe Interact. **6**: 764-774.
- Reitzer, L. J.** 1996a. Sources of nitrogen and their utilization. En: Neidhardt, F.C., CurtisIII, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and UmBarger, H. E. (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. Second Edition-Volume I. pp. 380-390. ASM Press. Washington, D. C., EEUU.
- Reitzer, L. J.** 1996b. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, asparagine, L-alanine and D-alanine. En: Neidhardt, F.C., CurtisIII, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and UmBarger, H. E. (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. Second Edition-Volume I. pp. 391-407. ASM Press. Washington, D. C., EEUU.
- Rolfe, B. G., y P. M Gresshoff.** 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol. **39**: 297-319.
- Sadowski, M. J., P. B. Cregan, M. Gottfert, A. Sharma D. Gerhold, F. Rodriguez-Quinones, H. H. Keyser, H. Hennecke y G. Stacey.** 1991. The *Bradyrhizobium japonicum nola* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **88**: 637-41.
- Sadowski, M. J. y P. H. Graham.** 1998. Soil Biology of the *Rhizobiaceae*. En: *The Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 155-172.
- Sadowski, M. J., y P. H. Graham.** 1999. Agricultural and environmental applications of nitrogen fixing organisms. Martínez, E. y G. Hernández, (eds). En *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 219-223.
- Sahlman, K., y G. Fåhraeus.** 1963. An electron microscope study of root-hair infection by *Rhizobium*. J. Gen. Microbiol. **33**: 425-427.

- Sanjuan, J., R. W. Carlson, H. P. Spaink, U. R. Bhat, W. M. Barbour, J. Glushka y G. Stacey. 1992. A 2-O-Methylfucose Moiety is Present in the Lipo-Oligosaccharide Nodulation Signal of *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 8789-8793.
- Sanjuan, J., P. Grob, M. Göttfert, H. Hennecke y G. Stacey. 1994. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Int. **7**:364-369.
- Sauer, F. G., M. Barnhart, D. Choudhury, S. D. Knight, G. Waksman y S. J. Hultgren. 2000. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. Current Opinion in Structural Biology. **10**: 548-556.
- Schauser, L., A. Roussis, J. Stiller y J. Stougaard. 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. Nature. **402**: 191-195.
- Schubert, K. R. 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis transport and metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. **37**: 539-574
- Schubert, S. 1995. Nitrogen assimilation by legumes-processes and ecological limitations. Fert. Res. **42**:99-107.
- Seneviratne, G. y H. S. Jayasinghearachchi. 2003. Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia. J. Biosci. **28**: 243-247.
- Shapiro, B. M. y E. R. Stadtman. 1970. Glutamine synthetase (*E. coli*) Methods Enzymol. **XVII(A)**: 910-922.
- Shapiro, L., H. H. Mc Adams y R. Losick. 2002. Generating and exploiting polarity in bacteria. Science. **298**: 1942-1946.
- Shatters, R. G., Y. Liu y M. L. Kahn. 1993. Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. J. Biol. Chem. **268**: 469-475.
- Shaw, V. K. y W. J. Brill. 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 3249-3253.
- Shaw, S. L. y S. R. Long. 2003. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. Plant. Physiol. **131**: 976-984.
- Smit, G., J. W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg. 1986 Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. **168**: 821-827.
- Smit, G., J. W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg. 1987. Involvement of both cellulose fibrils and a Ca^{2+} -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. **169**: 4294-4301.
- Smit G., T. J. Logman, M. E. Boerrigter, J. W. Kijne y B. J. Lugtenberg. 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* Ca^{2+} -dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. J Bacteriol. **171**: 4054-62.

- Smit, G., D., M., J. Tubbing, J., W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg.** 1991 Role of Ca^{2+} in the activity of rhicadhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae, which mediates the first step of attachment of *Rhizobiaceae* cells to plant root hair tips. Arch. Microbiol. **155**: 278-283.
- Smit, G., B. J. J. Lugtenberg y J. W. Kijne.** 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. Mol Microbiol. **6**: 2897-2903.
- Smith, R. S.** 1992. Legume inoculant formulation and application Can. J. Microbiol. **38**: 485-492.
- Socolow, R. H.** 1999. Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **96**: 6001-6008.
- Sosa-Saavedra, F., M. León-Barrios y R. Pérez-Galdona.** 2001. Pentose phosphate pathway as the main route for hexose catabolism in *Bradyrhizobium* sp. lacking Entner-Doudoroff pathway. A role for NAD^{+} -dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating). Soil Biol. Biochem. **33**: 339-343
- Soto M.J., J. SanJuan y J. Olivares.** 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. **152**:3167-74.
- Spaink, H. P., D. M. Sheeley, A. A. N. van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold y B. J. J. Lugtenberg.** 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. Nature. **354**: 125-130
- Spaink, H. P.** 1995. The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the in and out of symbiogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. **33** : 345-368.
- Stacey, G.** 1995. *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. FEMS Microbiol. Lett. **127**: 1-9.
- Staehein, C., M. Schultze, E. Kondorosi, R. B. Mellor, T. Boller y A. Kondorosi.** 1994b. Structural modifications in *Rhizobium meliloti* Nod Factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. Plant J. **5**: 319-330.
- Stracke, S., C. Kistner, S. Yoshida, L. Mulder, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard, K. Szczyglowski y M. Parniske.** 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. Nature. **417**: 959-962.
- Streeter, J.** 1988. Inhibition of legume nodule formation and N_2 fixation by nitrate. CRC Crit. Rev. Plant Sci. **7**: 1-23.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies y J. W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev. Microbiol. **56**: 187-209.
- Stougaard, J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. Plant Physiology. **124**: 531-540.
- Stougaard, J.** 2001. Genetics and genomics of root symbiosis. Curr Opin Plant Biol. **4**: 328-335.
- Stowers, M. D.** 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. Annu Rev Microbiol. **39**: 89-108.
- Streeter, J.** 1988. Inhibition of legume nodule formation and nitrogen fixation by nitrate. CRC Crit. Rev. Plant. Sci. **7**: 1-23.

- Stuurman, N., C. P. Bras, H. R. M. Schlaman, A. H. M. Wijffes, G. Bloemberg, y H. P. Spaink.** 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1163-1169.
- Tate, R., A. Riccio, M. Merrick y E. J. Patriarca.** 1998. The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH₄⁺ transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **11**: 188-198.
- Tate R., L. Mandrich, M. R. Spinosa, A. Riccio, A. Lamberti, M. Iaccarino y E. J. Patriarca.** 2001. The *Rhizobium* GstI protein reduces the NH₄⁺ assimilation capacity of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 823-831.
- Thrall, P. H., Burdon, J. J., and Woods, M. J.** 2000. Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian legumes: Interactions within and between genera. *J. Appl. Ecol.*, **37**, 52-65.
- Thies, J. E., P. W. Singleton y B. B. Bohlool.** 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 199-206.
- Timmers, A. C., M. C. Auriac, F. de Billy y G. Truchet.** 1998. Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* **125**: 339-349.
- Toro, N.** 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 157-162.
- Trevelyan, W. E. y J. S. Harrison.** 1952. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* **50**: 298-310.
- Truchet, G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. de Billy, J-C Promé y J. Dénarié.** 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.
- Turgeon, B. G. y B. W. Bauer.** 1985. Ultrastructure of infection thread development during the infection of *Rhizobium japonicum*. *Planta.* **163**: 328-349.
- Unkovich, M. J. y J. S. Pate.** 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N₂ fixation by annual legumes. *Field Crops Res.* **65**: 211-228.
- van Eijsden, R., C. L. Díaz, B. S. de Pater y J. W. Kijne.** 1995. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Plant Mol. Biol.* **29**: 431-9.
- van Rhijn, P., R. B. Goldberg, y A. M. Hirsch.** 1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene *Plant Cell.* **10**: 1233-1250.
- van Rhijn P, N. A. Fujishige, P. O. Lim y A. M. Hirsch.** 2001. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Plant. Physiol.* **126**: 133-44.

- Vande Broek, A. y J. Vanderleyden. 1995. The role of bacterial motility, chemotaxis and attachment in bacteria-plant interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 800-810.
- Verma, D. P. S. 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell.* **4**: 373-382.
- Verma D. P. y Z. Hong. 1996. Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends. Microbiol.* **4**: 364-368.
- Vesper, S. J. y W. D. Bauer. 1985. Characterization of *Rhizobium* attachment to soybean roots. *Symbiosis.* **1**:139-162.
- Vesper, S. J. y W. D. Bauer. 1986. Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 134-141.
- Vesper, S. J., N. S. A. Malik y W. D. Bauer. 1987. Transposon mutants of *Bradyrhizobium japonicum* altered in attachment to host roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1959-1961.
- Vincent, J. M. 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Vlassak, K. M. y J. Vanderleyden. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant Rhizobia. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**: 163-229.
- Wall, L. G. y G. Favelukes. 1991. Early recognition in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: root exudate factor stimulates root adsorption of homologous rhizobia. *J. Bacteriol.* **173**:3492-3499.
- Wang, S. P. y G. Stacey. 1990. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 329-331.
- Wang, S. P. y G. Stacey. 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum* *nodD1* promoter: a repeated structure for the *nod* box. *J. Bacteriol.* **173**: 3356-65.
- Waters, J. K., B. L. Hughes, L. C. Purcell, K. O. Gerhardt, T. P. Mawhinney, y D. W. Emerich. 1998. Alanine, not ammonia, is excreted from N₂-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12038-12042.
- Wilson, J. K. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. *Cornell Agric. Exp. Stn. Mem.* p. 221.
- Wisniewski, J. P., M. Monsigny y F. M. Delmotte. 1994. Purification of an α -L-fucoside binding protein from *Rhizobium lupini*. *Biochimie.* **76**: 121-128.
- Yanni, Y. G., R. Y. Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S. Philip-Hollingsworth, G. Orgambide, F. de Bruijn, J. Stoltzfus, D. Buckley, T. M. Schmidt, P. F. Mateos, J. K. Ladha, y F. B. Dazzo. 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil.* **194**: 99-114.
- Young, J. P. W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: *Biological nitrogen fixation*. G. Stacey, R.H. Burris y H.J. Evans (eds.) Chapman y Hall. N.Y., pp. 43-86.
- Zahran, H. H. 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 968-989.

- Zevenhuizen, L. P.** 1981. Cellular glycogen, β -1,2-glucan, poly- β -hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **47**: 481-497.
- Zorreguieta, A., y R. A. Ugalde.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in β -D(1,3) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **167**: 947-951.
- Zorreguieta, A., R. A. Geremía, S. Cavaignac, G. A. Cangelosi, E. A. Nester y R. A. Ugalde.** 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 121-127.