

01094

Tesis Doctoral

Año 2001

María Florencia
Del Papa

**CARACTERIZACIÓN
SIMBIÓTICA Y MOLECULAR
DE RIZOBIOS NODULADORES
DE ALFALFA AISLADOS DE
SUELOS ÁCIDOS DE ARGENTINA**

TEG 1094



Universidad Nacional de
La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Departamento de
Ciencias Biológicas

(043.2)
TESIS
01094

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas
Biblioteca
50 y 115 1º subaereo
biblioteca@exactas.unlp.edu.ar
Tel 0221 422-6977/79 int. 120



DEX-57467



MSIS
Nº 1094

DONACION.....
A.....
Fecha 01-07-08
Inv. B..... Inv..... B. 57467.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

1094

El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección del Profesor Dr. Antonio Lagares y la codirección del Prof. Dr. Orlando Mario Aguilar.

A la memoria de mi papá ...

Con amor, para Guadalupe y Luis

Mi reconocimiento:

A la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el espacio físico, los equipos y las instalaciones necesarias para el desarrollo de este trabajo.

A la Universidad Nacional de La Plata y a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires, por el otorgamiento de becas que hicieron posible mi dedicación exclusiva a la investigación.

Mi agradecimiento:

Al Prof. Dr. Antonio Lagares, por dirigir mi trabajo en forma crítica, por todas sus enseñanzas, por su estímulo y principalmente, por brindarme su apoyo y confianza.

Al Prof. Dr. M.O. Aguilar, por aceptar codirigir esta tesis.

A la Dra. Daniela F. Hozbor, por su apoyo, estímulo y por sus valiosos consejos. Por compartir en forma desinteresada su tiempo. Ha sido para mi un ejemplo de empuje y capacidad.

A Laura J. Balagué, por su valiosa colaboración en los experimentos realizados durante el primer año de trabajo y por sus chispeantes reflexiones.

A Mariano Pistorio y a Augusto J.L. Pich Otero por su compañerismo, apoyo, amistad y fundamentalmente por hacer divertidas mis horas en el IBBM. Mi cariñoso recuerdo a Chucho y Checho por su humor.

A Julieta Fernandez y a Federico Sisti por su compañerismo, constante apoyo y estímulo.

A Aníbal Lodeiro, por su buena disposición, su apoyo y por su compañerismo.

Al Prof. Dr. Karsten Niehaus, por brindarme la posibilidad de realizar en el Instituto de Biología y Genética de la Universidad de Bielefeld (Alemania) la construcción de las dos bibliotecas genómicas. A Alfhred, Caren, Steffan, Andreas, Karen y Marcus por hacer de mi estadía en Alemania una experiencia inolvidable.

Al Prof. Dr. Soren Sorensen, por brindarme la posibilidad de trabajar en el Department of General Microbiology, Institute of Molecular Biology, University of Copenhagen. Por su

confianza y apoyo. A Stine, Lasse, Lars, Anders, Pia y Kristine, por brindarme lo mejor de ellos y hacer cálidos mis días en Dinamarca.

Al Ing. Agr. Alejandro Perticari, por su valiosa colaboración en la recolección de suelos y por su buena disposición.

A la Lic. Marisa de Giusti por su colaboración en el manejo estadístico de los resultados presentados en el Capítulo VI.

A mis compañeros del IBBM: Silvina López García, Tirso Vazquez, Pablo Riccilo, Juan Carlos López, Verónica López, Cecilia Muglia, Caty López, Mónica Collavino, Pedro David Gara, Daniel Grasso, Vanina Perez, Omar Riva, Gonzalo Legarreta, Selma Gago Zachert, María Laura García, Verónica, Diego Posik, Alejandra Manzán, Alejandra Tortorici, Eloisa Arana, Cristina, Ramiro Mendez, Cecilia Zaneck, Silvia Moya, Victor Romanowski, Gabriel Favelukes, Oscar Grau, por todo el tiempo que pasamos juntos.

A Carlitos Illiano, Rubén Bustos y Catalina López, por su apoyo técnico.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Ciencias Biológicas, por permitir y estimular mi desarrollo como docente.

A mis amigas de toda la vida: Flopy Guzman, Cecilia Sciarra y Carolina Barros Schelotto, por lo vivido y por acompañarme durante mis últimos 26 años.

A mis amigas de la facultad: Silvia Cabodevila, Rosana Hilal, Silvina López García, Cynthia Sequeiros, Alicia Dumont y Pilar Esteban, por su cariño y por su amistad.

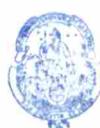
A mi familia política por su afecto.

A mi familia, por todo lo que me dio y en especial a More por ayudarme con la elaboración de la tapa de esta tesis y del CD.

Al Chino, por su apoyo incondicional, su inagotable colaboración, su paciencia y fundamentalmente por ser y estar....

A todos los que de un modo u otro me ayudaron.

Índice.	1
Abreviaturas	9
CAPÍTULO I Introducción	
1- Simbiosis fijadora de nitrógeno rizobio-leguminosa.	12
2- Plantas leguminosas	13
1- Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>).	14
1- Origen e historia.	14
2- Morfología.	15
3- Adaptabilidad a las condiciones del medio.	15
4- Aprovechamiento de la alfalfa.	15
5- Otras medicagos.	16
3- Familia rhizobiaceae.	16
1- Taxonomía.	16
2- Rango de planta hospedadora de los géneros <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> .	17
4- Estado de vida libre y colonización radicular.	18
5- Desarrollo del estado simbiótico.	19
1- Las etapas tempranas de preinfección.	19
1- Quimiotaxis y colonización radicular.	20
2- Secreción de flavonoides e inducción de genes <i>nod</i> .	21
3- Síntesis de factores de nodulación (FN) lipo-oligosacáridicos. Sus efectos biológicos.	22
4- El proceso de adsorción a la superficie radicular.	26
2- La infección.	28
3- Fijación simbiótica de nitrógeno – Expresión de la nitrogenasa.	33
4- Competición de los rizobios por el nicho simbiótico. Transferencia horizontal de genes y modificaciones de la capacidad simbiótica.	34
6- Factores ambientales que inciden sobre el establecimiento de las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa.	37
1- Acidez, un factor de estrés de amplia distribución.	38
1- Efecto de la acidez en la planta.	38
2- Efecto de la acidez sobre la supervivencia y el comportamiento simbiótico de la bacteria.	39
1- Poblaciones de rizobios presentes en suelos ácidos.	39
2- Rizobios tolerantes a la acidez en cultivos de laboratorio y tolerantes a la acidez en suelo.	39
3- Efecto del calcio en el comportamiento simbiótico y en la tolerancia a la acidez de los rizobios.	41
4- Consecuencias fisiológicas del bajo pH.	41
5- Tolerancia a la acidez y pH interno.	42
6- Estado fisiológico bacteriano durante la acidez	44
7- Bases genéticas de la tolerancia a la acidez.	45
Objetivos e interés de la investigación.	48



1- Cepas bacterianas y plásmidos.	50
2- Medios de cultivo y de conservación de los microorganismos.	52
1- Medios para <i>Rhizobiaceae</i>	52
2- Medio para <i>E. coli</i> .	54
3- Medios de conservación.	54
3- Antibióticos.	54
4- Control del pH.	54
5- Estudios <i>in vitro</i> de tolerancia a la acidez de (<i>Sino</i>) <i>rhizobium</i> .	55
1- Tolerancia a la acidez en placa.	55
2- Curvas de crecimiento en medio mínimo a diferentes pHs.	55
3- Capacidad de crecer en TY a 37°C y en LB a 28°C.	55
6- Evaluación de la producción de melanina.	56
7- Análisis de lipopolisacáridos (LPS) en SDS-PAGE.	56
8- Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE).	56
9- Métodos de conjugación.	56
1- Conjugaciones bacterianas biparentales.	56
2- Conjugaciones triparentales.	57
10- Caracterización genotípica de rizobios.	57
1- Perfil de plásmidos de los aislamientos de rizobios noduladores de alfalfa-tolerantes a la acidez (TA).	57
2- Análisis de amplificaciones de ADN total de los aislamientos usando las técnicas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa).	58
1- Fingerprint de ADN total por la técnica de la polimerasa en cadena (PCR).	59
2- Amplificaciones de secuencias correspondientes a los genes simbióticos <i>nifH</i> y <i>nodH</i> .	59
3- Construcción de las sondas <i>nod H</i> marcadas con digoxigenina mediante amplificación por PCR de la secuencia correspondientes al gen simbiótico <i>nod H</i> .	60
11- Preparaciones de plásmidos.	60
12- Extracción de ADN total de rizobios	61
13- Preparación de lisados celulares.	61
14- Determinación de la concentración de ADN y oligonucleótidos.	61
15- Tratamiento enzimático del ADN.	62
16- Electroforesis de ADN .	62
1- Separación e identificación de fragmentos de restricción o de amplificación por PCR mediante electroforesis en gel de agarosa.	62
2- Revelado de geles y registro gráfico de los mismos.	62
3- Estimación de los pesos moleculares de fragmentos de restricción por electroforesis en gel de agarosa.	62
17- Preparación de células electrocompetentes.	63

18- Clonado de un fragmento interno del gen <i>nod</i> H perteneciente a LPU83.	63
19- Transferencia de ADN a un filtro de nitrocelulosa.	63
20- Hibridizaciones de ADN (<i>Southern blot</i>).	64
21- Ensayos con plantas	64
1- Plantas, esterilización en superficie y germinación de semillas.	64
1- Alfalfa.	64
2- Phaseolus.	64
2- Condiciones de cultivo.	64
3- Cultivo axénico de plantas.	65
1- Alfalfa.	65
2- Phaseolus.	65
3- Solución nutritiva.	65
4- Inoculación de los cultivos.	66
4- Determinaciones realizadas.	66
1- Determinación de la cinética de nodulación de alfalfa.	66
2- Peso seco de parte aérea de alfalfa.	66
3- Medida de la competitividad para la nodulación.	66
4- Reaislamiento de (<i>Sino</i>) <i>rhizobium</i> de los nódulos.	67
5- Ensayos de microcosmos.	67
1- Preparación del suelo.	67
2- Ensayos de microcosmos sin planta.	68
Estudio de persistencia bacteriana.	68
1- Diseño experimental.	68
22- Análisis estadístico.	68
23- Obtención de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos.	68
24- Obtención de mutantes Tn5.	69
25- Construcción de bibliotecas genómicas.	69
1- Preparación de ADN del cósmido.	69
2- Digestión del HiperCos I con <i>Xba</i> I.	70
3- Desfosforilación del vector linearizado.	70
4- Digestión del vector con <i>Bam</i> HI.	70
5- Digestiones parciales del ADN total bacteriano con <i>Sau</i> 3a.	71
6- Desfosforilación de las digestiones parciales del ADN bacteriano.	71
7- Empaquetamiento de los cósmidos recombinantes.	71
8- Infección de <i>E. coli</i> NM554.	71
9- Almacenamiento de las bibliotecas genómicas.	71

Resultados y Conclusiones

CAPÍTULO III

Aislamiento y análisis de las características culturales de ácido tolerancia de rizobios noduladores de alfalfa presentes en suelos ácidos de centro Argentina.

1- Introducción.	74
2- Resultados y discusión.	75

	1- Aislamiento de rizobios noduladores de alfalfa (ANR) recuperado de suelos argentinos ácidos de centro Argentina.	75
	2- Características de tolerancia a la acidez de los aislamientos noduladores de alfalfa de la colección.	77
CAPÍTULO IV	Estudio de la biodiversidad de los rizobios que nodulan alfalfa aislados de suelos ácidos locales	
	1- Introducción.	85
	1- Métodos utilizados en la caracterización genotípica de rizobios.	85
	2- Asignación de especie a los aislamientos TA y TMA presentados en el capítulo anterior.	87
	2- Resultados y discusión.	89
	1- Caracterización fenotípica.	89
	1- Capacidad para crecer en TY a 37°C y LB a 28°C.	89
	2- Producción de melanina.	89
	3- Análisis de perfiles lipopolisacáridos de los aislamientos TA en SDS-PAGE.	90
	2- Caracterización genotípica.	91
	1- Análisis de los megaplásmidos presentes en los aislamientos TA mediante geles tipo Eckhardt de lisis <i>in situ</i> .	91
	2- "Fingerprint" de ADN total generados por métodos de PCR.	92
CAPÍTULO V	Busqueda y caracterización de secuencias <i>nodH</i> en la capa TA <i>R. spp.</i> LPU83	
	1- Introducción.	98
	1- Relevancia del grupo sulfato para la actividad biológica de los factores de nodulación (FN) activos en alfalfa.	98
	2- Resultados y discusión.	100
	1- Amplificación por PCR de secuencias homólogas a genes de tipo <i>nodH</i> .	100
	2- Ensayos de hibridación entre sondas generadas por PCR a partir de la cepa LPU83, y ADN genómico y productos de PCR homólogos y heterólogos.	102
	3- Estrategia para el clonado y caracterización del gen <i>nodH</i> presente en la cepa local TA <i>R. spp.</i> LPU83.	103
	4- Caracterización funcional del gen <i>nodH</i> de <i>R. spp.</i> LPU83: Evaluación de la complementación de un mutante heterólogo <i>nodH</i> de <i>Sinorhizobium meliloti</i> .	104
	5- Secuencia parcial de un fragmento interno del gen <i>nodH</i> de la cepa LPU83. Relaciones filogenéticas con los genes homólogos de otros rizobios.	106
CAPÍTULO VI	Caracterización simbiótica de aislamientos locales de <i>S. meliloti</i> y TA tipo <i>R. spp.</i> OR191	
	1- Introducción.	111
	1- La simbiosis <i>S. meliloti</i> - alfalfa en suelos ácidos. Cepas ácido tolerantes. Caracterización y selección de cepas inoculantes.	111
	2- Resultados y discusión.	113

	1- Estimación de la fijación de nitrógeno (FBN) de rizobios locales <i>S. meliloti</i> y TA tipo Or191, en simbiosis con alfalfa en medio hidropónico a distintos pHs.	113
	2- Dinámica de la infección de raíces de alfalfa por las cepas <i>S. meliloti</i> LPU63, y <i>R. spp.</i> LPU83.	116
	1- Caracterización de las cinéticas de nodulación. Evolución de la nodulación de cada rizobio en diferentes regiones topológicas de la raíz y a diferentes pHs.	116
	2- Evaluación de la infectividad de las cepas <i>S. meliloti</i> LPU63 y <i>R. spp.</i> LPU83: capacidad de las mismas para nodular en forma temprana la raíz de alfalfa.	118
	3- Competitividad para la nodulación de las cepas <i>S. meliloti</i> LPU63 y <i>R. spp.</i> LPU83 TA en medio hidropónico a diferentes pHs.	120
CAPÍTULO VII	Identificación de nuevos genes de ácido tolerancia (<i>act</i>). Características simbióticas de mutantes <i>act</i>.	
	1- Introducción.	125
	1- Ácido tolerancia, genes <i>act</i> y simbiosis en acidez. Aproximaciones experimentales al mejoramiento de la asociación rizobio-leguminosa a bajo pH.	125
	2- Resultados y discusión.	127
	1- Estrategias para la identificación de nuevos determinantes de ácido tolerancia (genes <i>act</i>) en rizobios noduladores de alfalfa.	127
	2- Caracterización de las propiedades de crecimiento de los mutantes <i>S. meliloti</i> LPU641 y <i>R. spp.</i> LPU833 a pH ácido y neutro.	128
	3- Caracterización genético-molecular de las mutaciones inducidas por <i>Tn5B20</i> en los rizobios ácido sensibles <i>S. meliloti</i> LPU641 y <i>R. spp.</i> LPU833.	131
	1- Análisis del mutante <i>S. meliloti</i> LPU641.	131
	2- Análisis del mutante <i>R.spp.</i> LPU833.	136
	Discusión General - Conclusiones Finales.	142
	Anexo.	149
	Referencias.	154

INDICE DE FIGURAS

Figura I.1.	(a) La región simbiótica en <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Viciae</i> (b) <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>Trifolii</i> (c) <i>Sinorhizobium meliloti</i> y (d) <i>Bradyrhizobium japonicum</i>	22
Figura I.2.	Estructuras de los LCOs producidos por varios rizobios.	23
Figura I.3.	Enrulado de un pelo radicular e iniciación de la infección.	29
Figura I.4.	Micrografía de un hilo de infección.	30
Figura I.5.	Representación esquemática de ambos tipos de nódulos fijadores de nitrógeno.	35
Figura II.1.	Mapa del vector Hipercos I.	70
Figura III.1.	Distribución geográfica de las localidades en las que se tomaron muestras de suelo ácido.	75
Figura III.2.	Crecimiento de rizobios noduladores de alfalfa en medios agarizados a diferentes pHs.	78
Figura III.3.	Amplificación de secuencias <i>nifH</i> de las cepas TA por PCR.	79
Figura IV.1.	Producción de melanina por aislamientos locales TMA de <i>S. meliloti</i> .	89
Figura IV.2.	Perfiles en SDS-PAGE de lipopolisacáridos (LPSs) extraídos de rizobios noduladores de alfalfa aisladas de suelos de centro Argentina	90
Figura IV.3.	Perfiles plasmídicos de los rizobios noduladores de alfalfa TA.	91
Figura IV.4.	Perfiles de amplificación de ADN genómico de las cepas TA, generados por PCR.	92
Figura V.1.	Análisis en gel de agarosa de los productos de amplificación por PCR obtenidos al emplear los cebadores <i>nodH-Sme f/r</i> y diferentes ADN molde de <i>S. meliloti</i> y cepas de <i>R. spp.</i> tipo Or-191.	100
Figura V.2.	Alineamiento de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los genes de sulfotransferasas de tipo <i>nodH</i> que han sido reportados en distintas especies de rizobios	101
Figura V.3.	Ensayo de hibridación entre el amplicón generado con los cebadores <i>nodH-Rspp f/r</i> a partir de ADN molde de la cepa TA LPU83, y ADN total de la misma cepa LPU83 y de la cepa <i>S. meliloti</i> 2011 digerido con la enzima <i>EcoRI</i> .	102
Figura V.4.	Hibridación cruzada entre los amplicones <i>nodH</i> generados con los cebadores <i>nodH-Sme f/r</i> y <i>nodH-Rspp f/r</i> a partir de ADN de las cepas de <i>S. meliloti</i> y tipo Or191.	103
Figura V.5.	. Southern blot del cósmido pRVD7 digerido con la enzima <i>EcoRI</i> empleando una sonda un fragmento intermno del gen <i>nodH</i> de LPU83.	104
Figura V.6.	Ensayo de nodulación de plantas de alfalfa inoculadas con la mezcla de la conjugación triparental de las cepas <i>S. meliloti</i> AK631 <i>nodH: Tn5</i> x <i>E. coli</i> NM554 (pRVD7) x <i>E. coli</i> DH5-alfa (pRK2013) (parte A), y análisis por <i>fingerprint</i> ERIC-2 PCR de las rizobios recuperados de los nódulos (parte B).	105
Figura V.7.	Ensayo de reinoculación en alfalfa del clon 3 recuperado del ensayo de inoculación en masa.	106
Figura V.8.	Alineamiento de la secuencia parcial de aminoácidos de la proteína NodH de la cepa LPU83 con secuencias homólogas de otros rizobios	107

Figura V.9.	Relaciones filogenéticas obtenidas a partir del análisis de un fragmento interno del gen <i>nodH</i> y de su producto de traducción	107
Figura VI.1	Valores medios de peso seco e intervalos de confianza correspondientes a plantas de alfalfa de 35 días inoculadas con diferentes rizobios a pH neutro y ácido (pH 5,6).	114
Figura VI.2.	Peso seco de plantas de alfalfa variedad CUF101 cuatro semanas después de ser inoculadas con diferentes cepas de rizobios en medio mineral a pH 5,6.	115
Figura VI.3.	Cinéticas de nodulación de alfalfa en ensayos de <u>inoculación simple a pH neutro</u> con cepas de <i>S. meliloti</i> y rizobios TA ineficientes tipo <i>R. spp.</i> Or191.	116
Figura VI.4.	Cinéticas de nodulación de alfalfa en ensayos de <u>inoculación simple a pH ácido</u> con cepas de <i>S. meliloti</i> y rizobios TA ineficientes tipo <i>R. spp.</i> Or191.	116
Figura VI.5.	Cinéticas de nodulación de alfalfa en ensayos de <u>doble inoculación a pH neutro</u> con cepas de <i>S. meliloti</i> y rizobios TA ineficientes tipo <i>R. spp.</i> Or191.	117
Figura VI.6	Cepas de <i>S. meliloti</i> y rizobios TA ineficientes tipo <i>R. spp.</i> Or191.	117
Figura VI.7.	Ensayos de competitividad a pH neutro y pH 5,6 en los que se inocularon de a pares las cepas <i>S. meliloti</i> LPU63, la cepa TA <i>R. spp.</i> LPU83, y la cepa de referencia <i>S. meliloti</i> 2011.	120
Figura VII.1.	Caracterización inicial de las propiedades de crecimiento a distintos pHs en medio SGM de mutantes Tn5B20 de <i>S. meliloti</i> LPU63, <i>S. meliloti</i> 2011 y del rizobio TA <i>R. spp.</i> LPU83.	128
Figura VII.2.	Curvas de crecimiento a distintos pHs de la cepa <i>S. meliloti</i> LPU63 y de su mutante LPU641.	129
Figura VII.3.	Curvas de crecimiento a distintos pHs de la cepa <i>R. spp.</i> LPU83 y de su mutante LPU833.	130
Figura VII.4.	Organización génica de la región de ADN interrumpida por la inserción Tn5B20 en el mutante LPU641 (A), y de las correspondientes regiones <i>paa</i> y <i>pha</i> homólogas presentes en <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas putida</i> (B).	132
Figura VII.5.	Participación de los genes <i>paaA(B)CDE/phaFGHI</i> en la degradación del PhAc por <i>E. coli</i> y <i>Pseudomonas putida</i> (extraído de Olivera et al., 1998).	134
Figura VII.6.	Curvas de crecimiento de la cepa <i>S. meliloti</i> LPU63 y de su mutante LPU641 en medio mínimo SGM con PhAc 5 mM como única fuente de carbono y 10 mM de NH ₄ Cl como fuente de nitrógeno.	134
Figura VII.7.	Sobrevivencia de la cepa LPU63 y su mutante ácido sensible LPU641 luego de una incubación de 6 h en medio mineral JMM con 40 mM ZnSO ₄ .	135
Figura VII.8.	Organización génica de la región de ADN interrumpida por la inserción Tn5B20 en el mutante LPU833.	137
Figura VII.9.	Curvas de crecimiento de la cepa salvaje <i>R. spp.</i> LPU83 y de su mutante LPU833 en medio mínimo SGM (pH7,0) en presencia de ácido ascórbico 2 mM	139

INDICE DE TABLAS

Tabla I.1.	Especies bacterianas de los géneros <i>Rhizobium</i> y <i>Sinorhizobium</i> y sus leguminosas huéspedes más comunes.	18
Tabla I.2.	Genes que varían su expresión en presencia de bajos pHs.	46
Tabla II.1.	Plásmidos utilizados en este trabajo.	50
Tabla II. 2.	Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.	51
Tabla II.3.	Secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo.	58
Tabla II.4.	Características relevantes del suelo utilizado.	67
Tabla III.1.	Características de pH de los suelos muestreados.	76
Tabla III.2.	Distribución de los aislamientos noduladores de alfalfa de acuerdo al pH de los suelos de donde fueron aislados.	77
Tabla III.3.	Origen geográfico y pH de los suelos de los que fueron recuperados los aislamientos TMA y TA.	80
Tabla IV.1.	Características generales de la cepa <i>R. spp</i> Or191 respecto de <i>S. meliloti</i>	87
Tabla IV.2.	Características fenotípicas y genotípicas de rizobios noduladores de alfalfa aislados de suelos ácidos de la región central de Argentina.	94
Tabla VI.1.	Resultados de las medidas del peso seco de plantas de alfalfa inoculadas con diferentes cepas de rizobios.	113
Tabla VI.2.	Infectividad de inóculos de distintos rizobios (simples y dobles) estimada a través de la determinación del número de nódulos desarrollados por las bacterias encima de la marca RT ^o .	119
Tabla VII.1.	Denominación asignada al marco de lectura mutado en la cepa LPU641 ácido sensible. Marcos de lectura vecinos y sus similitudes con genes presentes en otros organismos.	132
Tabla VII.2.	Denominación asignada al marco de lectura mutado en la cepa LPU833 ácido sensible. Marcos de lectura vecinos y similitudes con otros organismos.	137
Tabla VII.3.	Ensayo de competitividad a pH neutro y a pH 5,6 en los que se inocularon pares de bacterias isogénicas.	140

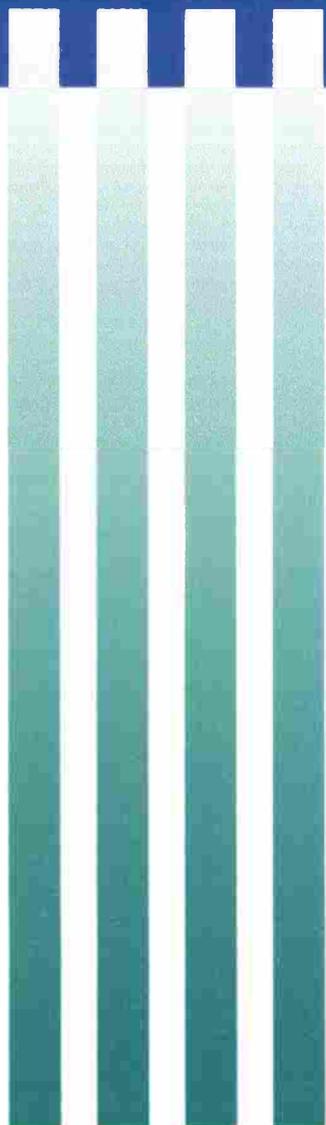
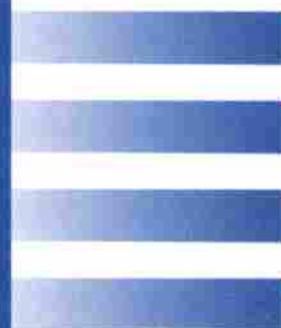
ABREVIATURAS

ADN:	Ácido Desoxirribonucleico
ADNr:	Ácido Desoxirribonucleico ribosómico
ANOVA:	Análisis de varianza
ANR:	" <i>Alfalfa Nodulating Rhizobia</i> ", bacterias que nodulan alfalfa
Ap:	Ampicilina
AT:	" <i>Acid-Tolerant Bacteria</i> ", bacterias tolerantes a la acidez
Bp:	Pares de bases
°C:	Grados Celsius
Ca:	Calcio
Cm:	Cloranfenicol
D.O.:	Densidad Óptica
EPS:	Exopolisacárido
FBN:	Fijación Biológica de Nitrógeno
Fig.:	Figura
FN:	Nod factors
g:	gramo
G:	Tiempo de Generación Bacteriano
h:	Hora
ha:	Hectárea
IS:	Secuencia de Inserción
Kb:	Kilobase
Km:	Antibiótico Kanamicina
Km ^r :	Resistente a kanamicina.
l:	Litro
LPS:	Lipopolisacárido
m:	Metro
M:	Molar
mg:	Miligramo

min.:	Minuto
ml:	Mililitro
mm:	Milímetro
mM:	Milimolar
MAT:	" <i>Medium Acid-Tolerant Bacteria</i> ", bacteria medianamente tolerante a la acidez.
MM:	Medio Mínimo de crecimiento bacteriano.
n:	Número de casos
N:	Normal
N ₂ :	Nitrógeno.
ng:	Nanogramo
nm:	Nanometro
NMP:	Recuento de rizobios por medio del <u>N</u> úmero <u>M</u> ás <u>P</u> robable.
pb:	Pares de bases nucleotídicas.
PCR:	" <i>Polymerase Chain Reaction</i> ", reacción en cadena de la polimerasa.
pH:	Potencial Hidrógeno
Rnasa:	Ribonucleasa
rpm:	Revoluciones por minuto
SD:	" <u>S</u> tandard <u>D</u> eviation", desviación estándar.
SDS:	Dodecil sulfato de sodio
SE:	" <u>S</u> tandard <u>E</u> rror", Error estándar
Tc:	Tetraciclina
Tn5:	Transposón Tn5
ufc:	unidades formadoras de colonias bacterianas.
UV:	Ultravioleta
Wt:	Tipo salvaje
X-gal:	5-bromo-4cloro-3indolil-β-galactopiranósido
μg:	Microgramo
μM:	Micromolar
μl:	Microlitro
%:	Porcentaje

CAPÍTULO I

Introducción



I.1. SIMBIOSIS FIJADORA DE NITRÓGENO RIZOBIO-LEGUMINOSA

El nitrógeno molecular (N_2) es el gas más abundante en la atmósfera terrestre (aproximadamente 80%), pero debido a su carácter inerte, no es útil *per se* como fuente de nitrógeno para el desarrollo de la vida en la Tierra ya que las plantas sólo son capaces de asimilarlo en forma combinada (amonio, nitratos, etc.). Así el nitrógeno es uno de los factores más comunes que limitan el crecimiento de las plantas. La ganancia de nitrógeno de un determinado hábitat se puede relacionar básicamente con tres procesos fundamentales:

a) El proceso de Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN): existen bacterias que gracias a su maquinaria enzimática, son capaces de producir la reducción del nitrógeno molecular en amonio. Puede estimarse que este proceso introduce aproximadamente unos 180 millones de toneladas N/año en la biosfera.

b) Fijación espontánea de nitrógeno a partir de la actividad natural de descargas eléctricas sobre el nitrógeno molecular de la atmósfera. Estos procesos introducen aproximadamente 30 millones de toneladas N/año bajo la forma de óxidos de nitrógeno o amonio.

c) Fijación industrial (proceso de Haber-Bosch). La fijación de nitrógeno se produce como consecuencia de la transformación industrial del N_2 atmosférico en amoníaco en condiciones de alta presión. El interés fundamental de su uso es como fertilizante y en consecuencia tiene aplicación específica en agricultura. Este proceso directamente asociado a la producción de fertilizantes nitrogenados resulta en la introducción de N fijado en la biosfera estimada en 70 millones de toneladas N/año (Martínez, 1992).

La FBN en particular es realizada por un conjunto de microorganismos procariontes denominados diazotrofos. Estas bacterias pertenecen a dos categorías: microorganismos fijadores en vida libre entre los que se encuentran bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Mycobacterium* y *Pseudomonas*; o bacterias fijadoras en simbiosis como el actinomiceto *Frankia*, la cianobacteria *Anabaena* y las bacterias denominadas genéricamente rizobios: *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

Las plantas pertenecientes a la familia *Leguminosae* poseen la característica distintiva de asociarse simbióticamente a los rizobios. La infección de las raíces de estas plantas arroja como resultado final la formación de nódulos capaces de fijar nitrógeno atmosférico. En el caso de *Sesbania rostrata*, también se observan infecciones y nódulos en el tallo causadas por *Azorhizobium caulinodans*. Todos estos microorganismos sumados a los pertenecientes a los géneros *Agrobacterium* y *Phyllobacterium*, responsables también de hipertrofias corticales en diversos órganos de las plantas conforman la familia *Rhizobiaceae*.

La simbiosis rizobio-leguminosa es responsable del 40% de la FBN, por lo que dichas asociaciones representan uno de los mecanismos más importantes de incorporación de nitrógeno en la biosfera (Orive *et al.*, 1983). La utilización o fijación biológica de nitrógeno

(FBN) se efectúa en los nódulos radiculares inducidos por la propia bacteria. En el interior de estos nódulos, los rizobios se diferencian a un estado llamado bacteroide. Los bacteroides son quienes transforman el dinitrógeno en amonio, suministrándoselo directamente a la planta, la cual, dependiendo de la especie de leguminosa, lo asimila en forma de aminoácidos o ureídos. Este proceso le permite a la planta disponer de nitrógeno combinado para sus diferentes requerimientos metabólicos.

La reducción del nitrógeno a amonio es catalizada por la enzima nitrogenasa de los rizobios, cuya actividad se ve inhibida en presencia de oxígeno. Así, los nódulos radiculares generan el ambiente en el que los rizobios protegidos de altas tensiones de O₂ expresan su capacidad de fijar nitrógeno. Dentro del nódulo los bacteroides diferenciados y con capacidad de fijar N₂ se localizan en células corticales, englobados por una membrana de origen vegetal, formando el simbiosoma (Long y Staskawicz, 1993; Fischer, 1994). El grado de diferenciación y especialización de los rizobios dentro del simbiosoma es tal que la planta debe ser la encargada de suministrarle las fuentes de carbono a la bacteria. El transporte de oxígeno al simbiosoma se realiza a muy bajas presiones parciales por la leghemoglobina, una proteína de la familia de las hemoglobinas presente en las leguminosas (Appleby, 1984). También se ha observado que la cadena de transporte de electrones y la formación de ATP en los bacteroides está adaptada a un ambiente de baja tensión de oxígeno (Henneke et al, 1992).

La infección de las leguminosas por los rizobios podría ser vista como parasítica, basándose en una amplia definición del término parasitismo, de no ser por su capacidad de fijar nitrógeno, Long y Staskawicz (1993), la consideran en esta forma. Djordjevic *et al.* (1987) interpretan a la simbiosis como un "parasitismo refinado", ya que las bacterias mediante el aporte de una función que le confiere ventajas al hospedante evitarían ser eliminadas por los sistemas de defensa de la planta. Esta visión de las interacciones rizobios-leguminosa esta apoyada por las evidencias recientes sobre la aparición de mecanismos de defensa de la planta cuando la misma es inoculada con ciertos mutantes alterados en su superficie. La relación parasítica definida en estos términos sería positivamente seleccionada (Djordjevic *et al.*, 1987).

El desarrollo de los simbiosomas muestra un alto grado de diferenciación y especialización tanto de los rizobios como de las células de la planta hospedadora. Una característica notable de las asociaciones rizobio-leguminosa es su especificidad: en general, para cada especie de rizobio existe un estrecho rango de especies de leguminosas que pueden actuar como hospedantes. Los grupos compatibles de rizobio y leguminosas se conocen como grupos de inoculación cruzada. (ver Cap. I sección 3.2)

1.2. PLANTAS LEGUMINOSAS

La capacidad de establecer simbiosis fijadora de nitrógeno con rizobios está restringida a las leguminosas, con la excepción de un miembro de la familia vegetal de las *Ulmaceae*,

el género *Parasponia*, que también posee dicha habilidad. La familia de las *Leguminosae* (también llamada *Fabaceae*) comprende tres subfamilias, *Caesalpinieae*, *Mimosoideae*, y *Papilionoideae*, todas ellas contienen géneros capaces de asociarse con rizobios. En esas tres familias los porcentajes de especies nodulantes son bastante diferentes. En las familias más evolucionadas, *Papilionoideae* y *Mimosoideae* (van Rhijn et al., 1995) la mayoría de los géneros se asocian simbióticamente con rizobios.

Entre las leguminosas se destacan varias especies de gran interés agronómico, tales como las forrajeras alfalfa y trébol, y como los cultivos de poroto, soja, arveja, garbanzo, maní y otros para la producción de grano. Todas ellas, gracias a su capacidad de asociación simbiótica con rizobios, se caracterizan por presentar altos contenidos nitrogenados tanto en materia verde como en granos. Esta característica es de vital importancia en relación a su capacidad para ser empleados en nutrición humana y animal, así como también para el manejo y conservación de los suelos, cuya fertilidad y estructura se ven favorecidas por la incorporación de rastrojos de estas especies.

La importancia del aporte de nitrógeno ha sido reconocida ya en la antigüedad, pero sólo después del descubrimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno en nódulos de leguminosas por Hellriegel y Wilfarth en 1888, resultó posible aprovechar tecnológicamente el potencial de esta asociación. Actualmente es una práctica común la inoculación de las semillas de leguminosas con suspensiones de rizobios. Esta práctica se realiza normalmente a la siembra cubriendo las semillas con un inoculante en que los rizobios activos para la nodulación se proveen en un soporte adecuado, además de la utilización de semillas preinoculadas. Las formulaciones de inoculantes son muy variadas, tanto en su composición química como en los genotipos de cepas utilizadas y en su eficacia (Paau et al., 1990). No obstante el resultado final de una inoculación en términos de rendimiento y cantidad de nitrógeno fijado, no depende sólo de la calidad del inoculante, sino de una gran cantidad de factores edáficos, bióticos y abióticos que condicionan el éxito de la asociación. Estos factores ejercen su influencia en las etapas tempranas del proceso de infección de las raíces por parte de los rizobios y serán discutidos en detalle más adelante.

1.2.1. ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

1.2.1.1. Origen e historia.

La alfalfa es una papilionacea originaria de Persia, se desarrolla en zonas templadas de clima continental árido, en las que los inviernos son fríos y los veranos cálidos y secos, los suelos son ricos en bases con una capa freática profunda. De allí fue llevada por las caravanas comerciales a diversos puntos de Asia y Arabia. Posiblemente, la alfalfa haya sido introducida en Europa en los siglos IV o V aC, durante las invasiones persas a Grecia, y desde allí haya pasado a Italia. Pero la difusión más importante fue con las invasiones árabes a través del norte de Africa, llegando a España, de donde se difundió por toda Europa. La alfalfa desapareció como cultivo durante la Edad Media, tanto en Italia como

en Grecia, pero sobrevivió en formas espontáneas. La introducción de alfalfa en el continente americano se realizó primero en América del Sur (Argentina, Chile, Perú y México) donde fue llevada por los conquistadores. Luego de reiterados intentos por introducir la alfalfa en Norte América, en 1850 se la conoció en California con el nombre de "trébol de Chile y su expansión y popularidad no tardó en aumentar a partir de este momento (Muslera *et al.*, 1991).

1.2.1.2. Morfología.

La alfalfa es una planta perenne, vivaz, de desarrollo erecto, tallo poco ramificado de 60 a 100 cm de altura en condiciones naturales, hojas trifoliadas con un pedicelo intermedio más largo que los laterales, folíolos ovalados, en general sin pelos, tiene márgenes lisos con los bordes superiores ligeramente dentados. Los tallos son delgados, sólidos o huecos, durante la juventud son cuadrados y fuertes para soportar erectos el peso de hojas e inflorescencias. La raíz es pivotante, con una corona que sale fuera del terreno, del cual emergen los brotes que darán lugar a los tallos. Las flores son azules o púrpuras y crecen en forma de racimos de axila de las hojas. Los frutos sin espinas forman espirales con tres vueltas que encierran 2 a 6 semillas de color marrón claro o amarillentas. Alfalfa es una planta de recuperación rápida después del corte. Su número de cromosomas es de 32 (Muslera *et al.*, 1991).

1.2.1.3. Adaptabilidad a las condiciones del medio.

La alfalfa se cultiva en una amplia variedad de suelos y climas. Es una planta muy bien adaptada a suelos profundos bien drenados y alcalinos y tiene una tolerancia a la salinidad moderada. Sin embargo no se adapta bien a suelos con pH ácido. Esta deficiencia se debe a una baja tolerancia intrínseca de la planta a la acidez, así una disminución en la supervivencia y multiplicación de su rizobio nodulante específico: *Sinorhizobium meliloti*. La temperatura óptima para el crecimiento está entre 15°C y 25°C durante el día y entre 10°C y 20°C en la noche. Temperaturas por encima de 30°C reducen el crecimiento por aumento de la respiración de la planta. Es conocida la resistencia de la alfalfa a la sequía, resistencia basada fundamentalmente en dos características, la longitud y profundidad de sus raíces que le permite obtener agua de las capas más profundas del terreno, y la capacidad de detener su crecimiento (dormancia o letargo) cuando las condiciones del medio, como las temperaturas extremas y/o sequía, lo hacen necesario (Muslera *et al.*, 1991).

1.2.1.4. Aprovechamiento de la alfalfa.

Al igual que la mayoría de las plantas leguminosas de uso agropecuario, la alfalfa cumple una importante función en el enriquecimiento de nitrógeno de los suelos de

cultivo. Además desde un punto de vista bromatológico se puede decir que la alfalfa es un forraje de buena calidad. Su valor nutritivo es especialmente importante cuando se destina a la alimentación de animales en producción de leche o carne con buena digestibilidad y alto contenido de proteína. Comparado con otras leguminosas como trébol blanco, trébol violeta, o esparceta, su digestibilidad y valor energético es menor, pero su contenido de materias nitrogenadas es más elevado. También las gramíneas más comunes (*ray-grass inglés*, *ray-grass italiano*, dactilo, festuca y otros) en estados vegetativos previos a la floración tienen valores energético y digestibilidad superior al de la alfalfa, pero menor contenido de proteínas. Por ello, la alfalfa se erige como un forraje de alto contenido proteico de gran demanda para su uso como alimento. En ese marco el pastoreo de la alfalfa es un sistema económico de aprovechamiento, muy interesante en la reducción de costos de la explotación ganadera. Sin embargo, dado que la alfalfa no persiste mucho tiempo bajo pastoreo continuo, es absolutamente necesaria la adopción de un sistema discontinuo que permita que las plantas recuperen sus reservas y alcancen la madurez. Dicho requerimiento redundaría en el uso frecuente de la rotación de cultivos (ej. gramíneas, girasol, otras).

1.2.1.5. Otras Medicagos

M. sativa (alfalfa) es la *Medicago* más importante a nivel aunque también es importante la otra planta perenne de este género *M. falcata*, igualmente denominada alfalfa, aunque es menos productiva. Varias especies del género *Medicago* se caracterizan por ser plantas de crecimiento anual, aunque quizás no de la calidad alimenticia de la alfalfa, tiene gran importancia agronómica, en zonas como Oeste de Australia donde está extendido su uso para aportar nitrógeno al suelo en el descanso de cereales (Howieson, 1995a) y por cierta tolerancia a suelos moderadamente ácidos de algunas especies como *M. polymorfa* (también ampliamente utilizada en Argentina y Uruguay) y *M. murex* (Muslera *et al.*, 1991).

1.3. FAMILIA RHIZOBIACEAE

1.3.1. Taxonomía

Los miembros de la familia *Rhizobiaceae* se caracterizan por interactuar con plantas, ya sea formando simbiosis estrechas, o dando origen a interacciones patogénicas. Sin embargo, esta familia definida como tal casi enteramente por las interacciones con plantas leguminosas no siempre incluye miembros cercanamente relacionados desde el punto de vista genético. Así, la comparación de secuencias de ADN indica que todos los géneros reconocidos tienen parentescos próximos con bacterias que están en familias muy distintas, tales como *Rhodospirillaceae* y *Rickettsiaceae*. Todos esos organismos se han

encuadrado en el subgrupo alfa de las proteobacterias (Young *et al.*, 1992). En la actualidad, se están realizando numerosos estudios para clarificar la taxonomía y filogenia de bacterias que son capaces de inducir nódulos en plantas leguminosas. Gracias a las nuevas tecnologías genéticas y fundamentalmente a la comparación de secuencias homólogas de ADN, surgen rápidos cambios en la clasificación de esos organismos y se están describiendo nuevos géneros y especies. En 1984 el Manual de Taxonomía Sistemática de Bergey (Jordan *et al.*, 1984) situaba la familia *Rhizobiaceae* en el reino Procariotas, división Gracilicutes, clase Scotobacteria, en su grupo cuatro: bacilos y cocos gram-negativos aerobios/microaerofilos. Dentro de la familia se reconocían los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium*, *Azorhizobium* y *Philobacterium*. Se reconocían las siguientes especies en el género *Rhizobium*: *R. leguminosarum*, *R. meliloti*, y *R. loti*. Desde entonces se han descrito nuevas especies, *R. galegae* (Lindstrom, 1989), *R. huakuii* (Chen *et al.*, 1991b), *R. tropici* (Martinez-Romero *et al.*, 1991), *R. etli* (Segovia *et al.*, 1993), *R. ciceri* (Nour *et al.*, 1994) y *R. mediterraneum* (Nour *et al.*, 1995). Se creó un nuevo género (*Sinorhizobium*) que agrupa los antiguos *R. meliloti* y *R. fredii* (ahora *S. meliloti* y *S. fredii*) así como dos nuevas especies descritas *S. teranga* y *S. saheli* (De Lajudie *et al.*, 1994). Se nombró una nueva especie *S. medicae* con las bacterias que antes se encuadraban en el grupo B de *R. meliloti* (Rome *et al.*, 1996). Recientemente se agruparon bajo el género *Mesorhizobium* los antiguos *R. loti*, *R. hakuuii*, *R. ciceri*, *R. mediterraneum* y *R. thiansemense* (Jarvis *et al.*, 1997). Hay numerosas cepas de rizobios que aún no se le ha asignado especie y que muestran características genéticas próximas a otros grupos. Se les llama genéricamente *Rhizobium spp.* Varios de los aislamientos noduladores de alfalfa que se presentan en esta tesis corresponden a este tipo de rizobios. Los mismos están relacionados con la cepa *R. spp* Or191 previamente descrita por Eardly *et al.* (1992).

1.3.2. Rango de planta hospedadora de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*

Las clasificaciones iniciales de los rizobios fueron basadas en agrupamientos de cepas cuya característica común era el rango de la planta hospedadora. Varias de las especies y variedades de rizobios tienen un rango restringido de huésped, es decir, infectan una o unas pocas especies concretas de leguminosas. Esto permitió definir los llamados grupos de inoculación cruzada: conjunto de cepas capaces de infectar una especie (o un grupo determinado de especies) de leguminosas.

Se ha comprobado que hay numerosas excepciones en las que plantas de un grupo de inoculación pueden ser infectadas por rizobios de otro grupo. Tales observaciones mostraron un mayor grado de permisividad (promiscuidad) para infecciones cruzadas en relación con la idea original concebida en los grupos de inoculación (Wilson, 1939).

A continuación se muestran los huéspedes principales para las especies de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

Tabla I.1. Especies bacterianas y sus leguminosas huéspedes más comunes.

Especie bacteriana	Leguminosa huésped
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	
bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum, Vicia, Lathyrus, Lens</i>
bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium</i>
bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>P. vulgaris, Leucaena spp, Macroptilium spp.</i>
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega officinales, G. orientales</i>
<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium giardinii</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
<i>Rhizobium mongolense</i>	<i>Medicago ruthenica</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago, Melilotus, Trigonella</i>
<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Medicago</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max, G. soja</i>
<i>Bradyrhizobium liaoningense</i>	<i>G.soja</i>
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer arietinum L.</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus</i>
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Cicer arietinum L.</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>G. soja, P. Vulgaris</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	<i>Acacia</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Acacia</i>

I.4. ESTADIO DE VIDA LIBRE Y COLONIZACION RADICULAR

Los rizobios pueden permanecer en "vida libre" durante largos períodos en el suelo, aún en ausencia de leguminosas (Diatloff, 1977, Brunel *et al.*, 1988, McLoughlin *et al.*, 1990). Dado que estas bacterias no son capaces de esporular, es posible que su permanencia en el suelo dependa de la presencia de nichos favorables a los que puedan colonizar. Un suelo agrícola, en su horizonte superficial, está compuesto por partículas cuyos diámetros varían entre 0,1 μm y 2 mm, y la abundancia relativa de cada tamaño de partícula en un suelo define su textura. Según su clase textural los suelos pueden clasificarse en: arcillosos, limosos, francos y arenosos. Además, las partículas se agrupan entre sí formando

agregados en una estrecha y definida variedad de formas, lo que constituye la estructura de los suelos. En un suelo de textura media (limoso o franco) y bien estructurado puede esperarse que el 50% del volumen este ocupado por poros de diversos diámetros. Así se divide a los poros en 2 categorías: a) no capilares, los cuales se drenan fácilmente luego del riego o lluvia, y b) capilares, en los que el agua permanece después que el suelo haya sido completamente drenado. El diámetro de los poros capilares puede estimarse en un rango de 0,1 a 6,0 μm . Estos poros pueden constituirse en microhábitats muy favorables para las bacterias en el suelo. Las bacterias pueden adsorberse a los minerales de arcilla por medio de interacciones hidrofóbicas o electroestáticas, estabilizadas a través de apéndices tales como microfibrillas o fimbrias (van Loosdrecht *et al.*, 1990).

Los efectos protectores de las superficies sobre la actividad de las bacterias adsorbidas son en general indirectos, pudiendo atribuirse a un mecanismo por el cual el entorno celular se modifica en presencia de una dada superficie, pero la actividad de las células mismas no se modifica. Es posible que la actividad biológica de los rizobios en los poros capilares se encuentre muy disminuida, entre otras razones, por la pobre difusión de oxígeno que ocurriría hacia esos poros cuando el contenido hídrico del suelo es alto. Aguilar (1981) describió que en esas condiciones se induce una nitrato reductasa respiratoria en los rizobios, que les permitiría la utilización del nitrato como último aceptor de electrones. La ocupación de los poros capilares puede estar influenciada por la presencia de raíces circundantes. Las raíces de las plantas al penetrar en el suelo exudan una variedad de aminoácidos, proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, flavonoides, carbohidratos complejos, alcoholes, vitaminas y hormonas que producen importantes cambios en la composición química del mismo. Este ambiente enriquecido en nutrientes puede promover el crecimiento de las poblaciones rizobianas del suelo, y su movilización merced a su quimiotaxis positiva hacia muchos de esos compuestos, en forma inespecífica (Gaworzewskay Carlile, 1982) o en forma selectiva hacia ciertos flavonoides liberados por su hospedante simbiótico (Caetano Anollés *et al.*, 1988). Este aumento de las poblaciones rizobianas conduciría a una rápida saturación de los poros y, consecuentemente, a una emigración de los rizobios hacia la raíz. Otros rizobios pueden provenir de microambientes más expuestos, y además, las propias raíces en su proceso de desarrollo pueden encontrar rizobios libres. El resultado de todos estos procesos es la colonización de una zona del suelo en íntimo contacto con las raíces que se conoce con el nombre de rizosfera y que está sujeta a las influencias físicas y biológicas de las propias raíces. Lindera con la superficie radicular existe una capa mucilaginosa (mucigel) de unos 0,5 a 8,0 μm de espesor (Greaves y Darbyshire, 1972) que se continúa en la rizosfera. La colonización de la rizosfera y el mucigel permite el rápido crecimiento de las poblaciones bacterianas.

1.5. DESARROLLO DEL ESTADO SIMBIÓTICO

1.5.1. Las etapas tempranas de preinfección

1.5.1.1. Quimiotaxis y colonización radicular

En la rizosfera de la leguminosa crecen numerosos tipos de bacterias del suelo, entre ellas los rizobios móviles por flagelos peritricos. Entre los exudados radicales de la planta se encuentran azúcares, aminoácidos, y ácidos orgánicos que se han identificado como quimioatrayentes para varias bacterias de la rizosfera. Distintas especies de leguminosas exudan conjuntos diferentes y característicos de flavonoides. Spaink *et al.*, (1987) encontraron que las proteínas Nod D de varias especies de *Rhizobium* se activan específicamente en presencia del conjunto de flavonoides exudado por las raíces de su hospedante simbiótico. Dicha proteína se encuentra en la membrana interna de las bacterias donde también se acumulan los flavonoides, con lo cual Schalman *et al.*, (1989) sugirieron que los flavonoides y Nod D interactuarían directamente en ese lugar, induciendo a la porción N-terminal de Nod D (citoplasmática, unida a los promotores *nod*) a producir un cambio conformacional en el ADN, exponiendo a los promotores *nod*, y activando así su expresión. Análisis de mutantes y proteínas Nod D quiméricas han señalado que, en efecto, el reconocimiento de los flavonoides se lleva a cabo a través de la porción C-terminal de la proteína Nod D (Hovarh *et al.* 1987; Burn *et al.*, 1987). Esta, al contrario que la porción N-terminal, muestra un muy bajo nivel de homología de secuencia entre las distintas especies rizobianas.

En *S. meliloti* existen 3 copias de *nodD*, la expresión de una de ellas (*nodD3*) está positivamente regulada por el producto del gen *syRM*, que al igual que *nodD*, pertenece a la familia LysR. También se halló un represor con actividad en trans, llamado *noIR*, capaz de inhibir la expresión de *nodD* (Kondorosi, 1991, Fisher y Long, 1992). Todos estos reportes sugieren que el control de la expresión de los genes *nod* está finamente regulado, más allá de la simple interacción de un grupo de flavonoides específicos con la proteína NodD.

El conjunto de flavonoides que libera cada especie vegetal, no es homogéneamente secretado a lo largo de toda la raíz. Redmond *et al.* (1986) observaron mediante un ensayo en vivo que la actividad inductora de la expresión de los genes *nod* es máxima en la zona de los pelos radiculares emergentes (que coincide con la zona más susceptible a la infección), mientras que se halla virtualmente inhibida en la zona del ápice de la raíz. Además, Hartwing *et al.* (1990) y Hungría *et al.* (1991a) reportaron que el espectro de flavonoides liberados se modifica durante el desarrollo.

En las plantas, los flavonoides ejercen muchas funciones diferentes: pigmentos, sustancias promotoras del desarrollo del tubo polínico, como precursores y constituyentes de polímeros con funciones estructurales, y como fitoalexinas, sustancias de defensa ante el ataque de microorganismos patógenos (Koes *et al.*, 1994). Esta última función parece estar evolutivamente relacionada con la interacción simbiótica rizobio-leguminosa (Fisher y Long, 1992, Koes *et al.* 1994). Los flavonoides se sintetizan a partir de fenilalanina en la vía de los fenilpropanoides. Dos enzimas claves, altamente reguladas en esta vía son la fenilalanina amonio liasa (PAL) y chalcona sintetasa (CHS). La actividad de estas enzimas se incrementa en presencia de diversos elicitores de respuesta de defensa (moléculas

liberadas por patógenos que sirven como señales, como los restos de quitina (Lamb *et al.*, 1989). Las diversas modificaciones de esta vía dan lugar a la síntesis de unos 3000 flavonoides diferentes; sin embargo, dado que sus funciones parecen ser altamente tejido-específicas en ciertas etapas del desarrollo y/o situaciones ambientales, se ha sugerido que la presión de selección debe haber actuado más sobre la regulación de su síntesis que sobre el particular espectro de flavonoides que una especie dada puede producir (Koes *et al.*, 1994).

1.5.1.2. Secreción de flavonoides e inducción de genes *nod*.

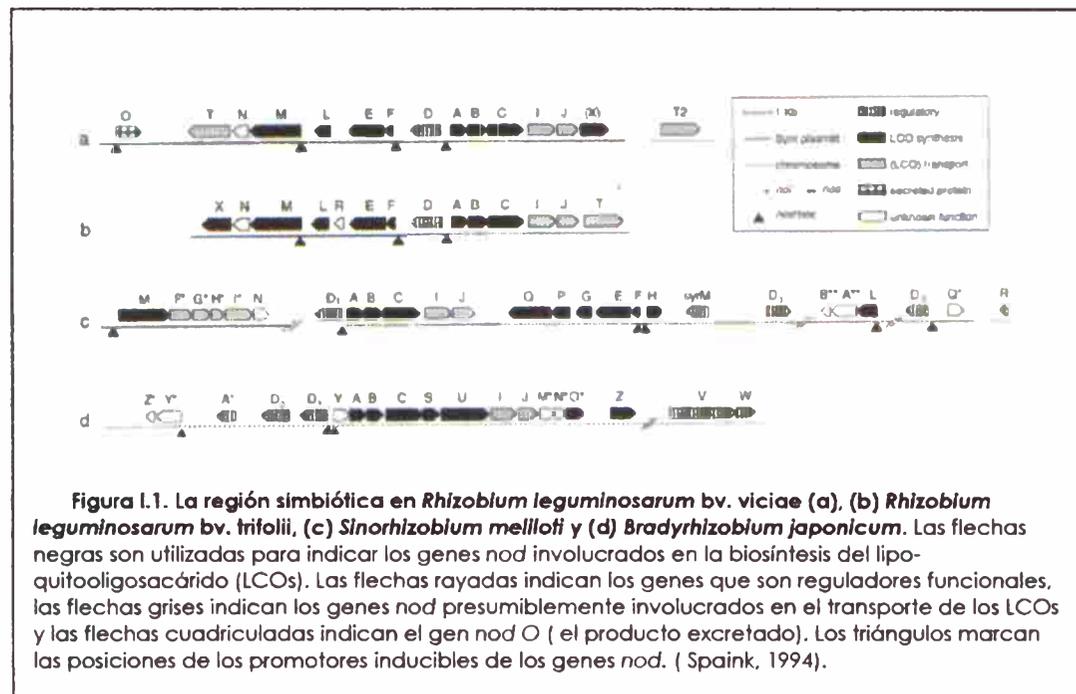
Los mecanismos por los que una especie o grupo de rizobios es reconocido por la planta son diversos y en muchos casos conocidos a nivel molecular. Tradicionalmente se hablaba de grupos de inoculación cruzado cuando un grupo de rizobios reconocía y era capaz de establecer una simbiosis con un grupo de leguminosas determinado. Hoy se conocen muchas excepciones a los grupos de inoculación cruzada.

El reconocimiento específico entre la bacteria y la planta comienza muy tempranamente y se expresa a través de una serie continua de eventos, algunos de los cuales describimos a continuación:

Las leguminosas liberan con sus exudados radicales una serie de moléculas que son reconocidas específicamente por los rizobios con los que van a comenzar la simbiosis. Estas moléculas señal de naturaleza flavonoide y suelen ser flavonas y flavononas en el caso de rizobios de crecimiento rápido e isoflavonas en el caso de *Bradyrhizobium*). Tales moléculas podrían ser suficientes para que una población bacteriana se desarrolle en forma saprofítica sobre las raíces. En las interacciones *Rhizobio*-leguminosa donde existe invasión de los tejidos vegetales por parte de las bacterias, los flavonoides cumplen funciones mucho más específicas asociadas a la inducción de genes simbióticos en la bacteria genéricamente designadas como genes *nod*. Dichos genes, se encuentran ya sea en el megaplásmido o plásmido simbiótico pSym (en el género *Rhizobium*), o en el cromosoma (en los géneros *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*). Un grupo de estos genes se denominó genes *nod* "comunes", ya que a pesar de ser esenciales para el proceso de nodulación, pueden ser intercambiados entre varias especies de rizobios sin perder su función. Otros han sido llamados genes *nod* "específicos" ya que no son equivalentes entre rizobios de diferentes grupos de inoculación cruzada y su función está relacionada con la definición del rango de hospedantes (Kondorosi, 1991).

Cuando la bacteria llega a una zona con una determinada concentración, los flavonoides se unen a una proteína sensora, Nod D. Cada rizobio puede producir una o varias proteínas de la familia Nod D dependiendo del número de genes *nodD* que posea (Spaink *et al.*, 1995). La unión con el flavonoide hace que Nod D cambie de conformación y se convierta en un activador transcripcional del resto de los genes de nodulación los cuales desencadenarán la producción de una nueva molécula señal del microsimbionte hacia la planta llamada factor Nod o lipoquitooligosacárido necesaria para la infección radicular por los rizobios y la diferenciación de los nódulos radiculares. En la Fig. 1 se

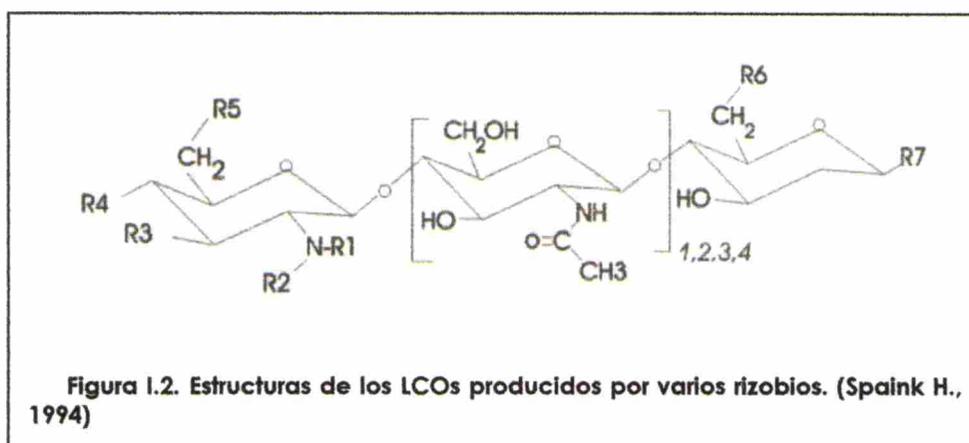
muestra la región simbiótica de distintos rizobios.



El gen *nod D* se expresa constitutivamente en *S. meliloti*, mientras que, por ejemplo, en *R. leguminosarum* bv. *viciae* el producto de *nod D* regula en forma autónoma su propia expresión. La porción amino-terminal de la proteína Nod D está altamente conservada y presenta un motivo "hélice-vuelta-hélice", característico de dominios de unión al ADN. Se ha encontrado que la proteína Nod D se une a regiones altamente conservadas de aproximadamente 50 pares de bases de longitud en zonas del ADN rizobiano pertenecientes a los promotores de los genes *nod* inducibles, llamadas *nod-box* (Rostas et al., 1986).

1.5.1.3. Síntesis de factores de nodulación (FN) lipo-oligosacáridicos. Sus efectos biológicos

En el año 1991 Dénarié et al. describieron la primera estructura química completa del factor Nod Rm-1 de *S. meliloti* y demostraron que dicha molécula es sintetizada por los productos de los genes *nod* de la bacteria y liberada al medio extracelular (Dénarié et al, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993). Moléculas similares al factor Nod Rm-1 han sido ya aisladas y caracterizadas en varios rizobios.



Especie	Lípido (R1)	Otros sustituyentes
<i>R.l. bv. viciae</i> 248	C18:4	R5, O-acetil
<i>R.l.bv. viciae</i> TOM	C18:4	R5, O-acetyl, R6, O-acetyl
<i>R.l. bv. trifolii</i>	C20:4, C20:3, C18:3, C18:2 or common	R5, O-acetyl
<i>S.meliloti</i> 2011	C16:2	R5, O-acetyl(+/-), R6 sulfato
<i>S. meliloti</i> AK41	C16:2 ó C16:3	R6, sulfato
<i>R. loti</i>	común	R1, N- metil; R4, O-carbamoil; R6, acetilfucosa
<i>R. sp</i> NGR234	común	R1, N-metil; R3, O-carbamoyl, R4, O-carbamoil(+/-), R6, 2-O-metilfucosa o 2- Ometil-3-O-sulfocosa o 2-O-metil-4-O- acetilfucosa.
<i>B. japonicum</i>	común	R5, O-acetil(+/-); R6, 2-O-metilfucosa
<i>B.elkanii</i>	común	R1, N-metil(+/-); R3 ó R4 ó R5 (+/-), carbamoyl; R5, O-acetil(+/-); R6, (2-O- metilfucosa; R7, glicerol(+/-)
<i>A. caulinodans</i>	común	R1, N-metil; R5, O-carbamoil; R6, D-arabinosa

- "común": está puesto en los casos donde no hay presente ni α ni β -ácido graso insaturado, pero en general aparecen grupos como ácido cis-vaccénico

-(+/-); indica que tal grupo no siempre está presente.

-si no está indicado de otra manera; R1 representa hidrógeno y R3, R4, R5, R6 y R7 grupos hidroxilos.

Desde el punto de vista químico, los factores Nod constan de una estructura básica formada por 3 - 5 residuos de N-acetilglucosamina unidas por enlaces β -1,4 que llevan en el C2 del azúcar del extremo no reductor un ácido graso. La estructura básica del lipoquitooligosacárido, es sintetizada por el producto de los genes *nod A*, *nod B* y *nod C*. Dicha estructura básica tipo quitina es posteriormente modificada por otras proteínas Nod, codificadas por los genes *nod* específicos. Estas modificaciones son las que determinarán la especificidad de señal desde la bacteria a un determinado hospedante. (Ver la Figura I.2).

En el caso de *S. meliloti* la especificidad sobre alfalfa está determinada por un grupo

sulfato que se encuentra en el C₆ del extremo reductor del factor Nod. La incorporación del grupo sulfato está catalizada por el producto del gen *nodH* que codifica una sulfotransferasa (Laeremans *et al.*, 1996). Mutantes de *S. meliloti* carentes del grupo sulfato (mutantes *nodH* por ejemplo) son incapaces de formar hilos de infección en alfalfa. (Debellé *et al.*, 1986; Horvath *et al.*, 1986; Faucher *et al.*, 1988).

Estos compuestos de naturaleza lipo-sacarídica indujeron cambios específicos en la leguminosa huésped del rizobio de donde fueron purificados. Así, se ha descrito efectos como la aparición de alteraciones en el desarrollo de la raíz de vicia (van Brussel *et al.*, 1986; Zaat *et al.*, 1987) e inducción de la división de las células corticales en vicia (Spaink *et al.*, 1991), la deformación (Faucher *et al.*, 1988) y depolarización de pelos radiculares en alfalfa (Ehrhardt *et al.*, 1992) y la activación del ciclo celular y de la ruta de biosíntesis de isoflavonoides en suspensiones celulares de alfalfa (Savouré *et al.*, 1994). Para el caso de vicia, Heidstra *et al.* (1994) siguieron el curso temporal de la deformación de pelos radiculares en raíces incubadas con lipo-oligosacáridos de *R. leguminosarum* bv. vicia mediante un dispositivo de Fåhræus (1957) y encontraron que las primeras deformaciones eran visibles en una hora. El tiempo mínimo de incubación con lipo-oligosacárido requerido para obtener algún efecto fue de 10 minutos. Los factores Nod influyen en estos procesos de desarrollo alcanzando sus actividades óptimas a muy bajos niveles de concentración (alrededor de 10⁻¹¹M) que son comparables a los niveles óptimos de otros reguladores de crecimiento (Dénarié y Cullimore, 1993; Fry *et al.*, 1993). Hirsch *et al.* (1989) encontraron que algunas de las actividades inducidas por factores Nod pueden obtenerse también con inhibidores de auxinas.

El lipo-oligosacárido producido por *S. meliloti* consiste en un tetrasacárido de β-1,4-N-acetil-D-glucosamina con un grupo sulfato en el C-6 del extremo reductor y en el que el grupo amino del extremo no reductor está sustituido con un resto de ácido graso no saturado de 16 carbonos (Lerogue *et al.*, 1990). Esta especie sintetiza también variantes de cuatro o cinco unidades de N-acetil-D-glucosamina, aciladas en el extremo no reductor con ácidos grasos hidroxilados, bajo el control de los genes *nodD3* y *syrM* (Demont *et al.*, 1994).

La estructura básica de los lipo-oligosacárido deriva de la actividad de los genes "comunes" *nodABC* (Fisher y Long, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993). NodC muestra homología con quitina-sintasas, con lo cual se ha propuesto que cataliza la β-1,4 oligomerización de los monómeros de β-N-acetil-D-glucosamina. NodB deacetila a la N-acetil-D-glucosamina del extremo no reductor (John *et al.*, 1993), lo cual parece ser un requerimiento previo a la transferencia del ácido graso a esa posición por parte de la proteína NodA (John *et al.*, 1993).

Actualmente ya se han dilucidado las estructuras químicas de factores Nod de varias especies de rizobios salvajes y mutantes. El lipo-oligosacárido sintetizado por *R. leguminosarum* bv. vicia es semejante al de *S. meliloti* en su estructura básica, excepto que el ácido graso insaturado es de 18 carbonos, lleva un acetilo en el C-6 del extremo no reductor, y no posee el sustituyente sulfato en el C-6 del extremo reductor (Spaink *et al.*,

1991). Se han determinado también las estructuras de los lipo-oligosacáridos sintetizados por *B. japonicum* (Sanjuan *et al.*, 1992), *A. caulinodans* (Mergaert *et al.*, 1993) y la cepa de muy amplio rango de hospedantes, *Rhizobium spp.* NGR234 (Price *et al.*, 1992). El aislamiento y caracterización de factores Nod muestra que un mismo rizobio produce una familia de factores cuya complejidad depende en muchos casos del rango de hospedadores del rizobio. Los avances en la química de los factores Nod y el análisis sistemático de mutantes ha permitido avanzar en la asignación de funciones biosintéticas a varios de los genes *nod* específicos.

La sulfatación del lipo-oligosacárido de *S. meliloti* está catalizada por las proteínas NodP, NodQ (homólogas a ATP sulfurilasa y APS quinasa, enzimas que generan sulfatos activados) y NodH (homólogas a las sulfotransferasas) (Schedock y Long, 1990, Fisher y Long, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993). Se ha observado que mutantes de *S. meliloti* alterados en *nodH* o *nodQ* producían lipo-oligosacáridos no sulfatados inactivos en alfalfa, pero activos en *Vicia sativa* (Roche *et al.*, 1991). Como se ha indicado, el lipo-oligosacárido de *R. leguminosarum* *bv.* *viceae*, simbiote natural de *V. sativa*, no está sulfatado. En su lugar porta un grupo acetilo en el C-6 de su extremo no reductor. Por análisis de mutantes en *nodL* se ha deducido que el producto de este gen estaría vinculado a la unión del O-acetilo en esa posición. La especificidad de estos lipooligosacáridos parece residir también en las características del ácido graso N-ligado del extremo no reductor. Las proteínas NodF y NodE son homólogas a transportadores de grupos acilo (Shearman *et al.*, 1986) y β -cetoacil sintasa (Kondorosi *et al.*, 1991) respectivamente, y son requeridas para la unión del ácido graso al extremo no reductor (Spaink *et al.*, 1991). Por su parte la proteína NodG tiene homología con reductasas, y se cree que estaría vinculada a la modificación de la cadena de ácido graso. NodI y NodJ formarían el sistema de transporte del factor Nod a través de la membrana (Fisher y Long, 1992).

El estudio de los mecanismos moleculares a través de los cuales los factores Nod participan de la simbiosis es actualmente estudiado con intensidad. Es notable que estos lipo-oligosacáridos guardan una estrecha relación estructural con las quitinas (de allí que también se los designe con el nombre de lipo-quitooligosacáridos) las cuales funcionan como disparadores de respuestas de plantas frente al ataque de patógenos mediante la inducción de la síntesis de fitoalexinas por la ruta de los fenilpropanoides (Lamb *et al.*, 1989; Dixon y Lamb, 1990; Long y Staskawicz, 1993). De hecho, Savouré *et al.* (1994) han observado que la presencia de lipo-oligosacáridos de rizobios induce la síntesis de flavonoides. Estas y otras consideraciones llevan a la especulación que las simbiosis rizobio-leguminosa pueden haber evolucionado a partir de interacciones planta-parásito (patógeno). Por otra parte los fragmentos de quitinas disparadores de mecanismos de defensa y los lipo-oligosacáridos de rizobios están estructuralmente relacionados con las oligosacarinas, morfógenos vegetales vinculados a los procesos de desarrollo y diferenciación (Benz *et al.*, 1986). Desde el punto de vista funcional, los factores Nod ejercen sus funciones comportándose como señales similares a las oligosacarinas endógenas de la planta. (Fry *et al.*, 1993). Como hemos mencionado en párrafos

precedentes las sustituciones presentes en los factores Nod con esqueleto de quitinas participan en determinar la especificidad de la señal respecto a la leguminosa blanco. Además, las "decoraciones" de los lipo-oligosacáridos de *Rhizobium* hacen que sus bacterias emisoras no sean percibidas como patógenos por las raíces de la planta hospedadora (Fisher y Long, 1992). Este efecto se contrapone a las reacciones de defensa generadas por fragmentos de quitina provenientes de microorganismos patógenos. Staehelin *et al.* (1994) observaron que cultivos celulares de tomate eran capaces de percibir lipo-oligosacáridos de *R.spp.NGR234*, *R. leguminosarum* bv *viceae* y bv. *phaseoli*, *S. meliloti* y *B. japonicum*. Una de las respuestas de la planta frente a los elicitores del tipo quitina es el incremento de la actividad de quitinasa en las raíces. Staehelin *et al.* (1994) encontraron que la actividad inductora de quitinasas por parte de los rizobios depende del tipo de decoraciones sobre el esqueleto de quitina, así el lipo-tetrasacárido sulfurilado de *S. meliloti* induce una muy baja actividad de quitinasa en alfalfa mientras que su análogo no sulfurilado es rápidamente degradado. En raíces de *Vicia* por el contrario esta señal que es simbióticamente activa sobre la planta induce muy bajos niveles de actividad de quitinasa (Staehelin *et al.*, 1994).

Todas estas evidencias señalan que el reconocimiento rizobio-leguminosa puede haber evolucionado para adaptar a la planta a discriminar en favor de simbioses y en contra de patógenos. Sobre esta base, es posible que pares simbióticos rizobio-leguminosa geográficamente aislados puedan haber dado lugar a la aparición independiente de los grupos de inoculación cruzada incompatibles, cada uno con su propio juego de señales simbióticas.

1.5.1.4. El proceso de Adsorción a la superficie radicular.

El intercambio de señales solubles entre los simbioses forma parte de un proceso complejo por el cual se producen modificaciones funcionales muy tempranas en la bacteria y en la planta. Los rizobios se unen a la planta en un proceso conocido como adsorción. Dicho proceso es el paso visible previo a la infección de las raíces. Históricamente ha sido en esta etapa donde primero se ha investigado la posible evidencia de la especificidad que refleja el comportamiento global de la asociación.

Una de las razones por las que ha sido difícil avanzar en el estudio de los mecanismos de adsorción ha sido la diversidad de metodologías, poco comparables entre sí que han sido utilizadas por los distintos laboratorios. Este hecho ha dificultado mucho la contrastación de resultados. Inóculos muy diluïdos (del orden de 10^3 bacterias/ml) permiten detectar efectos mediados por factores presentes en baja concentración (Caetano Anollés y Favelukes, 1986; Lagares, 1989; Wall y Favelukes, 1991) pero impiden virtualmente la observación microscópica directa de las escasas bacterias sobre las raíces, obligando a su cuantificación por métodos indirectos (Caetano Anollés y Favelukes, 1986). Consideraciones inversas pueden aplicarse a metodologías que usan inóculos concentrados (mayores que 10^7 bacterias/ml), (Dazzo *et al.*, 1976; Smit *et al.*, 1986), en cuyo caso se pierde de vista la influencia de las etapas iniciales del proceso de adsorción,

no se sabe si los acúmulos de bacterias que se observan sobre los pelos radiculares se formaron con anterioridad (en el precedente cultivo del inóculo bacteriano) o durante el proceso de adsorción; ni si estos acúmulos observados *in vitro* representan un estado fisiológico observable en condiciones naturales teniendo en cuenta que ni en suelos ni en la rizosfera se observan concentraciones bacterianas tan altas (Kluepfel, 1993). Caetano Anollés *et al.* (1989) encontraron que el proceso de adsorción es sensible a la acidez del medio de incubación. Se han observado disminuciones marcadas de la adsorción cuando el pH del medio de incubación de plantas y bacterias era menor que 6,0 (Richardson *et al.*, 1988). El progreso del estado adsorbido en el tiempo ha sido también analizado. Así Wall y Favelukes (1991) reportaron que la adsorción de *S. meliloti* a raíces de alfalfa atraviesa una fase lenta de aproximadamente 3 horas desde el comienzo de la incubación. Es posible que las bacterias modifiquen en el tiempo las características de su estado adherido. Dazzo *et al.* (1984) hallaron, que en las primeras horas de incubación *R. leguminosarum* bv. trifolii se adsorbe a las raíces de trébol con una orientación al azar, pero luego de 12 horas de incubación las bacterias se orientan en una forma polar. Esta orientación sería consecuencia de modificaciones superficiales, inducidas por enzimas de la planta liberadas en el exudado radicular. En relación a cambios superficiales inducibles por componentes exudados por la bacteria sobre la planta, Ehrhardt *et al.*, (1992) mostraron que la incubación de raíces de alfalfa con factor Nod purificado produce depolarización de los pelos radiculares en minutos. Posteriormente Heidstra *et al.*, (1994) demostraron que las superficies de los pelos radiculares sufren cambios inducidos por los factores Nod en muy cortos períodos de tiempo (10 minutos a 1 hora). Estas observaciones señalan que la diversidad de tiempos de incubación planta-bacteria utilizados por los distintos autores seguramente han introducido una variable no controlada en los ensayos de adsorción.

La diversidad de estudios de adsorción incluye el empleo de cultivos celulares desdiferenciados cuyas superficies no tienen por qué ser similares a las de la raíz, y mucho menos producir exudados que contengan el mismo tipo de sustancias que los exudados radiculares (Ho *et al.*, 1988). Como lo demostraron Wall y Favelukes (1991) éstos juegan un papel decisivo en el proceso de adsorción. El estado de crecimiento del inóculo bacteriano también condiciona la adsorción (Vesper y Bauer, 1985; Caetano Anollés y Favelukes, 1986; Kijne *et al.*, 1988; Wall y Favelukes, 1991).

Las primeras evidencias sobre las bases moleculares del fenómeno del reconocimiento simbiótico en la adsorción fueron encontradas por Bohlool y Schmidt quienes en 1974 demostraron que la lectina de soja (SBL) se unía específicamente a 25 de 28 cepas de *B. japonicum*, mientras que no lo hacía a ninguna de 23 cepas de otras especies de *Rhizobium*. Sobre la base de estos resultados postularon que las lectinas de las leguminosas podrían ser responsables del reconocimiento de los rizobios simbióticos. No se conoce aún cuales son los mecanismos bioquímicos a través de los cuales las lectinas son requeridas durante el proceso simbiótico.

Smit *et al.* (1987, 1989, 1991) y Kijne *et al.* (1988) aislaron y caracterizaron una proteína de la superficie de *R. leguminosarum* bv. viceae, a la que denominaron "rhicaadhesina". Esta

proteína un Ca^{+2} , se encuentra en bacterias del género *Rhizobiaceae* y actúa como adhesina, probablemente uniéndose a un receptor en la raíz (de estas características deriva su nombre). Dichos autores reportaron que en un amplio rango de sistemas simbióticos, la adsorción de cualquier especie de rizobios puede ser inhibida mediante el pretratamiento de las plantas hospedantes con preparaciones crudas de rihcaadhesina, provenientes no solo de la propia bacteria sino también de un amplio espectro de especies ensayadas (Smit *et al.*, 1989). Por otro lado, cuando *R.leguminosarum* bv. viceae crece en medio triptona-extracto de levadura (TY) con bajos niveles de Ca^{+2} (0.35mM) pierde su rihcaadhesina, la cual puede recuperarse del medio de cultivo. En estas condiciones, la adsorción a raíces de arveja se encuentra muy disminuída (Smit *et al.*, 1987). La adsorción a raíces de arveja, tanto de *R.leguminosarum* bv. viceae, como de *R. leguminosarun* bv. phaseoli, o de *A.tumefaciens*) crecidos con bajos niveles de Ca^{+2} se recupera cuando dichas raíces son pretratadas con rihcadhesina de *R. leguminosarum* bv. viceae (Smit *et al.*, 1991). Estos resultados sugieren fuertemente que dicha proteína participa en el establecimiento de la unión bacteria-raíz y de un modo no específico.

Finalmente, Smit *et al.*, (1986) encontraron una fuerte correlación entre la capacidad de adsorción de *R. leguminosarum* bv. viceae a raíces de arveja y su capacidad de formar fibrillas extracelulares: ambas capacidades fueron transitorias en crecimientos en *batch* siendo máximas en fase logarítmica tardía. Además, estas bacterias forman películas sobre la superficie de medios líquidos no agitados, en cuya condición poseen un alto contenido de fibrillas. En esta condición poseen una capacidad para la adsorción mucho mayor que la de bacterias crecidas en medios agitados (Smit *et al.*, 1986). Anteriormente Dazzo *et al.*, (1984) habían demostrado que cierto tiempo después de haberse adsorbido a raíces de trébol *R. leguminosarum* bv. trifolii forma abundantes microfibrillas, que según estos autores, ayudarían al anclaje de los rizobios a la superficie del pelo radicular.

En general se puede concluir que la adsorción llevada a cabo por células con fimbrias es más firme, que la mayor adhesividad obtenida de esta forma no se traduce en una mayor infectividad y que la adsorción polar no es un requisito para la nodulación. Vesper *et al.* (1987) sugirieron que es posible, sin embargo, que la capacidad de desarrollar una adsorción más firme confiera ventajas para la colonización rizosférica.

1.5.2. La infección

-Penetración de los pelos y desarrollo de nódulos radicales.

A continuación de la adsorción firme y la colonización rizosférica, tiene lugar la infección de los pelos radicales. Normalmente los pelos radicales son rectos y sus extremos presentan un aspecto liso, con un contenido relativamente bajo de celulosa. Cuando las raíces se inoculan con rizobios ocurren una serie de cambios morfológicos característicos: los pelos se deforman, a veces se ramifican y presentan un punto refringente en su extremo apical. Entre estas deformaciones es particularmente importante el enrulado (*curling*) que consiste en un encurvamiento del pelo, observable solamente cuando la inoculación se realiza con rizobios homólogos (son aquellos rizobios capaces de

asociarse simbióticamente con la planta en cuestión). EL enrulamiento se observa en pelos en desarrollo, y parece deberse a un crecimiento desigual a uno y otro lado de una sección longitudinal del pelo, provocado por factores liberados por los rizobios. Es posible que los factores Nod participen de este proceso. Como se explicó, los factores Nod inducen deformaciones de los pelos radiculares. Rizobios adsorbidos a la punta de los pelos radiculares en desarrollo pueden colonizar preferentemente uno de sus lados, y liberando allí factores Nod, provocar el crecimiento desigual y el enrulado (Kijne, 1992). El enrulado conduce al englobamiento de los rizobios por parte del pelo, lo que a su vez permitiría la concentración de factores requeridos para el inicio de la infección. Esta se realiza mediante una invaginación de la pared del pelo, a través de la cual los rizobios penetran hacia el interior de las capas corticales de la raíz formando el hilo de infección. Se ha propuesto que las lectinas de la planta intervienen en la formación del hilo de infección (Halverson y Stacey, 1986; Díaz 1989; Díaz *et al.*, 1989; Brelles Mariño, 1993).

A pesar de la penetración de los rizobios dentro del pelo radical, los mismos no se encuentran físicamente dentro de la célula vegetal ni en contacto con el contenido citoplasmático. Tal separación física entre los rizobios y el interior de la célula vegetal se conservará en los nódulos radiculares maduros fijadores de nitrógeno.

En relación a la eficiencia de las infecciones que se inician, puede verse que no todos los hilos de infección terminan en la formación de nódulos. Se observa comúnmente un gran número de hilos de infección abortivos. Pueppke (1986) observó que plantas de soja podían formar una

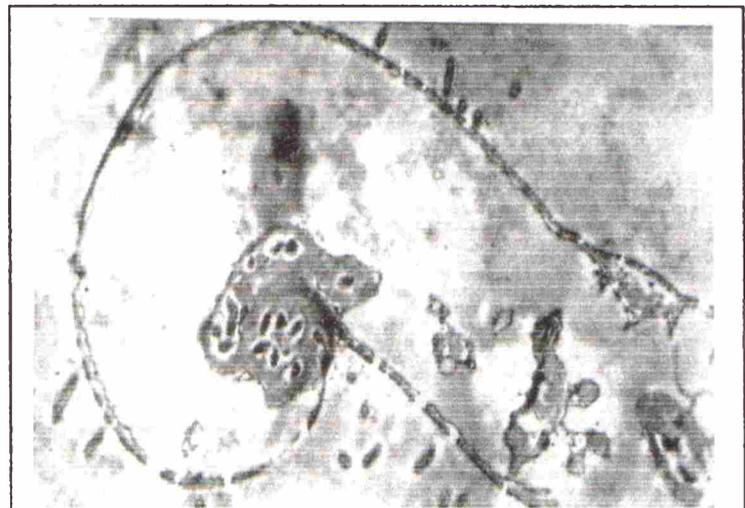


Figura 1.3. Enrulado de un pelo radical e iniciación de la infección. Típico enrulado de un pelo radical de alfalfa mostrando los rizobios englobados y el inicio de la formación del hilo de infección. Reproducido de Sahlman y Fahreaus (1963)

cantidad de nódulos similar cultivadas en hidroponia (en bolsas plásticas, Bhuvanewari *et al.*, 1980) o en suelo estéril. Sin embargo, observó un número de hilos de infección unas 30 veces mayor en cultivos hidropónicos, lo que implica que en esa condición el número de infecciones abortivas (que no llegan a formar nódulos) debe ser también mayor. El crecimiento de los hilos de infección parece detenerse (abortar) en una forma controlada por la planta. Bhuvanewari *et al.*, (1980; 1981) encontraron que la zona radicular susceptible para la infección son los pelos radiculares en desarrollo, y que esta susceptibilidad es transitoria: la mayor parte de los nódulos se forman cerca de la zona donde se encontraban los pelos radiculares en desarrollo al momento de la inoculación. Esto señala la posibilidad de que la formación de los primeros nódulos inhibe la formación

posterior de nódulos. Este tipo de regulación ha sido estudiado en detalle tanto en soja (Caetano Anollés y Gresshoff, 1990) como en alfalfa (Caetano Anollés y Bauer, 1988). A través de un mecanismo sistémico, la planta controla el número de nódulos totales que se desarrollan en la raíz (Caetano Anollés y Gresshoff, 1991). Es posible que a través de esta regulación, la planta nivele sus demandas de nitrógeno fijado con su capacidad de aportar fotosintatos para el funcionamiento de los nódulos (Caetano Anollés y Gresshoff, 1992). Es interesante notar que la obtención de nitrógeno como NO_3^- posee un costo energético menor para la planta que la fijación simbiótica de nitrógeno, y que en presencia de NO_3^- , la nodulación se ve inhibida en una forma que también esta controlada por la planta en forma sistémica con una participación importante de la parte aérea (Streeter, 1988). Parece ser entonces que la regulación de la nodulación por parte de la planta opera tanto a nivel de reconocimiento de la presencia de fuentes de nitrógeno fijado (lo que inhibe la nodulación) como a nivel del número de infecciones exitosas permitidas (si no dispone de nitrógeno fijado), con objeto de ajustar sus necesidades biosintéticas a sus disponibilidades energéticas.

El inicio y crecimiento de los hilos de infección es un proceso complejo caracterizado por la participación de señales del rizobio y requerimientos de ciertas estructuras superficiales de la bacteria cuya ausencia resulta en el aborto o ausencia de las infecciones. Así, ciertos componentes superficiales de la bacteria parecen tener un rol en la modulación de la infección.

Entre estos componentes se encuentran los polisacáridos capsulares (CPS), el exopolisacárido (EPS) y los lipopolisacáridos (LPS), componentes de la membrana

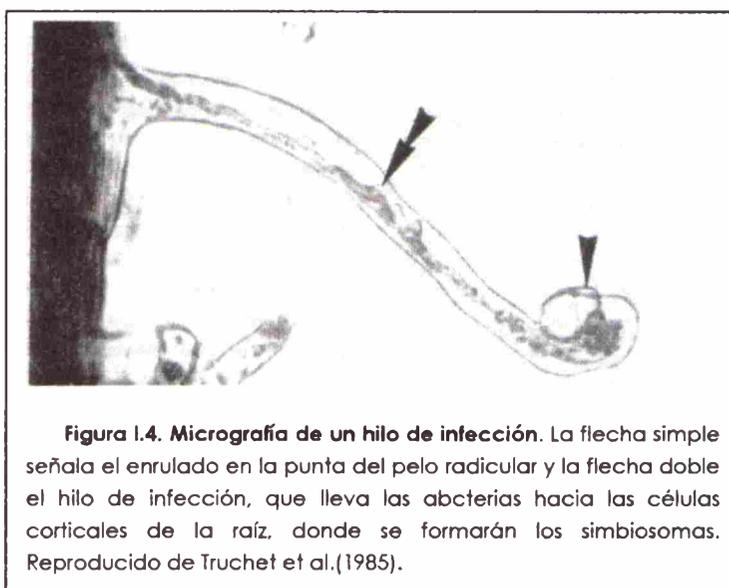


Figura 1.4. Micrografía de un hilo de infección. La flecha simple señala el enrollado en la punta del pelo radicular y la flecha doble el hilo de infección, que lleva las bacterias hacia las células corticales de la raíz, donde se formarán los simbiosomas. Reproducido de Truchet et al.(1985).

externa de las bacterias gram negativas (Leigh J y DL. Coplin. 1992; Lugtenberg B y van Alphen L., 1983). En el sistema de alfalfa, el exopolisacárido de *S. meliloti* está involucrado en disparar la regulación de la nodulación por retroinhibición (Caetano Anollés et al., 1990). En trébol, Dazzo et al. (1991) describieron que el LPS de *R. leguminosarum* bv. trifolii modula el crecimiento del hilo de infección. Noel et al. (1986) y Cava et al. (1989) aislaron mutantes de *R. leguminosarum* bv. phaseoli por inserciones sencillas de *Tn5*, alterados en sus LPS, que desarrollaban hilos de infección abortivos y mostraban alteraciones en su capacidad de inducir el desarrollo de nódulos. Prier (1989) realizó observaciones similares en *R. leguminosarum* bv. viceae, y encontró que las alteraciones en el LPS se deben a un conjunto de genes estrechamente ligados en el cromosoma. Lagares et al., (1992) aislaron

un mutante de *S. meliloti* con el LPS alterado que mostraba un retardo en la formación de nódulos y una muy reducida capacidad competitiva frente al parental del tipo silvestre. Es interesante señalar que este mutante es el mismo que se mostró incapaz de eliminar la actividad estimuladora de la adsorción presente en el exudado radicular de alfalfa (Luis Wall, tesis doctoral). Aún no está claro el mecanismo bioquímico por el cual ciertos polisacáridos externos de los rizobios son requeridos para el normal desarrollo del hilo de infección.

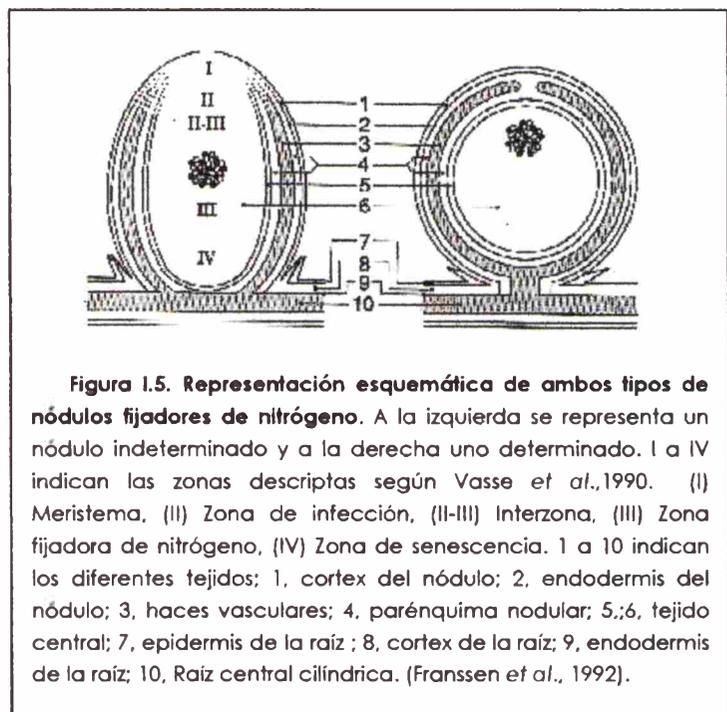
Paralelamente con la formación del hilo de infección, se inducen divisiones mitóticas en las zonas corticales de la raíz. Los factores Nod secretados por los rizobios juegan un papel decisivo en la inducción de esta actividad (Dénarié y Cullimore, 1993). En ese proceso y durante el curso de la infección, células corticales sufren una desdiferenciación y se dividen, conduciendo a la formación de un meristema, cuya función será generar el tejido en crecimiento del nódulo. Estos órganos poseen un alto grado de diferenciación y organización, con diferentes tipos de células y tejidos. En un nódulo indeterminado como el de alfalfa se encuentra un meristema apical, una zona de infección, una zona de células conteniendo simbiosomas fijadores de nitrógeno, una zona de senescencia y tejido vascular periférico. En la Figura 1.5 se compara la estructura de estos nódulos indeterminados con la de los nódulos determinados como los que se desarrollan en soja y poroto por ejemplo. Durante la ontogénesis de ambos tipos de nódulos se expresan en forma altamente coordinada una serie de proteínas específicas llamadas nodulinas (Verma *et al.*, 1991). De acuerdo al curso temporal de su expresión pueden distinguirse dos conjuntos de nodulinas: nodulinas tempranas y tardías. La mayoría de las nodulinas tempranas consisten en proteínas cuya función precisa se desconoce, aunque se le atribuye carácter estructural (por ejemplo, proteínas ricas en hidroxiprolina, como ENOD2 Y ENOD12), mientras que las nodulinas tardías estarían relacionadas con el funcionamiento metabólico del nódulo (ej.: leghemoglobina, glutamina sintetasa). Los genes que codifican para las nodulinas derivarían de genes que codifican funciones similares en otros órganos de la planta, como ha sido sugerido en base a la similitud de funciones y homologías de secuencia (Verma *et al.*, 1991). Hirsch y colaboradores (1989) han mostrado que ciertos inhibidores del transporte de auxinas son capaces de inducir la formación de pseudonódulos (nódulos carentes de bacterias) y la expresión de nodulinas. Esta observación adquiere especial interés respecto del posible rol de los factores Nod en la ontogénesis del nódulo, ya que dichos factores también inducen la expresión de nodulinas, mitosis y formación de tejido meristemático (Truchet *et al.*, 1991; Spaik *et al.*, 1991; Bisseling *et al.*, 1992; Kondorosi *et al.*, 1992; van Brussel *et al.*, 1992; Pichon *et al.*, 1993; Saviouré *et al.*, 1994). Dada su similitud estructural con moléculas de tipo oligosacarinas, es posible que los factores Nod ejerzan su función como reguladores del crecimiento y desarrollo de la planta (Fry *et al.*, 1993). En este sentido, de Jong *et al.* (1992) observaron que factores Nod obtenidos de *R. leguminosarum* bv. *viceae* también tienen actividad embriogénica en callos de zanahoria.

Ya ha sido descrita la capacidad de los rizobios de producir otros factores de crecimiento y diferenciación además de los factores Nod. Morris, (1986) ha mostrado que rizobios y otros microorganismos que interactúan con plantas sintetizan componentes reguladores del crecimiento. Badenoch Jones *et al.* (1982) ya habían observado ácido indolacético en sobrenadantes de cultivos de *Rhizobium*, y con esto sugirieron que tendría un rol en el enrulado de los pelos radiculares y la iniciación del nódulo. Sin embargo esta línea de investigación no ha sido explorada con intensidad en apoyo de nuevos estudios. Del conjunto de evidencias bioquímicas y genéticas disponibles actualmente puede concebirse la siguiente secuencia de eventos durante la infección de leguminosas por rizobios: luego de un intercambio de señales solubles tempranas (flavonoides, factores Nod), y de un acercamiento (quimiotaxis) y adhesión de las bacterias a la raíz, el rizobio induce la desorganización local (vía enzimática?, pectinasas/ celulasas?) de los pelos radiculares. Se empieza a producir luego una invaginación de la membrana citoplásmica de la célula del pelo, que va avanzando hacia su base: este es el cordón o canal de infección, que conforme va creciendo en longitud, se va recubriendo de celulosa. El canal sigue prolongándose, atravesando varias capas de células corticales de la raíz y en su interior los rizobios avanzan, y se multiplican activamente. El canal que puede producir ramificaciones, llega finalmente a algunas de las células del cortex de la raíz. Entonces el canal produce vesículas cerradas, por endocitosis englobando a uno o varios rizobios. Paralelamente a la formación de los canales de infección, en la corteza radicular, ciertas células se activan y se dividen mitóticamente para formar el primordio nodular.

En las leguminosas de climas templados, como *Pisum sativum*, *Medicago sativa* y *Trifolium*, las células que se dividen son las células más internas de la corteza radicular y

progresivamente se van reactivando y dividiendo las células más alejadas, formando así el primordio nodular. Las células de la parte distal del primordio, comienzan a hacerse pequeñas y aumenta el contenido citoplásmico, constituyendo el meristema apical del nódulo. Gracias a este meristema el nódulo estará en continuo crecimiento, dando lugar a un nódulo indeterminado. Dichos nódulos son de forma cilíndrica. (Ver Figura 1.5).

En las leguminosas tropicales, como *Phaseolus Vigna* y *Lupino*, son las células externas de la corteza radicular las que se reactivan y dividen para formar el primordio nodular



(Caetano Anollés y Gresshoff, 1992). Las células centrales del primordio, al ser infectadas pierden la capacidad de división, sin embargo, las células de la periferia permanecen mitóticamente activas. Como serán infectada más tarde, se forma un meristema esférico que pierde su actividad unos 10 días después de la infección, dejando entonces el nódulo de crecer dando lugar a nódulos determinados (van Rhijn *et al.*, 1995) y dichos nódulos son de forma esférica. (Ver Figura 1.5).

Los factores Nod son capaces de producir esta activación mitótica de las células radicales. El mecanismo por el que produce esta activación parece ser debido a un desequilibrio en el balance normal de las hormonas vegetales auxinas/citoquininas. (Hirsch *et al.*, 1994).

Los nódulos son, por tanto, nuevos órganos generados en la raíz producidos por la proliferación activa de las células del cortex que albergan a los simbiosomas conteniendo a las bacterias. El nódulo posee su sistema de xilema y floema, comunicado con el de la raíz, y rodeado por una corteza de células normales diploides. Estas bacterias sufren un proceso gradual de diferenciación a bacteroide, forma de la bacteria capacitada para realizar la FBN (ver sección siguiente). El bacteroide pierde su forma habitual bacilar, adquiere una nueva morfología (alargados, en forma de letra "Y", ovoides, hinchados) acumula reservas (poli-beta-hidroxibutirato) y pierde su capacidad de dividirse y de volver a su estado anterior. Se constituye así en un verdadero "reactor" fijador de nitrógeno hasta que se produce la senescencia del tejido y del simbiosoma que lo contiene.

1.5.3. Fijación simbiótica de nitrógeno – Expresión de la nitrogenasa.

La reacción de fijación de N_2 consiste en la reducción de esta molécula a amonio por parte de los rizobios. La mayor parte de este es metabolizado posteriormente, en el citosol de las células vegetales, a los aminoácidos glutamina y glutamato, por las enzimas glutamina sintetasa y glutamato sintetasa. Los aminoácidos producidos pasan al xilema y se distribuyen al resto de la planta. El proceso de FBN está catalizado por la enzima nitrogenasa que está formada por dos componentes proteicos, el dímero de componente II (ferroproteína) y el tetrámero de componente I (molibdo-ferroproteína). Para que la nitrogenasa actúe como catalizador de la reacción necesita ser activada por ATP que se hidroliza dando ADP y fosfato inorgánico. La cantidad de ATP utilizado por mol de nitrógeno reducido es variable según las condiciones y se estima entre 15-25 moles.

La nitrogenasa además de catalizar la reducción de sustrato natural, el nitrógeno molecular, es capaz de utilizar otros sustratos, especialmente aquellos que poseen triples enlaces o potenciales triples enlaces en posición terminal, carbono-carbono, carbono-nitrógeno o nitrógeno-nitrógeno. La reducción de protones a hidrógeno molecular es otra reacción catalizada por la nitrogenasa, que ocurre normalmente de forma simultánea con la reducción del nitrógeno, esto le supone una pérdida energética de la eficiencia del sistema fijador, ya que consume ATP. Algunas cepas de rizobio poseen hidrogenasa capaz de reciclar el hidrógeno producido, recuperando el ATP y mejorando la eficiencia (Orive *et*

al., 1983).

La enzima nitrogenasa es altamente sensible al oxígeno, inactivándose de forma irreversible, e incluso inhibiéndose su síntesis en presencia de este elemento. La protección al oxígeno de la nitrogenasa se debe a diferentes mecanismos que incluyen la síntesis de la leghemoglobina, nodulina tardía, asociada a la membrana que rodea al bacteroide. Como consecuencia de ello el interior del nódulo efectivo es de color rosa debido a las grandes cantidades de leghemoglobina. La leghemoglobina es una hemoproteína con hierro, cuyo grupo hemo es sintetizado por la bacteria y la porción proteica es sintetizada por la planta. Esta molécula suministra oxígeno al bacteroide a una tasa apropiada para que sea empleado de forma óptima como aceptor terminal de electrones de una cadena transportadora aeróbica que trabaja a bajas tensiones de este gas y permite que haya en el nódulo la tensión baja de oxígeno que no afecte a la actividad de la nitrogenasa. Una vez que en el interior del bacteroide se alcanza una tensión de oxígeno suficientemente baja, se inducen los genes *nif*, que codifican el complejo nitrogenasa y otras proteínas regulatorias involucradas en el control de la FBN.

1.5.4. Competición de los rizobios por el nicho simbiótico. Transferencia horizontal de genes y modificaciones de la capacidad simbiótica.

La inoculación de semillas de leguminosas con cepas seleccionadas de *Rhizobium* tendiente a la obtención de un buen sistema de nódulos con alta eficiencia en la fijación de nitrógeno es una práctica que rinde cada vez menores beneficios. Esto se debe en gran medida a la presencia de diversas cepas nativas de rizobios capaces de nodular (muchas veces ineficientes), o que devienen naturalizadas en los suelos de las áreas de cultivo, y que compiten eficientemente con las cepas inoculadas para la ocupación de nódulos. En un estudio del impacto de la inoculación sobre el rendimiento llevado a cabo en la isla Maui (EEUU) con soja, poroto de Lima, caupí, poroto común, maní, alfalfa, trébol, y las leguminosas tropicales *Leucaena leucocephala* y *Lathyrus tingeatus* en cinco sitios bien caracterizados con población naturalizada (excepto *B. japonicum*), Thies *et al.* (1991) concluyeron que una población de tan solo 50 rizobios infectivos por gramo de suelo es suficiente para que el inoculante no tenga efecto sobre el rendimiento. Para poder obtener rendimientos significativamente mayores que un control sin inocular, la ocupación de nódulos por la cepa introducida no debía ser menor que 66%.

Las cepas que componen la población naturalizada derivan en general de antiguos inoculantes que se han multiplicado en el suelo y se han adaptado a las condiciones locales. Por ejemplo, Beynon y Josey (1980) reportaron que en un suelo de Hainford (Inglaterra) existe una población de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* muy heterogénea, adaptada a dicho suelo y muy eficiente para competir por la nodulación de poroto frente a una cepa inoculada. Young (1985), en un estudio de polimorfismos enzimáticos sobre aislamientos de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *trifolii* y *viceae* y *S. meliloti* de un mismo suelo encontró fuertes semejanzas entre los tipos electroforéticos de varias

cepas de distintos biovares de *R. leguminosarum*, incluso compartidas en algunos casos con *S. meliloti*, con lo cual sugirió que debe existir en estos suelos una apreciable transferencia horizontal de genes (particularmente a través del plásmido simbiótico o pSym) entre estos biovares. Más tarde, Segovia *et al.* (1993) hallaron que *R. leguminosarum* bv. phaseoli puede ser reclasificado en al menos dos especies. Una de ellas de origen americano, propuesta como *R. etli*, la cual posee en el gen que codifica para la subunidad 16S del rRNA una secuencia nucleotídica divergente de la de *R. leguminosarum*, aunque las características del pSym de *R. etli* y *R. leguminosarum* bv. phaseoli son similares. De acuerdo a ello, Segovia *et al.* (1993) propusieron que los aislamientos europeos de *R. leguminosarum* bv. phaseoli derivarían de la transferencia horizontal del pSym de *R. etli* llevados con la introducción de cultivares de poroto (de origen americano) a cepas locales de *R. leguminosarum*, de origen europeo. En otros estudios, Segovia *et al.* (1991) consiguieron aislar una gran cantidad de cepas de *Rhizobium* no nodulantes de la rizosfera de plantas de poroto cultivadas en suelo de Tepoztlán (Mexico), donde nunca se había inoculado con cepas comerciales. Al caracterizar genética y microbiológicamente dichas cepas, hallaron que la secuencia del rRNA 16S era idéntica a la de *R. etli* y que eran capaces de nodular poroto cuando se les transfería el pSym de *R. etli*. En la población total de dichas rizosferas, estas cepas eran mayoritarias en una proporción de 40:1 frente a cepas nodulantes. La transferencia del plásmido pSym en suelos fue observada por Kinkle y Schmidt (1991) entre *R. fredii* y *R. leguminosarum* bv. viceae. En suelos esterilizados observaron una frecuencia de transferencia de 10^{-4} por célula receptora. En suelos no estériles, la frecuencia fue menor, aunque se incrementaba en las rizosferas. Estas observaciones muestran la complejidad de la dinámica de la información genética entre cepas de rizobios y otras bacterias relacionadas en condiciones naturales de suelo.

El plásmido pSym puede transferirse aún a otras especies taxonómicamente más alejadas de *Rhizobium*. Hooykaas *et al.* (1981) mostraron que este plásmido puede transferirse a *A. tumefaciens*, donde se replica en forma estable y le confiere la capacidad de nodular, y más tarde Plazinski y Rolfe (1985) reportaron la transferencia exitosa del pSym de *R. leguminosarum* bv. trifolii a *Pseudomonas* y *Lignobacter*. Los transformantes de este último género fueron capaces de nodular trébol, con formación de hilos de infección y liberación de bacteroides en estructuras semejantes a nódulos, pero no fijaron nitrógeno. Jarvis *et al.* (1989) reportaron que aislamientos de bacterias no rizobianas del suelo son transformables con pSym y ganan la capacidad de expresar genes Nod. Rao *et al.* (1994) observaron que el pSym de *R. leguminosarum* bv. trifolii puede transferirse en el suelo a una cepa nativa posiblemente relacionada con *R. loti*, la cual, una vez transformada, gana la capacidad de nodular trébol y competir más eficientemente por la nodulación que la cepa donadora del plásmido.

Todas estas evidencias señalan que a) puede ser común la existencia en los suelos de cepas bacterianas incapaces de nodular pero competitivas de las etapas de preinfección (por ejemplo, podrían interferir en el intercambio de señales, secuestrar

lectinas o factores relacionados, ocupar sitios de adsorción, competir por la colonización rizosférica) y b) a partir de un inoculante introducido en el suelo, por transferencia horizontal del pSym a la población rizobiana (y aún no rizobiana) adaptada, puede generarse una población altamente competitiva para la nodulación y para la permanencia en dicho suelo, pero cuya eficiencia para la fijación de nitrógeno en el cultivar de interés podría estar disminuida. Como resultado, la mayor parte de los nódulos de una leguminosa cultivada en un suelo con una microflora tal podría estar ocupada por cepas de capacidad incierta para la fijación de nitrógeno (aún cuando se haya inoculado con una cepa de buena calidad), y el aporte del inoculante para la fijación de nitrógeno y el rendimiento podría quedar minimizado. En estas condiciones, pueden existir pobres aumentos de rendimiento luego de la inoculación haciendo no recomendable su aplicación.

Una estrategia posible frente a esta situación es la preparación de inoculantes con cepas seleccionadas y/o mejoradas genéticamente para aumentar/modelar su competitividad. Sin embargo existen varias dificultades importantes para implementar este tipo de prácticas de un modo efectivo: 1) el carácter "competitividad" depende de muchos factores ambientales (Dowling y Broughton, 1986) muchas veces interactuantes y cuyo efecto sobre una misma cepa puede variar mucho de un sitio a otro; 2) la falta de caracterización de muchos caracteres presentes en los rizobios y que modulan su competitividad y respuesta a las condiciones del entorno que he mencionado precedentemente (Triplett, 1990). Por lo tanto el mejoramiento de una cepa por medios genéticos es difícil. No obstante, se ha reportado la posibilidad de mejorar la competitividad de *R. etli* mediante la transferencia de un plásmido no simbiótico obtenido de *R. tropici* (Martinez Romero y Rosenblueth, 1990) o la de *B. japonicum* mediante la transferencia de genes llevados en un cósmido, cuya expresión se induce selectivamente en el suelo o en la rizosfera (Bhagwat y Keister, 1992). Alternativamente, pueden seleccionarse cepas ya adaptadas al suelo donde se quiere inocular, que hayan mostrado ser competitivas y mejorarlas para su fijación de nitrógeno mediante la transferencia de pSym o de genes simbióticos de cepas de alta capacidad de fijación de nitrógeno, lo cual es relativamente más fácil y mejor conocido desde el punto de vista genético (véase por ejemplo, de Jong *et al.*, 1982; Lewis-Henderson *et al.*, 1991). El supuesto logro de estos objetivos conduce al futuro problema acerca de cómo se conseguirá introducir en una segunda etapa un eventual nuevo inoculante, si los suelos son poblados con cepas altamente adaptadas y competitivas. Este aspecto, sin embargo, depende de qué estrategias se empleen para limitar la propagación y establecimiento de las cepas inoculadas para preservar de la diversidad de las poblaciones naturalizadas. Aunque muchas veces no existe una buena capacidad simbiótica o fijadora de nitrógeno en las poblaciones nativas, las mismas representan la reserva natural de germoplasma cuyas variantes alélicas es esperable que sean las mejor adaptadas a las condiciones locales de su propio ecosistema.

Otro aspecto vinculado con la bioseguridad y la liberación de germoplasma está

relacionado a disminuir la frecuencia con que los genes que confieren la mayor competitividad no se transfieran horizontalmente a otras cepas. Por otra parte, también existe el problema asociado al método de mejoramiento, en caso de que deba apelarse a las técnicas de DNA recombinante (Lewis-Henderson *et al.*, 1991; Bhagwat y Keister, 1992), ya que es difícil predecir el efecto que pueda tener a largo plazo la introducción en suelos de cepas recombinantes (Triplett, 1990; Kluepfel, 1993).

Una alternativa es el desarrollo de cultivares capaces de ser nodulados selectivamente por cierto grupo de cepas presentes en el inoculante y no por otros a los que pertenece la población del suelo (Triplett *et al.*, 1992). Existe cierto desarrollo de esta posibilidad en EEUU (Sadowski *et al.*, 1987; Cregan *et al.*, 1989) aunque los problemas ecológicos asociados hacen que por ahora esta estrategia no esté disponible en el ámbito de la producción local (por ejemplo, conocimiento exacto de la población rizobiana local, disponibilidad de varios genotipos de interacción cepa-variedad que permitan eludir la influencia de cambios indeseables en las frecuencias genotípicas de la población indígena de rizobios competidores inducidos por la introducción de la nueva variedad)

Finalmente, existe la alternativa de desarrollar nuevos inoculantes que por su formulación hagan que los rizobios sean más competitivos (Paau *et al.*, 1990) al menos en la formación de los primeros nódulos (Kosslak *et al.*, 1983; McDermott y Graham, 1990). Debido a que estos nódulos tempranos ejercen un control por retroinhibición sobre la formación de nuevos nódulos (Caetano Anollés y Gresshoff, 1992), sería posible incrementar la proporción de nódulos ocupados por la cepa del inoculante. Al ser éste más eficiente para la fijación de nitrógeno, aumentar su contribución relativa puede implicar aumentar la fijación de nitrógeno global, con el consiguiente aumento de rendimiento y calidad. Además, por su prevalencia especialmente en los primeros nódulos, tendría una influencia benéfica al aumentar la fijación de nitrógeno en las etapas tempranas del desarrollo de la planta joven, en que es frecuente observar déficit de nutrición nitrogenada.

1.6. FACTORES AMBIENTALES QUE INCIDEN SOBRE EL ESTABLECIMIENTO DE LAS ASOCIACIONES SIMBIÓTICAS RIZOBIO-LEGUMINOSA

La FBN incluye diferentes huéspedes y microsimbiontes entre leguminosas y bacterias pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium* y *Mesorhizobium*. Si bien el éxito de la asociación depende tanto del huésped vegetal como del rizobio, la misma se ve también limitada muchas veces por factores climáticos y edáficos. Estos factores afectan a cada uno de los simbioses y al proceso de asociación en sí mismo.

Algunas leguminosas son especialmente sensibles a ciertas condiciones de estrés ambiental, situaciones en las que se perturba seriamente el proceso de asociación y de

fijación de nitrógeno que necesitan de un crecimiento vigoroso de la planta. Similarmente, existe abundante literatura referida a los efectos y consecuencias del estrés ambiental sobre la viabilidad (Brockwell *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1977; Lowendorf *et al.*, 1981) y comportamiento simbiótico de los rizobios. (Rice *et al.*, 1977; Munns, 1968, Burton, 1972; Brockwell *et al.*, 1991; Barber, 1980). Como hemos descrito en las secciones anteriores el establecimiento de una simbiosis efectiva requiere de una colonización y supervivencia del rizobio en el suelo, así como competencia saprofitica con otros microorganismos endógenos, una adecuada colonización de la rizosfera antes de la infección radical y compatibilidad genética entre el huésped y la bacteria para establecer un nódulo efectivo, y un ambiente favorable que permita el intercambio de señales, la infección y la fijación de N₂ en los nódulos maduros. De ellas son varias las etapas que pueden afectarse por factores ambientales desfavorables (temperatura, salinidad, pH, etc.). Describiré a continuación algunas de las características más relevantes del desarrollo de la simbiosis rizobio-leguminosa en condiciones de acidez.

1.6.1. ACIDEZ, un factor de estrés de amplia distribución.

Los suelos ácidos ocupan el 30% (3950 millones de ha) de la tierra libre de hielo. Solo el 4,5% (179 millones de ha) de esos suelos ácidos son utilizados como suelos arables de cultivo, el resto está ocupado por bosques, sabanas, praderas y estepas (von Uexküll, H.R. y E. Muter, 1995). Una de las causas que conducen a la acidificación de un suelo puede ser la propia composición del suelo (en Sud América, por ejemplo, por hay unas 700 mill. ha que son suelos tipo Ultisol y Oxisol que son inherentemente ácidos).

También algunos sistemas de cultivos como los métodos de agricultura intensiva aceleran la acidificación del terreno (von Uexkull *et al.*, 1995). Según he mencionado, en suelos ácidos la producción de los cultivos de leguminosas se ve disminuida debido a diversos factores que afectan a la planta huésped (Howieson *et al.*, 1992); a la población rizobiana (Brockwell *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1977; Lowendorf *et al.*, 1981); y a la propia interacción simbiótica que conduce a la fijación biológica de nitrógeno (FBN) (Rice *et al.*, 1977; Munns, 1968). Los factores causantes son diversos como por ejemplo, la baja disponibilidad de los elementos molibdeno, fósforo, y fundamentalmente el calcio (Howieson *et al.*, 1993; Rice, 1975; Pijnemborg *et al.*, 1990c, Caetano-Anolles *et al.*, 1989), la toxicidad del aluminio y manganeso (Graham, 1992; Hartel *et al.*, 1989; Flis *et al.*, 1993; Yokota *et al.*, 1995) y el efecto de la elevada concentración de H⁺ *per se* (Pijnemborg *et al.*, 1990b; Glenn *et al.*, 1994) sobre la planta y la bacteria.

1.6.1.1. Efecto de la acidez en la planta

Las leguminosas en general crecen bien en condiciones moderadamente ácidas. La acidez del suelo tiene un fuerte efecto en el crecimiento cuando el aporte de nitrógeno

depende de la simbiosis. Cuando se le aporta a la planta nitrógeno mineral en cantidad que no limite su crecimiento las plantas leguminosas pueden desarrollarse en suelos con un pH más bajo (Pijnemborg *et al.*, 1990^a; Bounejmate y Robson, 1992). Se ha comprobado que la alfalfa crece bien a pH 4,0 con una cantidad de CaCO₃ de 5mM (Rice, 1975). También, distintas especies anuales de *Medicago* (*M. murex*, *M. polymorfa*) se han descrito como mejores tolerantes a la acidez que otras (*M. trunculata*, *M. littoralis*) pues nodulan mejor en suelos ácidos (Howieson *et al.*, 1992).

1.6.1.2 Efecto de la acidez sobre la supervivencia y el comportamiento simbiótico de la bacteria.

1.6.1.2.1. Poblaciones de rizobios presentes en suelos ácidos.

En suelos ácidos hay una importante disminución del número de rizobios. Existen estudios donde se ha demostrado que el número de rizobios que en un suelo neutro puede alcanzar 10⁵ bacterias/g, no supera los 100 rizobios /g cuando el pH del suelo es cercano a 6,0 (Brockwell *et al.*, 1991). Al disminuir el número de rizobios, no todas las plantas son noduladas en cantidad suficiente como para que haya una FBN adecuada para soportar el crecimiento vegetal. Igualmente, se ha descrito que hay un aumento en la proporción de nódulos inefectivos, no fijadores de N₂, en los suelos ácidos y en mayor medida en los suelos ácidos que llevan un tiempo sin cultivarse con la planta huésped. Se especula que los suelos ácidos inducen la pérdida de la diversidad de población eficiente o que esas bacterias pierden su capacidad simbiótica (Barber, 1980). Por otra parte experimentos en campo e invernadero han mostrado en poblaciones de *S. meliloti* que la nodulación y producción relativa de alfalfa descendió en gran proporción a medida que el pH del suelo bajaba de pH 6 (Rice *et al.*, 1977), siendo *S. meliloti* más afectada por la acidez que la planta (Clarke *et al.*, 1993). En general, los rizobios de crecimiento rápido (ej: *S. meliloti*, *S. medicae*, *R. etli*, *R. tropici*, *R. leguminosarum*, etc.) son menos tolerantes a la acidez que los rizobios de crecimiento lento (ej: *Bradyrhizobium*, *cowpea rhizobia*, etc.), salvo *R. tropici* de las que algunas cepas llegan a crecer bien a pH 4,0. *S. meliloti* y *S. medicae* son claramente menos tolerantes a la acidez que el resto de rizobios con un pH mínimo de crecimiento y supervivencia de 5,5 (Graham, 1992).

1.6.1.2.2. Rizobios tolerantes a la acidez en cultivos de laboratorio y tolerantes a la acidez en suelo.

Los estudios de tolerancia a la acidez de rizobios enfocan ya sea el análisis de su tolerancia a la acidez en medios de cultivo *in vitro*, o su tolerancia a la acidez en determinados tipos de suelos. En el primer caso puede delimitarse el efecto del pH *per se* sobre las bacterias (Howieson *et al.*, 1988; Graham y Glenn, 1994; Del Papa *et al.*, 1999; Tiwari *et al.*, 1992; Tiwari *et al.*, 1996) y en el segundo consideramos la tolerancia a la acidez

junto a una serie de factores bióticos y abióticos cuyas características están muchas veces vinculadas a la condición de acidez del suelo. El bajo pH conduce a la limitación de ciertos elementos como calcio, fósforo y molibdeno y a la aparición de concentraciones tóxicas de otros como aluminio y manganeso (Bordeleau y Prévost, 1994, Graham, 1991). La importancia real de estos factores depende del tipo de suelo (composición/estructura) así como del valor del pH del mismo. Así, la complejidad fisicoquímica del suelo como medio de desarrollo, sumado a la competencia saprofítica que existe con la biota endógena hacen muy difícil la sistematización de los estudios de supervivencia en condiciones de suelo para evaluar en forma específica los efectos de la acidez sobre los rizobios. Que un rizobio sea "acido-tolerante" (*in vitro*) no necesariamente asegura una destacada tasa de supervivencia en suelo ácido dada la variedad de nuevos factores que condicionan su permanencia. Así mismo, rizobios que no sean "acido-tolerantes" *in vitro* pueden estar muy bien adaptados a un suelo ácido particular y para ocupar micronichos donde se conserva un pH óptimo para su crecimiento y/o supervivencia (Lowendorf *et al.*, 1983). De todos modos, en la selección de un rizobio con el fin de preparar un inoculante para mejorar una producción en suelos ácidos se suelen tomar rizobios tolerantes a la acidez en medio definido como un requisito de selección de rizobios tolerantes a la acidez en suelo (Glenn *et al.*, 1994). Tal estrategia de selección aunque eficiente en la selección de variantes tolerantes al bajo pH no contempla en esa instancia los aspectos que hacen al desempeño de la bacteria en condiciones de suelo como su medio natural. La ácido tolerancia aparece por tanto como una característica necesaria pero no suficiente para garantizar la calidad de un rizobio inoculante. Por ejemplo, no necesariamente rizobios más ácido tolerantes serán los mejor dotados para desarrollar una interacción simbiótica eficiente con la planta huésped a bajo pH (y viceversa). Estas dificultades han replanteado el diseño de estrategias racionales eficientes para el aislamiento y mejoramiento de rizobios que desarrollen simbiosis eficientes en condiciones de acidez y a campo. Una de las aproximaciones al problema ha sido el aislamiento de cepas ácido tolerantes, y la evaluación posterior de esas cepas seleccionadas en condiciones de campo en suelos ácidos. Estrategias de este tipo han sido empleadas con éxito para superar el problema de establecimiento de pastos de *Medicago spp.* en suelos moderadamente ácidos de Australia. Para ello, se aislaron cepas de *S. meliloti* de la cuenca del Mediterráneo (Grecia e Italia). Las cepas fueron seleccionadas por el criterio empírico de tolerancia a la acidez en suelo (Howieson *et al.*, 1986) y utilizando *M. Polymorfa*, se comprobó que estas cepas, tenían mayor capacidad de colonización, persistencia y nodulación sobre *M. Polymorfa* que los inoculantes utilizados hasta entonces (O'Hara *et al.*, 1989). Estudios complementarios de los mismos autores sugieren una correlación positiva entre la tolerancia de *S. meliloti* a la acidez en medios definidos en placa y su persistencia y nodulación en suelos ácidos (Howieson *et al.*, 1986). Sin embargo resultados posteriores parecen no confirmar tal correlación (Howieson *et al.*, 1988). Con otros rizobios distintos a *S. meliloti* los resultados son también contrapuestos (Graham *et al.*, 1982; Rice, 1982; Hartel *et al.*, 1983; Bromfield *et al.*, 1980).

1.6.1.2.3. Efecto del Calcio en el comportamiento simbiótico y en la tolerancia a la acidez de los rizobios.

El calcio juega un rol importante en diversos procesos bacterianos: quimiotaxis, virulencia, transporte de azúcares y proteínas, en reacciones de fosforilación, e interviene en el ciclo celular y en la estabilización de los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana externa de las bacterias Gram negativas, entre otros. El calcio participa también en la síntesis y acumulación de fosfolípidos en la membrana citoplasmática; y en la activación de la fosfolipasa A en la membrana de *E. coli*.

El calcio (Ca^{++}) afecta el crecimiento (Norris; 1958; 1959), la supervivencia, la adhesión de la bacteria a los pelos radiculares (Caetano *et al*, 1989) y la nodulación de los rizobios en general (Muns, 1970). El aumento de la concentración de Ca^{++} en el medio de cultivo permitió el crecimiento a pH más ácido en *S.meliloti* (Reeve *et al.*, 1993). Balatti *et al.* (1991) encontraron que el calcio determina no solo el crecimiento, sino también la inducción de una distribución normal de nódulos de soja, por *Rhizobium fredii* USDA 208. Según hemos ya descrito en esta introducción, el primer paso del evento de adhesión de las células de *Rhizobium spp.* a los pelos radicales está mediado por una proteína dependiente de calcio (rhicadesina), y la presencia de calcio es importante para el anclaje de dicha proteína a la superficie de la célula bacteriana (Smit *et al.*, 1991).

En *S. meliloti*, en particular Howieson *et al.* (1993) han demostrado que la concentración de calcio, de fósforo y el pH son factores que afectan la adhesión a raíces. La interacción de las concentraciones de Ca^{++} y H^+ ha sido puesta en evidencia en la etapa de adhesión temprana (Caetano Anollés *et al*, 1989): al disminuir el pH se requieren mayores concentraciones de Ca^{++} para preservar un mismo nivel de adsorción (Caetano Anollés *et al*, 1989). Un fenómeno similar de interacción entre las concentraciones de Ca^{++} y H^+ se produce en la nodulación (Muns, 1970). La interacción entre Ca^{++} y H^+ parece darse también en etapas diferentes de la adsorción. Exudados producidos por trébol subterráneo a pH por debajo de 5.0 con 0,68mM de Ca^{++} resultaron inductores menos poderosos de los genes *Nod* de *R. leguminosarum biovar trifolii* que los exudados producidos con 10,0 mM de Ca^{++} (Richardson *et al.*, 1988). Finalmente la presencia de Ca^{++} ha mejorado notoriamente la tolerancia de *S. meliloti* a bajo pH en medios artificiales (O'Hara *et al.*, 1989). Esta observación y la mejora del comportamiento simbiótico de los rizobios en presencia de Ca^{++} da sustento a la práctica común del encalado (agregado de $\text{Ca}_3(\text{CO})_2$ a los suelos) en la agricultura de suelos ácidos y en particular de leguminosas. Se desconoce como el Ca^{++} participa a nivel molecular para revertir al menos parcialmente el efecto negativo de los iones H^+ sobre eventos tan diversos de la fisiología de la bacteria y de la simbiosis.

1.6.1.2.4. Consecuencias fisiológicas del bajo pH.

Los protones extracelulares están en contacto directo con la membrana externa, el espacio periplásmico y la membrana citoplasmática ya que la pared celular excluye sólo

moléculas de peso molecular mayor que 1000 Da. Aunque la membrana plasmática tiene una permeabilidad reducida a los protones, el pH intracelular de la bacteria está sujeto a perturbaciones en las direcciones ácidas y alcalinas requiriéndose un sistema homeostático para regular su pH interno (pHi) y poder cumplimentar las distintas funciones metabólicas. Los dos factores principales que causan cambios en el pH intracelular son el movimiento pasivo de los protones a través de la membrana citoplasmática y la producción de ácidos y bases en el citoplasma.

Los mecanismos posibles para la regulación del pH interno (o citoplasmático) son: la existencia de buffers citoplasmáticos, la producción de ácidos o bases y el transporte de H^+ u OH^- . En lo que respecta a los buffers citoplasmáticos, los principales componentes son las cadenas de aminoácidos de las proteínas. Estudios fisiológicos en estreptococos orales han establecido que la membrana celular juega importantes roles en la regulación ácido-base. El resultado neto, cuando los organismos están produciendo ácidos o cuando están en ambientes ácidos, es que el valor de pHi es más alto que el del ambiente. Esa diferencia de pH a uno y otro lado de la membrana celular es vital para el funcionamiento de sistemas como el glicolítico. En algunos organismos, uno de los mecanismos de protección para las enzimas glicolíticas sensibles a pH es el movimiento de protones hacia afuera a través de una ATPasa que trasloca protones (Bender et al., 1986). (Ver mecanismos de mantenimiento de la homeostasis ácido/base en la sección siguiente).

El bajo pH produce en los rizobios desde un detenimiento del metabolismo celular, hasta cambios mucho más moderados dependiendo del nivel de acidez. Así, muchas de las propiedades superficiales de los rizobios se ven afectadas por un pH externo moderadamente ácido. Cunningham y Munns (1984) encontraron por ejemplo correlación entre la producción de exopolisacáridos (EPS) y la tolerancia a la acidez en *Rhizobium spp.* Además, la movilidad y la quimiotaxis también se ven afectadas por el pH bajo. Ya ha sido descrito por ejemplo que células de *R. leguminosarum* pierden movilidad a pH 5,0, aunque no detienen su crecimiento (Glenn y Dilworth, 1994). Claramente, aquellas cepas con sistemas menos sensibles al pH externo tendrán ventajas competitivas positivas frente a los más sensibles a la acidez.

1.6.1.2.5. Tolerancia a la acidez y pH interno

Cepas de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri*, se ha mostrado que mantienen su pH interno a niveles levemente alcalinos mientras sobreviven en pH ácido (pH=2-3) durante algunas horas. A esto se le ha llamado homeostasis del pH citoplásmico (Park et al., 1996; Small et al., 1994). Las bacterias neutrófilas, en general, mantienen un pHi alcalino aún cuando el pH externo sea ácido. La regulación de el pHi aparece como una condición necesaria para el crecimiento bajo condiciones ácidas. *Streptococcus faecalis* fue el primer microorganismo en el que se estudió la generación de un gradiente de pH, estableciéndose que la célula en glicólisis mantiene un gradiente de pH de 0,5 a 1,0 unidad más de pH en el citoplasma respecto del

pH del medio externo (Booth, 1985). También en *S. faecalis* se estableció la importancia fundamental de la enzima ATPasa traslocadora de protones en la homeostasis de pH tanto por estudios bioquímicos como por estudios genéticos (Kobayashi y Unemoto, 1980; Kobayashi *et al.*, 1982; Kobayashi, 1985). Tanto en estreptococos orales como en bacterias lácticas se describió la participación de la enzima H⁺-ATPasa en la tolerancia a la acidez (Bender *et al.*, 1986; Garbay y Lonvaud-Funel, 1994; Drici-Cachon *et al.*, 1996). Además de estos mecanismos descritos en algunas bacterias, para mantener un pH_i más alto que el del ambiente las células deben tener barreras que dificulten la entrada de protones. Esa barrera se considera que es la membrana lipídica de las células. Chen *et al.* (1993) demostraron que cepas de *R. leguminosarum* *bv trifolii* sensibles a pH tienen una membrana citoplasmática más permeable a los protones y en algunos casos también una menor actividad de bombeo de protones que cepas tolerantes a acidez.

Siendo el pH del suelo uno de los factores importantes que determinan el número de rizobios en los suelos de acuerdo a las consideraciones de las secciones precedentes, el estudio de las bases fisiológicas de la tolerancia a la acidez es importante para facilitar el mejoramiento de cepas y el establecimiento de las mismas en suelos de bajo pH.

Una de las enzimas involucradas en el flujo de H⁺ es la ATP sintetasa, denominada también FoF₁-ATPasa. Esta enzima cataliza la síntesis reversible de ATP en respuesta a un gradiente electroquímico de protones o fuerza protón-motriz, acoplado el flujo de protones a través de la subunidad Fo del complejo ATPasa hacia la subunidad F₁ que cataliza la síntesis de ATP. Existen bacterias que sólo obtienen ATP mediante fosforilación a nivel de sustrato debido a que no tienen una cadena respiratoria funcional. En estos casos, la fuerza protomotriz necesaria para los procesos de transporte depende de la extrusión de protones a través de una H⁺-ATPasa, ese es el caso de *Streptococcus faecalis*, bacteria en la que se ha demostrado que dicha enzima participa en el control del pH citoplasmático (Kobayashi, 1985; Kobayashi *et al.* 1984). Se ha demostrado que las células de *Streptococcus faecalis*, para mantener un pH_i entre 7,6 y 7,8; bombean protones al medio cuando el pH_i es menor que 7,6 y ese bombeo disminuye luego que se alcanza el valor de 7,6. Abrams y Hensen (1984) encontraron un aumento en la expresión de la subunidad F₁ de la ATPasa frente a cambios en el pH del medio de cultivo y el nivel de K⁺.

Las bacterias también pueden utilizar los buffers citoplasmáticos para regular su pH_i. Existen algunas evidencias acerca de la producción metabólica de ácidos y bases como un componente específico del mecanismo de homeostasis de pH. Así, la síntesis de decarboxilasas y deaminasas resulta afectada por el pH del medio de cultivo. En bacterias entéricas se demostró la participación de lisina y arginina decarboxilasas inducibles en la tolerancia a acidez (Hassani *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 1995). Ambas enzimas remueven grupos ácidos determinando una menor acidificación externa a partir de los procesos metabólicos. En ciertas bacterias, por ejemplo, a valores de pH lo suficientemente bajos para el crecimiento y la glucólisis, la arginina puede ser catabolizada liberándose amonio posibilitando el aumento del pH y el reestablecimiento de la glucólisis (Marquis *et al.*, 1987). En bacterias lácticas, por su parte, el mecanismo

principal de mantenimiento del pH interno es el bombeo de protones desde el citoplasma por una H⁺-ATPasa. Este mecanismo opera cuando el pH externo es no menor que 4-5. A valores de pH externo menores que 4,0 opera un mecanismo diferente que consume los H⁺ intracelulares a través de la degradación de ácido L-málico a piruvato y la formación de otros productos de reacción neutra como acetoina (García *et al.*, 1992). La inclusión de málico y citrato en el medio contribuye a la homeostasis de pH y a la estabilidad de las bacterias lácticas. En *Rhizobium spp.* se han medido la actividad enzimática de la Malato Dehidrogenasa y la enzima málica que cataliza la descarboxilación del málico y su conversión a pirúvico en relación con la FBN pero no han sido involucradas en ningún mecanismo de control de pH (Waters *et al.*, 1985; Driscoll y Finan, 1993).

En *S. meliloti* también se han medido actividades de estas dos enzimas en relación a la FBN (Waters *et al.*, 1985; Driscoll y Finan, 1993) pero tampoco han sido involucradas en un mecanismo de control de pH.

En *Salmonella typhimurium* el crecimiento a pH moderadamente ácido induce una respuesta que protege a las células frente a condiciones de acidez severas. Esa respuesta requiere de la síntesis proteica y de la participación de una H⁺-ATPasa dependiente de Mg⁺² (Foster y Hall, 1990; Foster y Hall, 1991). Por otra parte, a valores de pH alrededor de 4,0; opera un sistema constitutivo que no requiere de la síntesis proteica y que probablemente dependa de mecanismos fisiológicos de control homeostático de pH (Foster, 1991). La respuesta adaptativa de la tolerancia a la acidez (ATR) es otro de los mecanismos estudiados en bacterias entéricas e incluye varios sistemas que se expresan en fase logarítmica y estacionaria de crecimiento. La clave del sistema ATR es la síntesis de proteínas inducibles por shock ácido (ASPs). Las células que son expuestas a condiciones de acidez moderada resultan luego más resistentes a un shock ácido más severo, que las células expuestas siempre a pH neutro (Foster y Hall, 1990; O'Hara y Glenn, 1994).

La cepa "ácido-tolerante" *Rhizobium tropici* UMR1899 se sometió a choque ácido y mostró una limitada capacidad de regular su pH interno (Graham *et al.*, 1994). Sin embargo estudios realizados sobre la cepa "ácido-tolerante" *S. medicae* WSM419 muestran que esta bacteria presenta homeostasis de su pH interno y no así sus mutantes "ácido-sensibles". Dichos estudios, como hemos mencionado en secciones precedentes, sugieren una relación directa entre el mantenimiento del pH citoplásmico bacteriano a niveles alcalinos en condiciones de medio externo ácido y la tolerancia a la acidez rizobiana en condiciones de campo (O'Hara *et al.*, 1989; Glenn *et al.*, 1994; Howieson, 1995).

1.6.1.2.6. Estado fisiológico bacteriano durante la acidez

Fisiológicamente los rizobios cultivados en condiciones ácidas tienen niveles citoplásmicos superiores de glutamato y K⁺, y alteración en los niveles de poliaminas al igual que en situaciones de estrés osmótico (Graham, 1992; Fujihara *et al.*, 1993). También se observa en algunos casos una relación entre la acidez y las características de superficie

de rizobios como son exopolisacáridos (EPS), motilidad y antígenos de superficie (Glenn *et al.*, 1994). En relación a la simbiosis, se han observado los siguientes efectos sobre etapas tempranas y de la infección y nodulación:

-Intercambio temprano de señales solubles

Los flavonoides liberados por las distintas especies o variedades de plantas se pueden ver afectados tanto cualitativamente como cuantitativamente en condiciones de acidez. Del mismo modo, los factores Nod de los distintos rizobios pueden afectarse en su liberación, lo que repercutirá en el diálogo entre ambos simbioses (Howieson, 1995a). En este proceso el efecto del pH parece estar moderado por los iones Ca^{++} (Richardson *et al.*, 1988; Howieson *et al.*, 1992).

-Adhesión

Cuando el número de rizobios en el suelo es bajo es importante la adhesión de los rizobios a la raíz para que los mismos puedan iniciar la infección. La adhesión se ve fuertemente influenciada por el pH siendo necesaria una mayor concentración de Ca^{++} en condiciones ácidas para una mayor adhesión. Esto se ha comprobado en *M. sativa* (Caetano-Anolles *et al.*, 1989), en otras *Medicagos* anuales (Howieson *et al.*, 1993), y en otras leguminosas como *P. vulgaris* (Lodeiro *et al.*, 1995).

-Nodulación

En estudios en cultivo hidropónico, donde se observa el efecto del pH *per se* en un sistema experimental sencillo, se ha demostrado inhibición de la nodulación, en *M. sativa*, con un inóculo denso (Munns, 1968). Al aumentar el pH por encima de 4,8 y al aumentar la concentración de Ca^{++} se desencadenaba todo el proceso de curvatura del pelo radical, aparición de canales de infección y resto del proceso de formación del nódulo (Munns, 1970). Pijnborg *et al.* (1990b), en estudios en rhizotron con suelo ácido (pH 5,2), al encalar la semilla inoculada con alta concentración bacteriana, observó que el aumento de nodulación se debe en un 80% a la neutralización del pH y en un 20% a los efectos propios del Ca^{++} .

1.6.1.2.7. Bases genéticas de la tolerancia a la acidez

Las bacterias responden a cambios tanto en el pH interno como en el externo ajustando la actividad y la síntesis de proteínas asociadas con diferentes procesos: la traslocación de protones, la degradación de aminoácidos, la adaptación a condiciones ácidas o alcalinas y la virulencia (Olson, 1993). La Tabla 1.2. contiene una lista de genes cuya expresión se ve influenciada por el pH. Para la mayoría de los ejemplos solamente se ha identificado el paso final de una vía que se modifica y en la que el pH representa la primera señal.

Las bases de la tolerancia al bajo pH en rizobios son hasta el momento poco conocidas.

Gen/Proteína	Proceso/Función	Organismo
Proteínas observadas en geles 2D, luego de varios tratamientos a pH bajo	? relacionadas con la adaptación	<i>E. coli</i> , <i>S.typhymurium</i>
Genes SOS	Reparación del ADN	<i>E. coli</i>
Genes pag	Factores de virulencia	<i>Salmonella typhymurium</i>
Genes vir	Interacciones bacteria-Huesped	<i>A. tumefaciens</i>
Proteínas inducidas por acidez y observadas en geles	? Nodulación	<i>A. tumefaciens</i>
nod A nod F	Nodulación	<i>R. leguminosarum</i> bv <i>trifolii</i>
Genes hrp	Respuesta patogénica sobre plantas	<i>P. syringe</i> bv. <i>phaseolicola</i> , <i>E. amilovora</i>
regulón Tox R	Factores de virulencia	<i>V. cholerae</i>
H ⁺ -ATPasa	síntesis e hidrólisis de ATP	<i>E. faecalis</i>
Arginina deaminasa	catabolismo de Arginina	<i>Streptococcus</i>
act S/ act R +	respuesta a pH ácido	<i>S. meliloti</i>
act A	Control del pH interno en relación a las concentraciones de Ca ⁺⁺ (similar a <i>cutE</i>)	<i>S. meliloti</i>
PhrR ++	Regulador transcripcional inducible por ciertos estreses (bajo pH, y altas concentraciones de Zn ⁺⁺ , Cu ⁺⁺ , H ₂ O ₂ o etanol)	<i>S. meliloti</i>
GshB +++	Glutathione sintetasa, esencial para crecer bajo condiciones extremas (ej.: estrés ácido, osmótico u oxidativo)	<i>R. tropici</i>

Tabla extraída de Olson, 1993

+ de Tiwari et al.^{ab}, 1996

++ de Revé et al., 1998

+++ de Riccillo et al., 2000

OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

La simbiosis *S. meliloti* - alfalfa en suelos ácidos de centro Argentina - Consideraciones generales.

El cultivo de alfalfa en Argentina cubre más de 4 millones de hectáreas (Perticari *et al.*, 1989; Hijano y Basigalup, 1995) y constituye la principal fuente de forraje para alimento bovino en el país. Por ello, el manejo sustentable de las pasturas de alfalfa representa una alternativa muy importante para la introducción de nitrógeno en tierras arables a través de la fijación biológica de N₂ que resulta de la asociación entre la planta y *Sinorhizobium meliloti*. Sin embargo, la acidez de los suelos en importantes áreas cultivadas con alfalfa en centro Argentina (Pampa húmeda y Pampa ondulada) afecta seriamente el establecimiento de la simbiosis. A consecuencia del bajo pH de los suelos el cultivo de alfalfa resulta seriamente restringido, hecho que se pone de manifiesto a través de una menor persistencia de la planta, y de tasas de fijación de nitrógeno muy disminuidas. La introducción de alfalfa, en suelos ácidos locales, da como resultado plantas pobremente noduladas y bajos rendimientos de forraje y semilla. Aunque no existen bases firmes para explicar a través de un único fenómeno la disminución de pH en los horizontes superficiales de los suelos afectados, el cultivo intensivo sin rotación es considerado como uno de los factores importantes que han favorecido el proceso de acidificación. Es necesario, por tanto, avanzar en la implementación de estrategias correctivas globales que tengan en cuenta la condición actual de los suelos, el trabajo de los mismos, y el desarrollo de sistemas eficientes de inoculación con rizobios. Será así de importancia fundamental preservar la fertilidad nitrogenada de los suelos a través de una simbiosis eficiente entre *S. meliloti* y alfalfa que pueda establecerse y operar en las condiciones actuales de acidez moderada.

En el marco de la problemática local y con el propósito de avanzar en aspectos básicos aplicables al mejoramiento de la simbiosis rizobio-alfalfa en condiciones de acidez, hemos enfocado el estudio de los siguientes puntos:

Objetivo general.

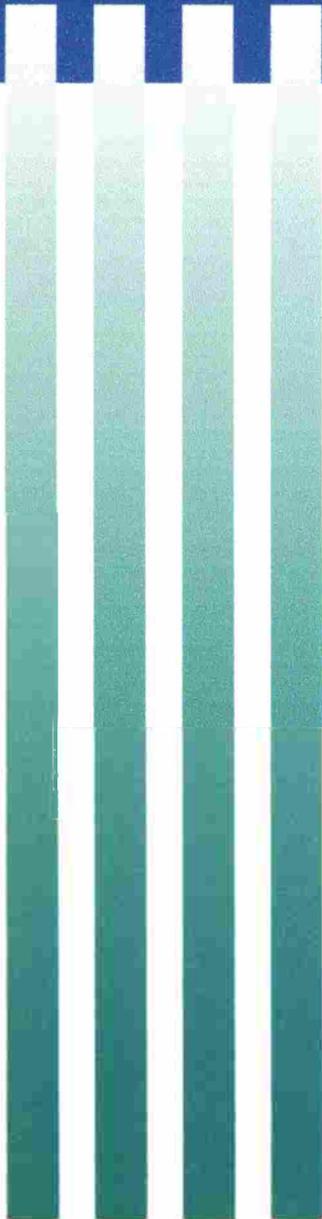
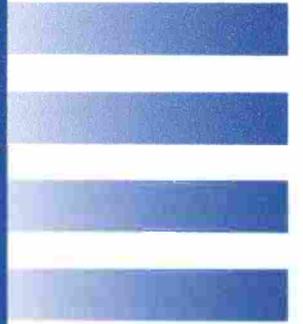
- Caracterización funcional y molecular de la simbiosis rizobio-alfalfa en condiciones de acidez.

Objetivos específicos.

- Relevamiento y caracterización de la población de rizobios noduladores de alfalfa presente en los suelos ácidos como herramienta para la selección de nuevas cepas inoculantes. Establecimiento de una colección de rizobios naturalizados en los suelos ácidos locales.
- Evaluación de la biodiversidad existente y de la relación entre simbiosis y la ácido tolerancia de las cepas.
- Caracterización simbiótica de cepas representativas de la colección.
- Identificación de nuevos marcadores genéticos de ácido tolerancia. Análisis de su importancia para la simbiosis en acidez.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos



II-1. CEPAS BACTERIANAS Y PLÁSMIDOS

Los plásmidos y las cepas bacterianas, de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Escherichia coli* utilizados en este trabajo así como sus características más relevantes se presentan en las Tablas II.1. y II.2. respectivamente.

En la primera etapa de este trabajo se utilizaron 350 aislamientos recuperados de suelos locales que denominamos genéricamente "LPU" (Universidad de La Plata) seguida de un código numérico. Esa colección de rizobios fue obtenida tanto de nódulos de alfalfa colectados a campo como en ensayos de nodulación en el laboratorio en muestras de suelo. Para esto último se utilizaron plántulas de alfalfa var. CUF 101 sembradas en las distintas muestras de suelo y cultivadas en cámara de plantas. Todos los aislamientos recuperados de nódulos fueron conservados individualmente mediante técnicas de criopreservación con glicerol a -20°C . Los datos concernientes a la localización de los suelos, el origen de la cepa, el pH de la tierra, el período de almacenamiento, etc. fueron depositados en una base de datos que hemos construido en nuestro laboratorio. Para realizar la toma de muestra se habían escogido primordialmente campos ubicados en regiones con problemas conocidos de acidificación de suelos. Los 350 aislamientos provienen de 172 muestras de suelos de campos localizados fundamentalmente en Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, La Pampa y Neuquén.

Tabla II.1. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
pRK2013	Replicón ColE1, Km ^r , tra, plásmido movilizador	Figurski <i>et al.</i> (1979)
B20	<i>lacZ</i> - Tn5: Km ^R cuya inserción genera fusiones transcripcionales	Simon <i>et al.</i> , 1989
PGEM-T	Vector multicopia, Ap ^R	Promega
pK18Mob-	Vector mobilizable, Km ^R , <i>lacZ</i>	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pUC18	Plásmido multicopia, Km ^R , <i>lacZ</i>	Pridmore, 1987
Hypercos1	Cósmido con 2 sitios cos. Derivado del Supercos I. Amp ^R	Stratagene

Tabla II.2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Bacteria	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>Escherichia coli</i> HB101	<i>pro, leu, thi, lacY, endA, recA, hsdR, hsdM, Sm^r</i>	Boyer <i>et al.</i> (1969)
S17-1	294 <i>recA, RP4</i> integrado cormosomalmente, Tc ^R	Simon, (1992)
DH5 α	<i>recA1, endA1, ϕ80d, lacZ, dm15</i>	Bethesda Research Laboratory
<i>Rhizobium etli</i> CFN42	cepa silvestre	E. Martínez-Romero
<i>Rhizobium tropici</i> (tipoA) CFN-299	cepa silvestre	E. Martínez-Romero
<i>Rhizobium</i> spp. (Oregón)Or191 LPU81	cepa silvestre	Eardly <i>et al</i> (1985)
LPU83	cepa aislada de nódulo de <i>M. sativa</i> (Argentina).	Este trabajo
LPU84	ídem	ídem
LPU154	ídem	ídem
LPU158	ídem	ídem
LPU250	ídem	ídem
LPU266	ídem	ídem
LPU275	ídem	ídem
LPU284	ídem	ídem
LPU285	ídem	ídem
LPU286	ídem	ídem
<i>Sinorhizobium medicae</i> WSM419	cepa salvaje, tolerante a la acidez	J. G. Howieson

<i>Sinorhizobium meliloti</i>		
2011	cepa derivada de SU47	J. Denarié
WSM826	cepa salvaje, tolerante a la acidez	J. G. Howieson
LPU7	cepa aislada de nódulo de <i>M. Sativa</i> (Argentina), este trabajo	Este trabajo
LPU11	ídem	ídem
LPU18	ídem	ídem
LPU30	ídem	ídem
LPU63	ídem	ídem
LPU66	ídem	ídem
LPU119	ídem	ídem
B399	cepa utilizada como inoculante en Argentina	INTA Castelar

II-2. MEDIOS DE CULTIVO Y DE CONSERVACIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

II-2.1 Medios para *Rhizobiaceae*

*Los cultivos de las bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium* se llevaron a cabo habitualmente en medio completo TY (Beringer, 1974) cuya composición es la siguiente:

CaCl ₂ .2H ₂ O	0,9	g
Triptona	5	g
Extracto de levadura	3	g
Agua (desionizada)	1000	g

La esterilización se realizó durante 20 minutos a 120°C en autoclave.

*El medio mínimo (MGM) utilizado en un principio para el escrutinio y la selección de (*Sino*)*Rhizobium* ácido tolerantes fue el de Robertsen *et al.*, (1981), modificado según se especifica a continuación:

K ₂ HPO ₄	0,3	g
KH ₂ PO ₄	0,3	g
MgSO ₄ .7 H ₂ O	0,15	g
CaCl ₂	0,05	g
FeCl ₃	0,006	g

NaCl	0,05	g
NH ₄ Cl	1,0	g
Manitol	10	g
Biotina	0,0002	g
Pantotenato cálcico	0,0001	g
Agua (desionizada)	1000	ml

Para tamponar el medio se utilizó 20mM PIPES;(piperazine-N N'-bis-2-ethanesulfonic acid(SIGMA) a pHs 7 y 6,5; y 20 mM MES, ácido 3-[N-Morpholino]ethanosulfónico; SIGMA) a pHs 6,0 y 5,6 (Howieson, 1985).

Se ajustó el pH a los valores indicados, se esterilizó a 120°C, 20 minutos en autoclave y el pH final se corrigió cuando fue necesario sobre el medio estéril empleando HCl/KOH.

*El medio mínimo (SGM) fue empleado para las curvas de crecimiento de rizobios y para el escrutinio y selección de mutantes Tn5 ácido sensibles.

La composición del medio es la que sigue:

Sacarosa	29,2	mM
Glutamato sódico	2,67	mM
K ₂ HPO ₄ 3H ₂ O	0,15	mM
KH ₂ PO ₄	0,15	mM
Na ₂ SO ₄	0,7	mM
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1,0	mM
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1,0	mM
H ₃ BO ₃	0,048	mM
MnSO ₄ . H ₂ O	0,01	mM
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,01	mM
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,048	mM
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,0005	mM
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,001	mM
FeCl ₃ . 6H ₂ O	0,001	mM
Tiamina HCl	0,00295	mM
Ac. Pantoténico	0,0042	mM
Biotina	0,000082	mM

De acuerdo al pH se emplearon los siguientes tampones: a pH 5,0 20mM PO₄H⁻/PO₄⁻³, a pH 5,5 y 6,0 20mM MES y a pH 7,0 20mM PIPES. La temperatura de incubación para *Rhizobium* fue de 28°C.

Para la preparación de medios sólidos en todos los casos se añadió agar al 1,5 %.

II-2.2. Medio para *E. Coli*

Para el cultivo de las cepas de *Escherichia coli* se utilizó habitualmente el medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et al., 1989) cuya composición es la siguiente:

Glucosa	1g
NaCl	5g
Triptona (DIFCO)	10g
Extracto de levadura	5g
Agua (desionizada)	1000ml

Para preparar medio sólido se utilizó agar, 15 g/l.

El medio se esterilizó igualmente a 120°C durante 20 minutos.

La temperatura de incubación para *E. coli* fue de 37°C.

Para la preparación de medios sólidos en todos los casos se añadió agar al 1,5 %.

II-2.3. Medios de conservación

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se hizo por congelación rápida de cultivos crecidos hasta la fase logarítmica tardía suplementados de glicerol estéril hasta una concentración final del 20% (V/V). Los criotubos se almacenan a una temperatura de -80°C, siendo viables durante varios años.

II-3. ANTIBIÓTICOS

Los antibióticos, cuando se requirieron, fueron adicionados a los medios de cultivo a partir de soluciones concentradas 1000 veces respecto de la concentración final de los mismos en el solvente que corresponda. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración a través de membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm de tamaño de poro. Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron las siguientes (µg.ml⁻¹): Kanamicina sulfato (Km), 25 y Ampicilina 100, para *E. coli*, y Neomicina sulfato 100, Streptomycin 400, Spectomicina 200 para rizobios.

II-4- CONTROL DEL pH

Para obtener el pH deseado, en los medios de cultivo, el mismo fue ajustado previamente al valor deseado antes de la esterilización y corregido luego de la misma cuando fue necesario. El pH de los medios fue controlado con pHmetro de electrodo de

vidrio(+/- 0,05 unidades).

II-4.1- Determinación de pH en suelos.

Para medir el pH de muestras de suelo, se mezclan 20 gramos del mismo con 20 ml de H₂O destilada. Dicha mezcla se agitó 1 hora (100 rpm) y al cabo de ese lapso de tiempo se determinó el pH de la fase acuosa.

II-5. ESTUDIOS *IN VITRO* DE TOLERANCIA A LA ACIDEZ DE RIZOBIOS.

II-5.1. Tolerancia a la acidez en placa.

La tolerancia a la acidez de los distintos rizobios nodulantes de alfalfa se hizo en placas de Petri con medio mínimo SGM, a pHs 5,0, 5,5, 6,0 y 7,0 utilizando tampón fosfato como amortiguador de pH. Para ello se tomó con un asa de siembra estéril una pequeña cantidad de la cepa a ensayar de la correspondiente placa de cultivo. Se realizó la extensión sobre placas a cada uno de los pHs indicados. Se dispusieron 8 cepas bacterianas por placa. A los cinco días se observó el crecimiento y se fotografió.

II-5.2. Curvas de crecimiento en medio mínimo a diferentes pHs.

Las curvas de crecimiento de las distintas cepas bacterianas ensayadas se realizó en medio mínimo SGM tamponado con PIPES a pH 7,0 y 6,5 y con MES a pHs 6,0 y 5,6 según indicamos en la sección II.2.1..

Los cultivos se incubaron a 28°C en agitación (225 r.p.m.), en Erlenmeyers que contenían 50 ml de medio mínimo (SGM), inoculados al 1% a partir de preinóculos crecidos en SGM a pH neutro durante 2-3 días (D.O.₆₀₀=1,0). El crecimiento se determinó mediante la lectura de la absorbancia (D.O.) a 600 nm de longitud de onda en espectrofotómetro. Sobre esas alícuotas se realizaron diluciones seriadas al décimo y se sembraron 0,1 ml de las mismas en placas (2 placas/dilución) de medio TY. Las placas se incubaron a 28°C. Tras el recuento de las colonias se estimó el tiempo de generación definido como el tiempo en que se duplica la población bacteriana en la fase logarítmica del crecimiento.

Para evaluar las cinéticas hemos escogido como cepa control a *S.meliloti* 2011 (SA), sensible a la acidez, el aislamiento LPU83 representativo del grupo de rizobios TA, tolerante a la acidez, la LPU83 y el aislamiento LPU63 representativo del grupo de los TMA de tolerancia moderada a la acidez.

II-5.3. Capacidad de crecer en medio TY a 37 °C y en LB a 28°C

Ensayamos la capacidad de diferentes rizobios para crecer en medios sólidos TY a 37°C y LB a 28°C. Esto permitió diferenciar fácilmente los rizobios SA y TMA de los rizobios TA.

Placas sembradas con cada rizobio analizado fueron inoculadas en la condición

indicada durante 72hs.

II-6. EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE MELANINA

La capacidad de producir melanina es una característica que muchas veces permite diferenciar cepas de *S. meliloti*. En este trabajo hemos utilizado la técnica descrita por Cubo (Cubo *et al.*, 1988) para evaluar el comportamiento de las cepas seleccionadas en nuestro laboratorio. Para ello se prepararon placas de TY con el agregado de $\text{Cu SO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$ 40mg/l y tirosina 600 mg/l. Las placas sembradas con rizobios se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente. Los aislamientos considerados como productores de melanina fueron aquellos que producían un pigmento marrón difusible luego de la adición de 0.5 ml de una solución 10% de dodecil sulfato de sodio preparado en TBE (Tris 0,09 M; Acido Bórico 0,09 M; EDTA 0,002 M) a pH 8,3.

II-7. ANÁLISIS DE LIPOPOLISACÁRIDOS (LPS) EN SDS-PAGE.

La preparación de LPS y el análisis de los mismos en SDS-PAGE teñidos con plata fueron realizados siguiendo los protocolos reportados previamente por Valverde *et al.* 1997 y según la técnica descrita por Hitchcock y Brown en 1983 respectivamente.

II-8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA (PAGE)

Las electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos, con SDS y β -mercaptoetanol, se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Los geles superiores (de apilamiento) se prepararon con 5% de poliacrilamida en Tris -HCl a pH 6,8, mientras que la parte inferior de los geles (de separación) se prepararon con 12,5 a 15 % de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 8,8. Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 min. en equipos Miniprotean (BioRad) a 150-200 volts. Los geles se fijaron en metanol:acético:agua (50:10:40) y se tiñeron con plata (Blume *et al.*, 1987).

II-9. ENSAYOS DE CONJUGACIÓN

II-9.1. Conjugaciones bacterianas biparentales

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon (Simon *et al.*, 1989), según el sistema biparental. El procedimiento experimental utilizado fue el siguiente: a 0,7 ml de un cultivo de la cepa donadora (DO620 nm: 0.4 - 0,5) se le agregaron 0,7 ml de

un cultivo de igual densidad óptica de la cepa aceptora. La mezcla se centrifugó a 2.500 rpm por 8 minutos y el pellet se lo resuspendió suavemente en aproximadamente 50 microlitros de medio TY líquido. La suspensión se colocó en una caja con medio TY sólido. La incubación se realizó a 28°C durante toda la noche. El crecimiento bacteriano fue resuspendido en medio TY líquido y plaqueado en medio TY suplementado con el antibiótico adecuado. En todos los casos se incluyeron controles con la cepa donadora y la cepa aceptora procesadas por separado.

II-9.2. Conjugaciones triparentales

Con este modelo de cruce se efectuó la transferencia de plásmidos no autotransmisibles que contienen el *oriT* del plásmido RK2, desde una cepa no movilizadora de *E. coli*, a *Rhizobium*. Para ello se utilizó una tercera cepa portadora del plásmido movilizador (*helper*) en *trans* pRK2013 (Ditta *et al.*, 1980). La cepa receptora, donadora y movilizadora (*helper*) se mezclaron en la proporción 1:1:1 (la cepa donadora, en fase logarítmica del crecimiento, con la receptora y movilizadora en su fase exponencial tardía) Donador, receptor y movilizador se centrifugaron en un tubo de microfuga a baja velocidad y se resuspendieron en un pequeño volumen de medio de cultivo (50µl).

Dicha suspensión se incubó en medio sólido TY y se incubó toda la noche a 28°C. Transcurrido este tiempo, la mezcla de conjugación se resuspende en medio estéril y se efectúan las diluciones adecuadas, sembrándolas sobre medio selectivo adicionado del antibiótico para cuya resistencia codifica el plásmido que se transfiere. Según se indicó en la sección anterior.

II-10. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE RIZOBIOS

II-10.1. Perfil de plásmidos de los aislamientos de rizobios noduladores de alfalfa-tolerantes a la acidez (TA)

Se examinaron aislamientos seleccionados en sus perfiles plasmídicos mediante la técnica de electroforesis en geles de agarosa tipo Eckhardt. Esta técnica comprende la lisis de los rizobios en la misma fosa de siembra del gel de separación y permite revelar la presencia de plásmidos de gran tamaño característicos de algunos rizobios (Geniaux *et al.*, 1995).

Se siguió el método de lisis *in situ* descrito por Wheatcroft (Wheatcroft *et al.*, 1990).

Las bacterias fueron cultivadas en medio TY líquido. Una alícuota de 1ml de cultivo ajustado a 0,4 de DO₆₂₀ se centrifugó y las células se lavaron con 1 ml de solución 0,3% p/v de sarcosinato de sodio. Las células se centrifugaron y se resuspendieron en 15 µl de solución de 20% (p/v) ficoll. Las suspensiones de bacterias se preservaron en baño de agua-hielo hasta el momento de sembrar el gel de lisis/separación (0,75 % de agarosa con buffer TBE).

Previo a la siembra de las muestras en cada fosa del gel se colocaron 25 µl de

solución de SDS 10% conteniendo xilene- cianole, se corrieron a polaridad invertida hasta que el frente retrocedió un centímetro. En el momento de la siembra se agregó 15µl de solución de lisis (sacarosa 8% ficoll 2% Tris 50 mM EDTA 25 nM, RNAsa 0,4 mg/ml lisozima 1mg/ml) a cada una de las muestras. Se mezcló el contenido de cada tubo en forma suave e inmediatamente se sembraron 15µl de cada uno por calle .

La electroforesis se realizó a 30 V por 30 min. y luego a 110 V 2 h. Al finalizar la corrida el gel se lavó con agua 30 min. y se tiñó con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) para visualizar las bandas mediante trans-iluminación con luz ultravioleta.

II-10.2. Análisis de amplificaciones de ADN total de los aislamientos usando las técnicas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico capilar Idaho 1605 (Idaho Technology). La composición de las mezclas de reacción utilizadas fue: 50 mM Tris-HCl, pH 8.3; 500 (g/ml albúmina bovina (BSA); 3 mM MgCl₂, 200 µM dNTPS; 1 U Taq DNA polimerasa (Promega Corp.) y 10 µM de cada cebador. Los cebadores empleados se muestran en la Tabla II.3.

Tabla II.3: Secuencias de los cebadores utilizados en el presente trabajo.

Denominación	Secuencia	Referencia
<i>nif H</i> -directo	5'-ATT TCC TTG AAG AGA ACG GTG C -3'	Aguilar <i>et al.</i> , 1998
-inverso	5'-AGT TCG GCC AGC ATC TGC TGC T -3'	idem
<i>nod H Rsp.</i> -directo	5'- GCA GGC AAG GCA AAC-3'	Este trabajo.
-inverso	5'- TCA AAG AAG CTC GCG -3'	Este trabajo
<i>nod H R.me</i> -directo	5'-TGA TGT TGC CAT TCG CCA CC-3'	Este trabajo
-inverso	5'-CTC TTG ACG CCG AAG AAT AC-3'	Este trabajo
BOX A1R	5'-CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G-3'	De Brujin <i>et al.</i> (1992)
BOX C	5'-TGC GGC TAG CTT CCT AGT TTG C-3'	De Brujin <i>et al.</i> (1992)
ERIC1R	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'	De Brujin <i>et al.</i> (1992)
ERIC 2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'	De Brujin <i>et al.</i> (1992)
MBOREP1	5'-CCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG-3'	Versaslovic (1991)

Los ADN moldes para las amplificaciones fueron obtenidos utilizando las siguientes

metodologías:

a) para amplificaciones específicas: las células de los cultivos (líquidos o en placa) fueron lavadas con NaCl 1 M y resuspendidas en 100 μ l agua bidestilada estéril. La suspensión fue hervida por cinco minutos y centrifugada a 14000 g por 4 minutos; 5 μ l de los sobrenadantes fueron usados como ADN molde y los remanentes se guardaron a -20°C.

b) para ensayos de "fingerprint" de ADN total por PCR se tomó un volumen de células de cultivos líquidos en fase exponencial equivalente a 1 ml de 0,4 de DO₆₂₀ y se procedió de igual manera que en a).

c) para amplificaciones de secuencias correspondientes a genes simbióticos contenidas en plásmidos: se cortaron las bandas de agarosa de los geles de lisis *in situ* y se fundieron en 500 μ l de agua destilada estéril, 10 μ l fueron usados como ADN molde.

La amplificación de los productos fue visualizada en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio.

II-10.2.1. Fingerprint de ADN total por la técnica de la polimerasa en cadena (PCR)

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes (adaptadas de De Bruijn (1992), para poner a punto las condiciones de nuestro protocolo de amplificación usando un ciclador térmico capilar).

-Cebadores **MboREP**: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos, *annealing* a 65°C 70 segundos, y elongación a 72°C 2 minutos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 4 minutos.

-Cebadores **ERIC**: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 7 minutos y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos, *annealing* a 52°C 70 segundos, y elongación a 72°C 2 minutos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 4 minutos.

-Cebadores **BOX A1R**: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos y 30 ciclos de: desnaturalización a 94°C 1 minuto, *annealing* a 53°C 6 minutos, y elongación a 72°C 8 minutos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 16 minutos.

-Cebadores **BOX C**: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 5 minutos y 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C 1 minuto, *annealing* a 45°C 4 minutos, y elongación a 72°C 5 minutos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C por 10 minutos.

En todos los casos los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa 1,5 % y visualizados por tinción de los mismos con bromuro de etidio.

II-10.2.2. Amplificaciones de secuencias correspondientes a los genes simbióticos *nif H* y *nod H*.

-Cebadores ***nifH***: estos cebadores fueron diseñados para amplificar un segmento interno de 511pb de uno de los genes estructurales de la nitrogenasa (Aguilar *et al.* 1998).

Las condiciones de ciclado utilizadas fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 15 segundos y 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos, *annealing* a 55°C 10 segundos, y elongación a 72°C 20 segundos. Como etapa

final se incubó la mezcla a 72°C 1 minuto.

-cebadores **nodH** : los cebadores nodH Rsp. amplifican un segmento de 360 pb del gen *nodH*. Este gen codifica para una sulfotransferasa responsable de la sulfatación de las moléculas de factor Nod (este determina la capacidad de un rizobio de nodular alfalfa). En *S.meliloti* este gen codifica para la enzima que produce la 6-O-sulfatación de la glucosamina reducida terminal. Esta descrito que mutantes *nodH-* de *S. meliloti* no son capaces de deformar los pelos radiculares, ni de llevar a cabo la infección y nodulación en su hésped homólogo (alfalfa) pero adquieren todas esas capacidades frente a *Vicia sativa* subsp. *migra*, que no es su hésped homólogo. Para el diseño de los cebadores se alinearon las secuencias genómicas de genes *nodH* de *S. meliloti* y de otros rizobios según se muestra en el Capítulo V.

Los cebadores nodH *S.me* amplifican para un fragmento de 211 pb. interno al fragmento de amplificación de 360 pb obtenido con los cebadores nodH Rsp con lo cual estos pares pudieron ser utilizados separadamente o bien en una PCR-anidadas (*nested-PCR*). En este último caso en la primera ronda de PCR se disminuyó la concentración de los cebadores nodH Rsp 10 veces y se mantuvieron las condiciones del resto de los reactivos para ambas rondas de amplificaciones.

Las condiciones de ciclado utilizadas con ambos tipos de cebadores fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C 15 segundos y 35 ciclos de: desnaturalización a 94°C 10 segundos., annealing a 55°C 10 segundos, y elongación a 72°C 20 segundos. Como etapa final se incubó la mezcla a 72°C 30 segundos.

II-10.2.3. Construcción de sondas *nodH* marcadas con digoxigenina mediante amplificación por PCR de la secuencia correspondientes al gen simbiótico *nodH*.

Para obtener las sondas *nodH* marcadas con digoxigenina que nos permitan detectar la presencia de la secuencia genómica homóloga se usó el protocolo de PCR descrito en el punto 9.2.2 en el cual solo se utilizó digoxigenin-11-dUTP (DIG Nucleic Acid Kit, Boehringer Mannheim) según las indicaciones del kit para sintetizar la sonda, y se mantuvieron las mismas condiciones de la mezcla de reacción y del ciclador.

II-11. PREPARACIONES DE PLÁSMIDOS.

II-11.1. Minipreps.

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Maniatis (1982) o usando un kit comercial (Qiagen) y siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

II-11.2. Elusión de ADN plasmídico del gel de agarosa.

Se cortó con un bisturí limpio y estéril una pequeña porción del gel de agarosa

correspondiente al lugar donde se visualizó la banda de ADN. Dicho material se colocó en un microtubo de polipropileno de 1,5 ml (tipo eppendorf) con 0,5-1 ml de agua estéril y se lo calentó a baño María hasta que el taquito de agarosa se fundió. Esta solución se utilizó como muestra molde de ADN de plásmidos y megaplásmidos para reacciones de PCR.

II-12. EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE RIZOBIOS

Para la preparación de ADN total se procesaron 1,5 ml de un cultivo bacteriano en fase exponencial tardía. Las células se lavaron en 200 μ l de N-lauril sarcosina al 0,1% en TE y se centrifugaron. A continuación, las muestras centrifugadas se resuspendieron en 300 μ l de TE, y a cada una de ellas se le añadió 100 μ l de lysozima 1 mg/ml (en sacarosa 20%), se incubó 1 hora a 37°C. Luego se agregó 100 μ l de Pronasa (2,5 mg/ml en TE, predigerida a 37°C durante un mínimo de 90 minutos) y 100 μ l de SDS al 5% en TE. Se mezcló por inversión y se incubó a 37°C durante 1-2 horas. Transcurrido este tiempo, se precipitaron los restos celulares con 125 μ l de una solución de NaCl 5M en TE previamente esterilizada en autoclave. Se incubó en hielo 30 minutos, y se centrifugó. Posteriormente, a la solución de ADN se le añadió 1 volumen igual de fenol y se agitó suavemente durante 1 min., se dejó reposar y se mezcló nuevamente de la misma manera durante otro minuto. Se centrifugó durante 5 min. Recogida la fase acuosa, se procedió a dos nuevas extracciones sucesivas con fenol/cloroformo y cloroformo. El ADN se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol 100% frío (-20°C). Se mezcló por inversión y se incubó a -20°C un mínimo de 2 horas. Después se centrifugó durante 15 min. 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 TE a los que se añadió 1 μ l de una solución 1mg/ml de RNAsa.

II-13. PREPARACIÓN DE LISADOS CELULARES

Las bacterias crecidas sobre placas de TY se recogieron con palillos estériles y se resuspenden en 100 μ l de 0,1% de N-lauril sarcosina (sarcosil) en TE ($DO_{600}=0,6$). Se centrifugaron a 14.000 r.p.m. durante 5 min., y se lavaron con agua deionizada estéril 1 ó 2 veces. El precipitado se resuspendió finalmente en 100 μ l de agua y se hirvió 5-10 min. La mezcla final se centrifugó y los lisados se conservaron a -20°C.

II-14 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE SOLUCIONES DE ADN.

Se ha seguido el método espectrofotométrico descrito en Sambrook *et al.* (1989). Se midió la absorbancia de las soluciones de ADN en agua o en TE a 260 y 280 nm utilizando como blanco agua o TE. La concentración en la muestra se calculó respecto a los valores estándar de $DO_{260nm} = 1,0$ para soluciones con 50 μ g/ml de ADN de cadena doble. La

El tamaño de los fragmentos de restricción se determinó por interpolación gráfica en curvas de calibración en las que se representó el logaritmo del peso molecular de los fragmentos de ADN frente a la movilidad relativa de los mismos.

Como patrón se empleó ADN del fago lambda digerido con endonucleasa *HindIII* o bien con las enzimas *EcoRI* y *HindIII*.

II-17. PREPARACIÓN DE CÉLULAS ELECTROCOMPETENTES

Se siguió la técnica de Wai Ling Tung y King Chuen Chow (1998). Se inoculó 500 ml de medio LB con 1 ml de un cultivo saturado, el cual fue anteriormente incubado a 37°C y agitado vigorosamente. Cuando la DO600 del cultivo llegó a un valor cercano a 0.8 las células se centrifugaron a 4000g por 15 min a 4°C y se lavaron 2 veces con 200 ml de glicerol 10% a 4°C. Luego las células se resuspendieron suavemente en 0,5 ml de GYT frío (10% glicerol, 0,125% extracto de levadura y 0,25% tryptona.) y se fraccionaron en alícuotas de a 100 microlitros.

La electrotransformación fue llevada a cabo usando un equipo Gene Pulser (BioRad) en cubetas de 0,2 ml bajo las condiciones recomendadas por los fabricantes (25 μ F, 200 Ω , 2,5 kV). Luego de la electrotransformación se adicionó inmediatamente 1 ml de medio SOC (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10mM ClNa, 10mM SO₄Mg 10 mM MgCl₂) que se incubó por 1 hora a 37°C para permitir la expresión de fenotipos de resistencia a antibióticos que se hayan incorporado en la transformación. Finalmente las células se plaquearon en medio LB selectivo y se incubaron por 1 noche a 37°C.

II-18. CLONADO DE UN FRAGMENTO INTERNO DEL GEN *nodH* PERTENECIENTE A LA CEPA LPU83.

Para poder obtener un clon que contenga una secuencia parcial del gen *nodH* de la cepa LPU83, se utilizó la siguiente estrategia experimental. En primera instancia se amplificó, utilizando la técnica de PCR previamente detallada, un fragmento del gen *nodH* empleando los cebadores *nodH* R.spp. Luego dicho fragmento se ligó al vector comercial, para clonar fragmentos de PCR, pGem-T (Promega Cooperation).

Este plásmido (vector más fragmento) se electroporó usando células *DH5 α* electrocompetentes. Las colonias que contenían el inserto de interés fueron seleccionadas según su resistencia a antibióticos (Ap). La presencia de inserto se evaluó por PCR (amplificación del fragmento *nodH* de 360) en aquellos clones candidatos que mostraron ausencia de actividad β -galactosidasa en medio LB con X-Gal.

II-19. TRANSFERENCIA DE ADN A FILTROS DE NITROCELULOSA

La transferencia alcalina de ADN se llevó a cabo con el siguiente procedimiento: en primer lugar se incubó el gel de agarosa 1%, durante 1 hora en una solución de desnaturalización (NaOH 0,4 M y CINa 3,0 M). Luego el gel se lavó durante 15 min. con la solución de transferencia (8 mM de NaOH y 3,0 M de CINa , pH 11,4) y se colocó entre papeles absorbentes y sobre la membrana Hybond, formando un puente de papel por el que circula por capilaridad la solución de transferencia (una hora). Pasado este lapso de tiempo la membrana se neutralizó con buffer fosfato a pH 6,8 (NaH₂PO₄ / Na₂HPO₄ 0,2M de cada uno) por 10 minutos para provocar la renaturalización del ADN. Se la secó a 80°C y finalmente se fijó mediante exposición a luz UV 5 min.

II-20. HIBRIDIZACIONES DE ADN (*Southern-blot*)

Se utilizaron condiciones que favorecieron la hibridación de la sonda con regiones de ADN de alta similitud de secuencia (68°C, 5xSSC) y 2 lavados en 2xSSC, 0,1%SDS se realizaron a temperatura ambiente y 2 lavados en 0,1xSSC, 0,1% SDS a 65°C (Boheringer Manheim).

II-21. ENSAYOS CON PLANTAS

II-21.1. Plantas, esterilización de semillas en superficie y germinación.

II-21.1.1. Alfalfa

En los distintos experimentos se utilizó *Medicago sativa* (alfalfa), ecotipo CUF 101 como planta huésped. Las semillas de alfalfa fueron esterilizadas en superficie por inmersión en 2,5% de HgCl₂ durante 9 min., 30 seg. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente (5-6 veces) con H₂O estéril y se dejaron húmedas en reposo durante 2 h. A continuación, se extendieron en condiciones asépticas sobre placas Petri con ágar-agua, y se dejaron finalmente en oscuridad a 28°C hasta su germinación (24-48 h). Opcionalmente se pudo comprobar el grado de esterilidad extendiendo algunas semillas en placas de TY e incubándolas a 28°C

II-21.1.2. Phaseolus

Para los ensayos de nodulación de judía se utilizaron semillas de *Phaseolus vulgaris*. Las semillas de *phaseolus* se lavaron abundantemente con agua para eliminar restos de fungicida, posteriormente se esterilizó con hipoclorito de sodio (55 g/l) durante 10 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron abundantemente con agua. Los pasos posteriores son similares a las semillas de alfalfa.

II-21.2. Condiciones de cultivo

Todos los ensayos se realizaron en una cámara de cultivo de plantas mantenida en las

siguientes condiciones: fotoperíodo de 16/8 horas (luz/oscuridad), 25/18°C de temperatura (día/noche) y 50% de humedad relativa.

II-21.3. Cultivo axénico de plantas

II-21.3.1. Alfalfa

Cuando las plántulas alcanzaron una longitud de 1-2 cm, se introdujeron en condiciones asépticas en bolsas plásticas que contenían 10 ml de solución nutritiva y un soporte de papel de filtro, (cinéticas de nodulación /experimentos de competición). Para evitar que la luz incida directamente sobre las raíces, las bolsas se cubrieron en su mitad inferior con papel opaco y se llevaron a la cámara de cultivo de plantas. Alternativamente las plantas fueron crecidas en macetas con vermiculita y solución nutritiva.

II-21.3.2. Phaseolus

La infectividad de diversos rizobios sobre phaseolus se realizó con macetas conteniendo perlita como soporte.

II-21.3.3. Solución nutritiva

Como solución mineral libre de nitrógeno para los cultivos de alfalfa y phaseolus se utilizó la solución mineral libre de nitrógeno descrita por Howieson (Howieson et al., 1993).

Para amortiguar la variación en el pH de la solución nutritiva que pueda inducir la planta (Haynes, 1990) se utilizó 20mM de PIPES (a pH 7) ó 20 mM de MES (a pH 5,6) (Howieson, 1985). Estas soluciones se ajustaron a los correspondientes pHs, se esterilizaron a 120°C durante 20 minutos y se corrigió luego el pH cuando fue necesario.

Buffer (MES o PIPES)	20 mM
K ₂ SO ₄	1,0 mM
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2 mM
CaSO ₄	1,0 mM
EDDHA	2,0 μM
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0,03 μM
H ₃ BO ₃	3,0 μM
MnSO ₄ .4H ₂ O	0,1 μM
ZnSO ₄	0,75μM
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,2 μM
KH ₂ PO ₄	200 μM
CoSO ₄ .7H ₂ O	0,2 μM

Como solución mineral libre de nitrógeno para los cultivos de alfalfa del Capítulo V se utilizó la solución mineral libre de nitrógeno Fahreaus modificada (Lodeiro et al.1999).

II-21.3.4. Inoculación de los cultivos

La inoculación de las plantas de alfalfa con los cultivos bacterianos se hizo tras 5 días de permanencia en la cámara de cultivo.

En el caso de las bolsas plásticas se inoculó 100 μ l de suspensión bacteriana por planta (las cuales contenían entre 10^6 a 10^7 ufc/ml). Se hicieron recuentos en placa de los inóculos preparando diluciones seriadas de los mismos.

La inoculación de las plantas de *Phaseolus* se hizo en el momento de la siembra en perlita, añadiendo 1 ml de suspensión bacteriana en agua de la cepa en estudio.

II-21.4. Determinaciones realizadas:

II-21.4.1. Determinación de la cinética de nodulación de alfalfa a diferentes pHs.

Los ensayos se realizaron en bolsas plásticas (Mega Mineapolis International) según se indicó en la sección anterior con 10 ml de solución mineral de Howieson a pH 6,7 ó pH 5,6. A los 5 días post-germinación las raíces fueron inoculadas con 100 μ l de la suspensión de rizobios. Inmediatamente después de la inoculación se marcó en la bolsa la punta de la raíz (RT) y la posición de los pelos radicales emergentes menores (EH) usando una lupa con aumento 12x. Las plantas fueron crecidas en una cámara a 22°C y con un fotoperíodo de 16 horas.

Para seguir las cinéticas de nodulación se examinaron las raíces periódicamente y se marcó la posición y el número de nódulos en cada planta individualmente. La localización precisa de los nódulos fue digitalizada con la ayuda de una pizarra magnética (Genitizer GT 1212B) conectada a una computadora personal.

II-21.4.2. Peso seco de parte aérea de alfalfa

Los ensayos se realizaron en bolsas plásticas. La fijación de nitrógeno para cada tratamiento fue estimada midiendo el peso seco del tejido aéreo de cada planta con una balanza analítica, 30 días después de la fecha de inoculación para los ensayos en pouches. Las plantas se introdujeron en sobres de papel individuales, se secaron en estufa a 65°C durante 48 horas y se determinó el peso seco.

II-21.4.3. Medida de la competitividad para la nodulación

La determinación del número de nódulos que una cepa es capaz de formar en presencia de otra se hizo mediante identificación de cepas marcadas con diferentes resistencias a antibióticos.

Los inóculos fueron preparados a partir de cultivos en fase log tardía a los que se les estimó el número de bacterias por medida de D.O.₆₀₀. Se tomó de cada cultivo un volumen adecuado que se diluyó en el medio mineral estéril para conseguir la densidad celular deseada (10^6 - 10^7 ufc/ml según el experimento).

La inoculación de las plantas se realizó con suspensiones bacterianas formadas por la mezcla de dos cepas en proporción 1:1 y la mezcla se utilizó para inocular un mínimo de 20 plantas. Se partió para esto de cultivos bacterianos que tenían aproximadamente la

misma DO a 600 nm. Quince días después de la inoculación se cortaron las raíces noduladas, se esterilizaron superficialmente los nódulos.

Los patrones diferenciales de resistencia a antibiótico permitieron determinar la ocupación de cada una de las dos cepas inoculadas.

II-21.4.4. Reislamiento de rizobios de los nódulos

Los nódulos, aparecidos en los experimentos de competitividad, fueron separados de la planta y esterilizados en superficie con H₂O₂ al 20% durante 10 min. Seguidamente se lavaron vigorosamente con agua estéril 5-6 veces y se trituraron individualmente, en condiciones asépticas, con una varilla de madera. Una gota del triturado se extendió sobre placas de medio TY con el/los antibiótico/s requeridos para la selección.

II-21.4.5. Ensayos de microcosmos

Se utilizó tierra procedente del INTA Castelar con las características que se citan en la Tabla II.4.

Tabla II.4. Características relevantes del suelo utilizado.

Origen	Prov. de BsAs- Castelar
Fuente	INTA -Castelar
pH (H ₂ O); 1:1 (p:V)	5,6
pH (CIK, 1N); 1: 2,5 (p:V)	5,4
Factor de humedad	1,01
Materia Orgánica	2,76%
Carbón orgánico	1,60%
Nitrógeno total	0,81%
Relación C/N	8,9
Fósforo asimilable	28,1ppm
Condición de pasta	0,51 ms/Cm
Saturación de agua	51,3%

Se realizaron experimentos de:

- persistencia de la población bacteriana inoculada en suelo estéril (con y sin planta)
- competitividad por la nodulación de las cepas inoculadas en suelo estéril con plantas.

II-21.4.5.1. Preparación del suelo

Se secó el suelo al aire libre y se la pasó por un cedazo de 5 mm de tamaño de poro para eliminar partículas grandes y restos de raíces. La esterilización se realizó exponiendo la tierra a radiación gama (Ionics, Bs.As).

II-21.4.5.2. Ensayos de microcosmos sin planta. Estudio de la persistencia bacteriana

El estudio se realizó con el suelo estéril. Se dispusieron 10 g de suelo en tubos estériles de vidrio con tapón de algodón o de vidrio. Se añadió agua hasta alcanzar la capacidad de campo (previamente estimada en 30%) dejando que empape la tierra 4-6 horas. El pH del suelo para los tratamientos ácidos fue 5,6 (el propio del suelo) y para los neutros fue 7.0. Este último pH se consiguió corrigiendo el pH del suelo por agregado de 0,5 ml de KOH 1M en cada tubo. Se inoculó con 10^5 - 10^6 bacterias por gramo de suelo a partir de un cultivo bacteriano en comienzo de fase logarítmica tardía previamente lavado. Se retiraron tubos para recuento de rizobios viables a lo largo de aproximadamente 2 meses de ensayo.

II-21.4.5.2.1- Diseño experimental

Se dispusieron dos repeticiones de suelo por cepa bacteriana a ensayar en forma de monoinoculación y se incubaron a 28°C en cámara de plantas. Se hicieron recuentos bacterianos a las 2 horas de inoculación bacteriana (tiempo cero), y aproximadamente cada 3 días durante las primeras 3 semanas, y luego semanalmente. Los recuentos bacterianos se realizaron agregando 100 ml de solución mineral estéril a cada muestra, esta mezcla fue mantenida en agitación por 1 hora y se hicieron diluciones seriadas. Los plaques se realizaron en cajas de petri con TY y antibióticos de acuerdo a la cepa usada.

II-22- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos experimentales fueron analizados siguiendo ya sea una prueba de tipo t (Student) o un ANOVA según correspondió y se indica oportunamente para cada ensayo. En el caso particular de los experimentos de nodulación (cinéticas) y determinación de peso seco se analizó el efecto de dos factores: bacteria y pH. La variable bacteria constó de un control (sin inocular) y seis tratamientos (niveles) que correspondieron a 3 inoculaciones simples y 3 coinoculaciones.

La variable pH ha sido considerada a 2 niveles, un nivel ácido y un nivel neutro.

Se ha realizado así un ANOVA de un experimento factorial completo y desbalanceado. Se hicieron las modificaciones necesarias para armar el experimento que nos permitió considerar un ANOVA de efectos fijos.

II-23. OBTENCIÓN DE MUTANTES ESPONTÁNEOS RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

En cajas de Petri conteniendo TY con el antibiótico de interés se plaquearon alícuotas de 0,1 ml/caja de un cultivo en fase logarítmica tardía sin diluir. Las cajas se incubaron a 28°C durante 2 o 3 días, al cabo de los cuales se observó la aparición de colonias. Cada colonia constituyó un clón candidato resistente al antibiótico empleado. Las mismas

colonias se repicaron en cajas con medio fresco suplementados con antibiótico/s y se incubaron durante 2 días a 28°C para verificar crecimiento. En todos los casos la cepa original y el derivado resistente se comparan por técnicas de Fingerprint-PCR para detectar posibles contaminantes durante la selección.

II-24. OBTENCIÓN DE MUTANTES *Tn5*

Se intentó la identificación y aislamiento de los genes vinculados a la tolerancia a la acidez (*act*) en las cepas TA y TMA. Para ello, sobre la cepa LPU 83 escogida como TA y la LPU63 como TMA se realizó una mutagénesis generalizada con *Tn5* y *Tn5* B20("random"). También se usó la cepa de referencia *S. meliloti* 2011. Para la selección de los mutantes obtenidos se escogió el medio SGM a pH 5,0 (1.5% de ágar) donde las cepas TA eran capaces de crecer pero no lo hacían las TMA ni las SA. Para la selección de las mutantes de interés de la cepa TMA las placas utilizadas fueron tamponadas a pH 5,6.

De esta manera se buscaron potenciales mutantes que aún creciendo normalmente a pH 7,0 perdieran la capacidad de crecer a pH 5,0 (para seleccionar los posibles mutantes de interés de la cepa LPU83) y que perdieran la capacidad de crecer a pH 5,6 para la cepa LPU63.

II-25. CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS GENÓMICAS

Para la construcción de las bibliotecas genómicas se eligió una cepa representativa de los rizobios TA (LPU83) y una del grupo de los TMA (LPU63). De ambas bacterias se prepararon cantidades suficientes de ADN, como se ha descrito anteriormente en el punto II.11.

II-25.1. Preparación de DNA del cósmido

Para la preparación de DNA del cósmido se partió de un cultivo de 1 litro en medio Super Bross suplementado con ampicilina, el cual se creció a 37°C hasta aproximadamente una $DO_{600} = 4$. El medio super Bross posee la siguiente composición:

Triptona	32 g/l
Extracto de levadura	20 g/l
NaCl	5 g/l
pH	7,4

El cultivo se centrifugó a 6.000g, por 10 min. y a 4°C y se procedió a la lisis con tritón según fue descrito por Maniatis. Para la purificación del ADN se lo pasó por un gradiente de CICs según se describe en Maniatis.

Después de las extracciones con Butanol-TE, se extrajo con éter y se procedió a

fenol:cloroformo. El DNA luego se limpió de la misma manera que fue descrito anteriormente en el punto II.25.2. Se resuspendió en 10 µl de H₂O y se juntan todas las alícuotas en un microtubo. Se volvió a medir la concentración de ADN.

II-25.5. Digestiones parciales del ADN total bacteriano con *Sau* 3A

Se pusieron de a 100 µg del ADN bacteriano con 0,01u/µg de ADN de *Sau*3A y se lo incubó a 37°C por 5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 minutos. La digestión enzimática se inactivó poniendo cada microtubo por 30 minutos a 65°C.

Luego se tomó 35 µl de cada muestra y se corrió un gel de agarosa 0,4%-TBE para elegir el tiempo donde la digestión haya producido fragmentos de entre 30 y 50 kb de tamaño. Una vez seleccionado el mejor tiempo se realizó una extracción con fenol : cloroformo y se precipitó el ADN como ya se ha sido descrito. El pellet se resuspendió en 50 µl de H₂O y se midió la concentración de ADN.

II-25.6. Desfosforilación de las digestiones parciales del ADN bacteriano.

Las digestiones se realizaron de la forma descrita en el punto II.25.3., poniendo 0,0125 u fosfatasa alcalina por cada 1 µg de ADN y se lo incubó 1 hora a 37°C.

Luego la enzima se inactivó por tratamiento térmico como ya fue descrito y se extrajo el ADN y se lo purificó siguiendo el mismo procedimiento que en II.25.2..

II-25.7. Empaquetamiento de los cósmidos recombinantes.

Luego de ligar los 2 brazos del cósmido con los fragmentos del ADN bacteriano se prosiguió al empaquetamiento de la ligación siguiendo las instrucciones del kit comercial Gigapact II Gold , Packing Extract - Stratagene.

II-25.8. Infección de *E.coli* NM554

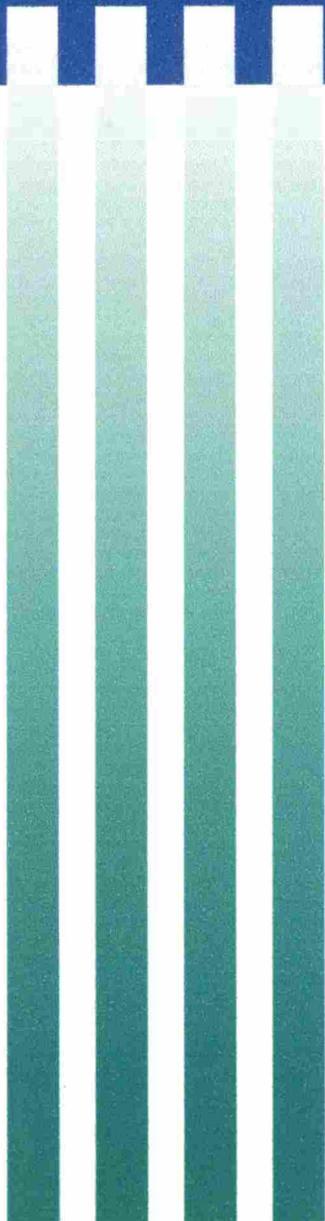
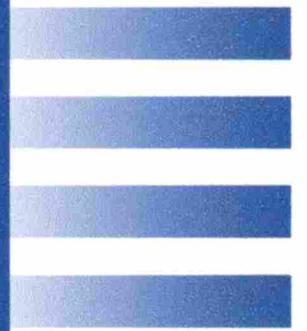
Se realizó la infección de las bacterias siguiendo el protocolo del kit comercial Gigapact II Gold , Packing Extract - Stratagene.

Los plaqueos se realizaron en LB con ampicilina y las placas de petri se incubaron durante toda la noche a 37°C. Se obtuvieron entre 3000 y 5000 clones para cada una de las bibliotecas, número que estadísticamente indica la cobertura completa de los genomas cuando los insertos eran de 30-50 kb.

II-25.9. Almacenamiento de las bibliotecas genómicas

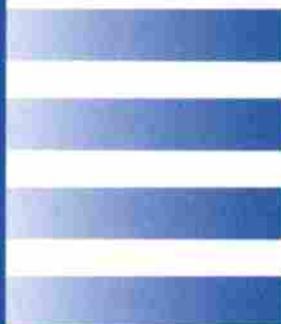
Cada clon fue guardado y es conservado en forma independiente a -70°C.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES



CAPÍTULO III

Aislamiento y análisis de las características culturales de ácido tolerancia de rizobios noduladores de alfalfa presentes en suelos ácidos de centro Argentina



III.1. INTRODUCCIÓN.

Como hemos mencionado en los Objetivos de este trabajo, uno de los aspectos más relevantes del cultivo de alfalfa es la preservación de la fertilidad nitrogenada de los suelos mediante una simbiosis eficiente con rizobios fijadores de nitrógeno. Sin embargo, en condiciones de acidez, la asociación de alfalfa con rizobios está seriamente limitada. Como ya hemos mencionado en este trabajo, son diversos los efectos de la acidez sobre la asociación de rizobios con alfalfa, incluyendo alteraciones en la planta, la bacteria, y en la propia interacción simbiótica (véase Introducción, secciones sección I.5.1). Sin embargo, la muy limitada tolerancia a la acidez de *S. meliloti* es posiblemente uno de los factores que más severamente perjudica la simbiosis de este rizobio con alfalfa a bajo pH. La elevada sensibilidad de *S. meliloti* a la acidez comparado con otros rizobios, es un hecho muy bien documentado en la literatura (Graham and Parker, 1964; Graham, 1992;). Dicha característica puede pensarse que afecta negativamente tanto el crecimiento como las funciones simbióticas de la bacteria en acidez. El tiempo de generación de *S. meliloti* en cultivos de laboratorio disminuye mucho por debajo de pH 6, y el crecimiento prácticamente se detiene a pH 5,6-5,5 (Glenn *et al.*, 1994; Tiwari *et al.*, 1992). Como veremos en este Capítulo, en esos mismos límites de pH se encuadra la acidez de una proporción importante de los suelos que hemos estudiado.

Cabe mencionar que contrastando con el comportamiento de ácido tolerancia típico de las cepas de *S. meliloti*, se ha encontrado un tipo de rizobio nodulador de alfalfa muy tolerante a la acidez y cuya especie aún no ha sido asignada (Eardly *et al.*, 1992). Sin embargo, la cepa representativa de esos rizobios, *R. spp.* Or191, es completamente ineficiente para fijar nitrógeno en alfalfa.

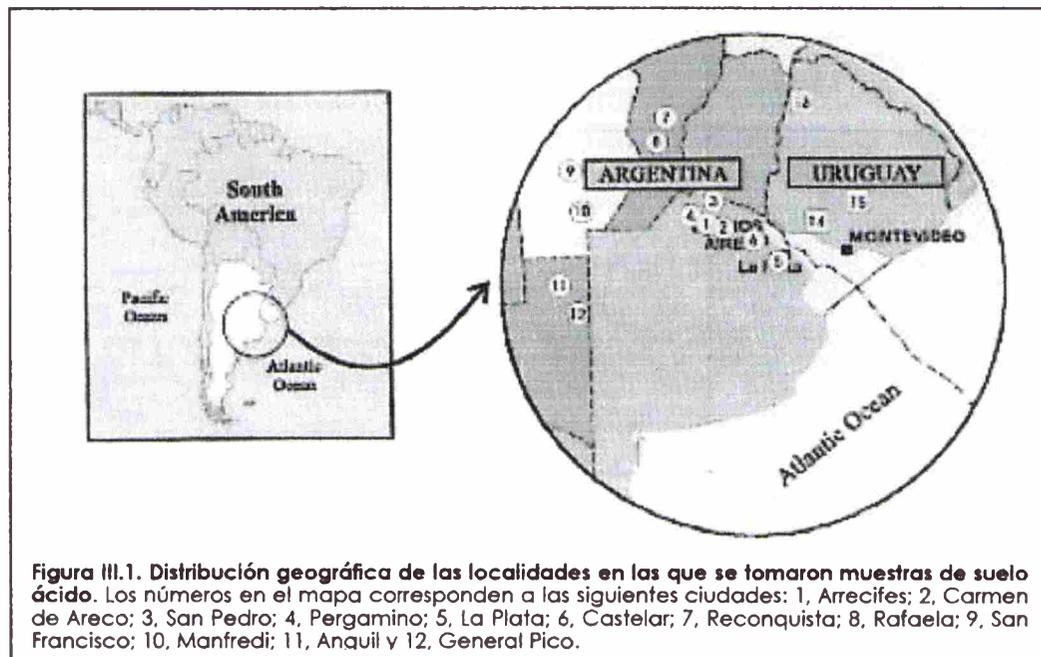
Un primer paso importante hacia el mejoramiento de la asociación rizobio-alfalfa en los suelos locales afectados por el bajo pH es sin duda el relevamiento y caracterización de las poblaciones existentes de rizobios naturalizados. De ese modo puede por un lado evaluarse el tipo de germoplasma presente en los propios suelos ácidos, y eventualmente abordar la selección en una etapa posterior de aquellas cepas que se resulten más eficientes en su simbiosis con alfalfa. En relación a esta última posibilidad, no debe descartarse es que sobre las poblaciones de rizobios de los suelos ácidos locales haya existido una selección positiva en favor de aquellas variantes genéticas más tolerantes y adaptadas en su simbiosis a las condiciones operantes de bajo pH. La búsqueda, selección e inoculación de cepas de *S. meliloti* más tolerantes a la acidez, ya ha mostrado ser una estrategia útil para el establecimiento de pasturas de alfalfa en suelos francamente ácidos (Howieson, 1986).

En este Capítulo presentamos la construcción y caracterización inicial de una colección de aislamientos noduladores de alfalfa recuperados de suelos ácidos locales. De acuerdo con lo expuesto en los párrafos precedentes, en la fase inicial de la caracterización de las cepas hemos puesto particular atención en el análisis de su tolerancia a la acidez.

III.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

III.2.1. Aislamiento de rizobios noduladores de alfalfa (ANR) recuperados de suelos ácidos de centro Argentina.

En esta sección se describen las características más relevantes de los sitios muestreados de donde se recuperaron nódulos de alfalfa a campo, o muestras de suelo ácido para su posterior empleo en ensayos de nodulación en condiciones de laboratorio.



Los aislamientos se realizaron a partir de muestras de suelo de distintas localidades de las provincias de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe y La Pampa. En la Figura III.1 se presentan algunas de las localidades más representativas en las que se han obtenido muestras. La elección de los sitios de muestreo fue realizada a partir de información previa recibida de personal del INTA, extensionistas y productores rurales locales. Para cada uno de los sitios de muestreo se determinó el valor de pH del suelo según se describe en Mat. y Mét. sección II.4. Dichos valores junto al origen de las muestras de suelo y sus fechas de recolección fueron depositadas en una base de datos que hemos generado. Según se muestra en la Tabla III.1. aproximadamente el 70% de los sitios de muestreo poseían pHs inferiores a 6,5; un 40% de los sitios pHs inferiores a 6,0; y un 13% pHs inferiores a 5,5.

TABLA III.1. Características de pH de los suelos muestreados.

Rango de pH del suelo	Número de muestras analizadas	% del total de las muestras
4.50 - 4.99	1	0.58
5.00 - 5.49	21	12.21
5.50 - 5.99	52	30.23
6.00 - 6.49	56	32.56
6.50 - 6.99	22	12.79
≥ 7.00	20	11.73
Total	172	100

Los resultados de la Tabla III.1 indican que los muestreos fueron realizados en efecto sobre suelos que son ácidos en una proporción importante. Con el propósito de rescatar rizobios noduladores de alfalfa presentes en dichos suelos se siguieron dos procedimientos posibles:

- a) recuperación de rizobios a partir de nódulos recolectados en el campo.
- b) recuperación de rizobios mediante ensayos de nodulación en condiciones de laboratorio empleando las muestras de suelo ácido. Estos ensayos fueron realizados en macetas plásticas sembradas con plantas de alfalfa variedad CUF101 como planta "atrapadora" (*trapping plant*) (Mat. Y Mét. sección II.20.).

Ambas estrategias estuvieron dirigidas a la obtención de rizobios potencialmente adaptados a las condiciones de las zona muestreadas con bajo pH. En todos los casos los nódulos obtenidos fueron esterilizados superficialmente, machacados en solución estéril, y los rizobios aislados en medio sólido según se indica en Materiales y Métodos sección II.20.4.4. La mayoría de los aislamientos que hemos obtenido empleando los procedimientos anteriores provienen de los ensayos de nodulación en condiciones de laboratorio. Un muy bajo número de nódulos pudo ser recuperado de las plantas de alfalfa presentes en los suelos ácidos durante las excursiones a campo (Tabla III.2.). Esta observación refuerza la información previa de que en condiciones ácidas a campo es bajo el número de nódulos presentes en las plantas de alfalfa. Ello puede deberse ya sea a que el número de rizobios presentes en los suelos ácidos es bajo, y/o a que las condiciones que operaron para el desarrollo de la simbiosis a campo fueron muy desfavorables. Si bien el número de rizobios en los suelos puede ser bajo, en la mayoría de las muestras hemos podido recuperar rizobios de nódulos en ensayos de laboratorio en condiciones de temperatura y riego controlado (todos los ensayos de nodulación que hemos realizado en el laboratorio fueron realizados con muestras de suelo a su pH original). Estas observaciones sugieren que los componentes climáticos y las condiciones de siembra y desarrollo de la planta, condicionan mucho la formación de nódulos a campo en los suelos ácidos que hemos analizado.

TABLA III.2. Distribución de los aislamientos noduladores de alfalfa de acuerdo al pH de los suelos de donde fueron aislados.

	Aislamientos de rizobios obtenidos de nódulos recolectados en el campo				Aislamientos de rizobios obtenidos de ensayos de nodulación en el laboratorio.			
	Aislamientos de rizobios SA-TMA ^b		Aislamientos de rizobios TA ^c		Aislamientos de rizobios SA-TMA		Aislamientos de rizobios TA	
	Nº	% ^a	Nº	% ^a	Nº	% ^a	Nº	% ^a
4.50 – 4.99	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
5.00 – 5.49	1	0.34	0	0.00	5	1.72	0	0.00
5.50 – 5.99	10	3.44	0	0.00	67	23.02	8	2.74
6.00 – 6.49	11	3.78	0	0.00	94	32.30	5	1.71
6.50 – 6.99	7	2.41	0	0.00	70	24.05	0	0.00
≥ 7.00	0	0.00	0	0.00	13	4.47	0	0.00
Total	29 ^b	9.97	0	0.00	249 ^c	85.56	13 ^d	4.45

a- Calculado usando 291 aislamientos como el 100% (29^b + 249^c + 13^d).

b- rizobios SA-TMA: rizobios noduladores de alfalfa sensibles a la acidez-moderadamente resistentes (ver sección siguiente III.2.2.).

c- rizobios TA: rizobios noduladores de alfalfa resistentes a la acidez.

Como resultado de los ensayos que he descripto en esta sección hemos construido una colección de más de 350 rizobios noduladores de alfalfa, en su mayoría recuperados de suelos ácidos. Sus características más relevantes como suelo de origen y valor de pH, fechas de recolección, período de conservación, etc., han sido almacenados para su consulta en una base de datos. Además de los rizobios que forman parte de esta colección, un grupo similar de aislamientos ha sido obtenido y analizado por colegas de Uruguay a partir de suelos ácidos de ese país (Dra. G. Martínez-Drets, Instituto Clemente Estable, Montevideo-Uruguay). En esa colección también se han podido identificar aislamientos SA mayoritarios y un aislamiento TA con características similares a los aislados de los suelos de Argentina.

III.2.2. Características de tolerancia a la acidez de los aislamientos noduladores de alfalfa de la colección.

Los estudios de crecimiento bacteriano en medio definido a diferentes pHs son importantes para caracterizar el efecto de la acidez sobre los rizobios. La utilidad de dichos ensayos se sustenta en considerar que, muy posiblemente, las cepas que son "tolerantes a la acidez en condiciones de suelo" constituyen un subgrupo de las cepas que son "ácido tolerantes en condiciones de laboratorio". De todos modos, es también posible que cepas

que son moderadamente resistentes en condiciones de laboratorio tengan una buena supervivencia en suelos con pH ácido. Esto puede ser posible dado que la estructura del suelo ofrece micro-ambientes particulares dentro de los cuales las condiciones de entorno percibidas por las bacterias pueden ser muy distintas a las que corresponden a la fase líquida libre. Más allá de esta consideración, toda cepa que resulte más tolerante a la acidez que otra en condiciones de laboratorio, será seguramente más tolerante en condiciones de suelo. Por esa razón, cualquier estudio complejo de persistencia en condiciones de suelo debería estar precedido por ensayos más simples de caracterización de las cepas en medios de cultivo con condiciones de pH bien definidas.

De acuerdo a los datos de la literatura los ensayos de tolerancia en condiciones de laboratorio pueden ser realizados tanto en medio sólido (Chen *et al.*, 1993, Riccillo *et al.*, 2000) como en medio líquido (Lowendorf y Alexander, 1983; Gemell *et al.*, 1993). En este trabajo hemos evaluado en una primera instancia el crecimiento de los 350 aislamientos de la colección en medio de cultivo líquido a distintos pHs. Para ello hemos empleado el medio mínimo SGM que contiene sacarosa y glutamato de sodio como fuente de carbono y nitrógeno (Mat. y Mét., sección II.2.1). Los medios a pH 5,0 y 5,5 fueron tamponados con 20 mM MES; y los medios a pH 6,0 y 7,0 fueron tamponados con 20 mM PIPES (Mat. y Mét. sección III.2.1.). Cada una de los aislamientos fue inoculado en medios a cada uno de los pHs indicados e incubados a 28°C y 180 rpm durante 4 días. Al cuarto día se comparó la DO_{600nm} correspondiente a cada aislamiento respecto de cepas control de *S.meliloti* (ej. 2011). En una segunda instancia confirmatoria, todas las cepas de la colección fueron ensayadas en el mismo medio mínimo SGM tamponado, pero agarizado según se muestra en la Figura III.2. Dicho sistema de análisis en medio sólido fue utilizado luego para la selección de mutantes insercionales *Tn5* alterados en la tolerancia a la acidez según se presenta en el Capítulo VII de esta Tesis.

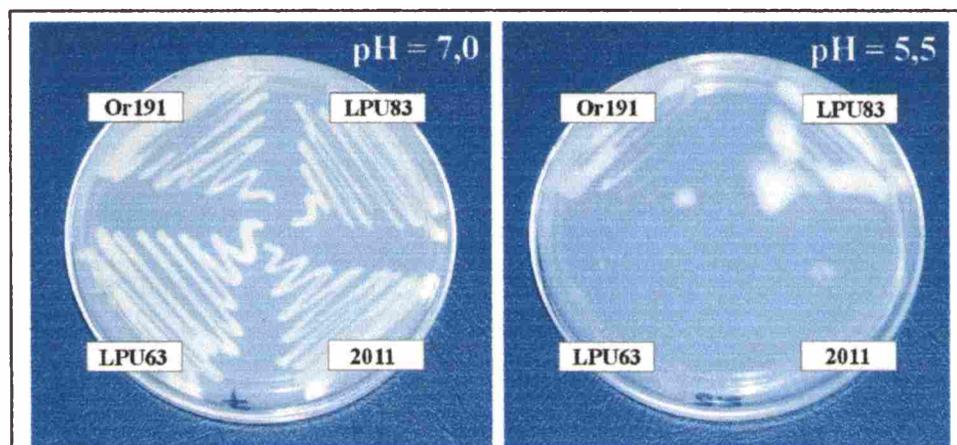


Figura III.2. Crecimiento de rizobios noduladores de alfalfa en medio mínimo agarizado a diferentes pHs. Cultivos de cada uno de los rizobios ensayados se repicaron en cajas de medio mínimo SGM a los pHs indicados y se incubaron 48 h a 28 °C. Los rizobios LPU63 y LPU83 corresponden a aislamientos locales clasificados como TMA, TA, respectivamente. Como cepas control se utilizaron *S. meliloti* 2011 (SA), y la cepa R. spp. Or191 (TA) aislada en Oregon-USA (Eardly *et al.*, 1985).

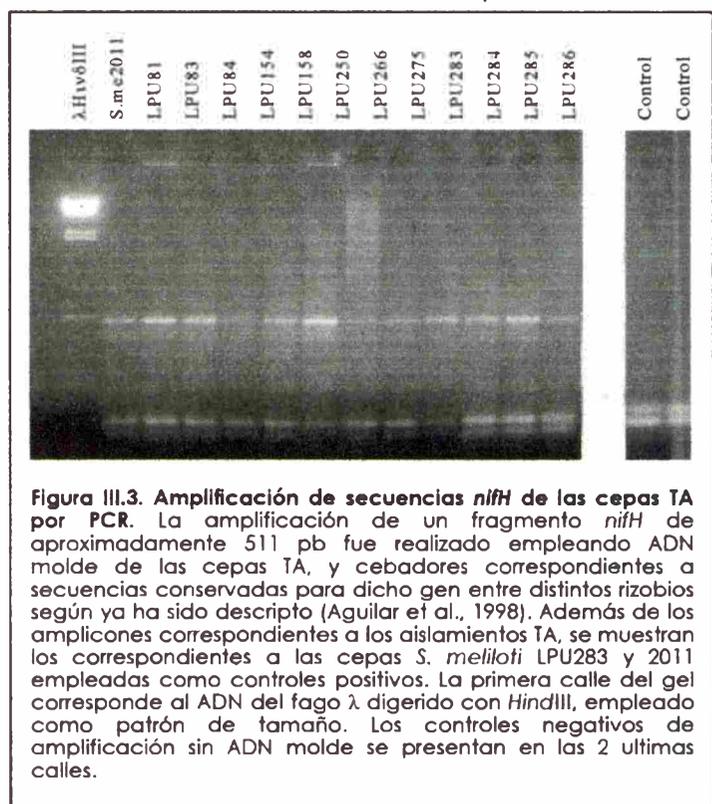
De acuerdo al nivel de tolerancia a la acidez los aislamientos fueron agrupados en 3 categorías diferentes según se indica a continuación:

- a- sensibles a la acidez (**SA**), incluye aislamientos que sólo pueden crecer a pH mayores que 6,0.
- b- de tolerancia moderada a la acidez (**TMA**), representada por rizobios con pHs mínimos de crecimiento entre 6,0 y 5,5. La inclusión de aislamientos en esta categoría ha sido en muchos casos difícil dada la variabilidad en el crecimiento de los rizobios a pH inferiores a 6,0. A pHs cercanos a 6,0 cambios en 0,2-0,3 unidades de pH produjeron cambios muy marcados en las velocidades de crecimiento. Además, a pHs cercanos a 6,0 se observaron en algunos casos fases *lag* muy largas previo al inicio de un crecimiento muy débil.
- d- tolerantes a la acidez (**TA**), incluye aislamientos que pueden crecer a pHs menores que 5,0.

De acuerdo a las categorías establecidas precedentemente, más del 94% de los rizobios noduladores de alfalfa correspondió a las categorías SA. En la categoría TMA fueron incluidos los siguientes 7 aislamientos (2%): LPU7, LPU11, LPU18, LPU30, LPU63 y LPU119 y LPU 283. Finalmente, sólo 12 rizobios fueron asignados a la categoría TA (4%) (aislamientos LPU81, LPU83, LPU84, LPU154, LPU158, LPU250, LPU264, LPU266, LPU275, LPU284, LPU285 y LPU286). La inclusión de estos 12 aislamientos en la categoría de mayor tolerancia ha sido sencilla dado que presentaron un comportamiento claramente diferencial del correspondiente al resto de los aislamientos. Debido a ello, en una primera instancia sospechamos que podía tratarse de bacterias que no eran rizobios y que podían haber surgido de una esterilización superficial deficiente de los nódulos. Esto pudo ser descartado a partir de los dos ensayos siguientes:

- a) Verificamos por PCR en los aislamientos TA la presencia del gen *nifH* correspondiente a una de las subunidades estructurales de la nitrogenasa (Figura III.3.).
- b) Por otro lado, reconfirmamos la capacidad de cada uno de los 12 aislamientos TA para nodular alfalfa.

Como mostraremos en el capítulo siguiente, en una instancia posterior del trabajo, hemos podido verificar



que los rizobios TA poseen características fenotípicas y genotípicas muy diferentes de los aislamientos de las categorías SA y TMA.

Cabe destacar que hemos intentado analizar las propiedades de crecimiento de las cepas en el mismo medio SGM pero usando amonio como única fuente de nitrógeno en lugar de glutamato. En esos ensayos el crecimiento de las cepas TA fue en muchos casos dificultoso a pH 5,0, e incluso errático. Dado que el amonio debería ser incorporado al metabolismo celular en forma muy directa, las dificultades de crecimiento en acidez pueden derivar de que por un lado el consumo de amonio genera un balance acido-base neto para la bacteria que sea desfavorable que el correspondiente al uso del glutamato (*S. meliloti* crecido con glutamato por ejemplo no acidifica el medio como lo hace al crecer con amonio). Por otro lado, el glutamato es un muy buen agente quelante de pequeñas cantidades de metales pesados que pueden provenir de las drogas con que se hayan preparado los medios, y que en caso de estar libres son extremadamente tóxicos para las bacterias en condiciones de acidez (Tiwari, 1996 a y b). Por estas razones es que en el resto del trabajo se utilizó glutamato como fuente de nitrógeno en los medios mínimos. (sigue el texto en la próxima página).

Tablalll.3: Origen geográfico y pH de los suelos de los que fueron recuperados los aislamientos TA y TMA.

Cepa	Localización del	pH del suelo	Tolerancia	Procedencia
LPU7	Castelar, BsAs	5,60	TMA	este trabajo
LPU11	Castelar, BsAs	5,96	TMA	este trabajo
LPU18	Castelar, BsAs	5,60	TMA	este trabajo
LPU30	Rafaela, Santa Fe	6,04	TMA	este trabajo
LPU63	Castelar, BsAs	5,89	TMA	este trabajo
LPU119	Arrecifes, BsAs	6,64	TMA	este trabajo
LPU283	Santa Fe	5,68	TMA	este trabajo
LPU81	Castelar, BsAs	6,08	TA	este trabajo
LPU83	Castelar, BsAs	6,08	TA	este trabajo
LPU84	Castelar, BsAs	6,08	TA	este trabajo
LPU154	Arrecifes, BsAs	6,20	TA	este trabajo
LPU158	Arrecifes, BsAs	6,20	TA	este trabajo
LPU250	Santa Fe	5,49	TA	este trabajo
LPU264	Santa Fe	5,52	TA	este trabajo
LPU266	Santa Fe	5,52	TA	este trabajo
LPU275	Santa Fe	5,92	TA	este trabajo
LPU284	Santa Fe	5,55	TA	este trabajo
LPU285	Santa Fe	5,55	TA	este trabajo
LPU286	Santa Fe	5,55	TA	este trabajo
R spp.Or191	Oregon, USA	5,5-5,7	TA	Eardly, USA
<i>S.me</i> 2011	No Disponible	No	SA	Dénarié, Francia

En la tabla III.3 se muestran las características de los suelos de los cuales fueron recolectados los aislamientos agrupados como TMA y TA. Puede observarse que los 12 aislamientos pertenecientes a la colección de ácidos-tolerantes (TA) provienen de suelos con pHs comprendidos entre 5,5 y 6,5. Los resultados muestran que si bien las cepas TA han sido mayoritariamente aisladas de suelos moderadamente ácidos, el pH de esos suelos no es en promedio significativamente inferior al de los suelos de donde se han recuperado los aislamientos TMA. De los datos disponibles no puede deducirse entonces ninguna correlación clara entre el pH de los suelos analizados y la ácido tolerancia de los rizobios presentes. Tampoco conocemos si la presencia de cepas TA es patrimonio exclusivo de los suelos ácidos como los que hemos muestreado en este trabajo. Será importante comparar estos resultados con estudios similares sobre poblaciones de rizobios noduladores de alfalfa presentes en suelos neutros de larga data, para determinar cómo se corresponden sus niveles de tolerancia a la acidez con los de los rizobios aquí encontrados. Desconocemos la existencia de estudios sistemáticos de ese tipo sobre poblaciones de rizobios locales.

Desde un punto de vista formal, para que los rizobios tengan éxito luego de su inoculación en suelos ácidos los mismos deben ser capaces de sobrevivir y mantener sus funciones celulares en el nuevo entorno con bajo pH, y crecer y colonizar en esas condiciones desfavorables el complejo ambiente del suelo y la rizosfera. La "ácido-tolerancia en suelos" según ha sido considerada por Howieson (1995a) resulta de la combinación de una serie muy diversa de características de los rizobios. El concepto parece estar centrado en la capacidad de sobrevivencia de la bacteria en el ambiente ácido suelo. Dichas consideraciones sobre la ácido tolerancia no hacen mención, sin embargo, a la capacidad que deben tener los rizobios tolerantes para desempeñar funciones simbióticas en acidez y asociarse con la planta huésped, el otro nicho que pueden ocupar en el suelo. Los rizobios, además de ser tolerantes al bajo pH como condición indispensable (de mínima), deberán ser activos simbióticamente frente a la planta en las mismas condiciones de acidez. En este Capítulo inicial, sólo hemos enfocado el análisis sobre la caracterización de la ácido tolerancia de los aislamientos locales.

Los estudios *in vitro* de tolerancia a la acidez han sido realizados en general mediante crecimiento de los rizobios en medios líquidos y sólidos variando el pH. Por ambos métodos se ha comprobado que la especie *S. meliloti* crece a un pH mínimo de 5,5-6,0 pudiendo variar el límite de tolerancia de acuerdo al tipo de medio y concentración de Ca⁺⁺ utilizada (Glenn *et al.*, 1994; Graham *et al.*, 1994). Si bien los ensayos en medio líquido como el que hemos empleado en el primer análisis permitió evaluar mejor las características de tolerancia de los aislamientos, el ensayo en medios agarizados como el empleado en segundo término resultó mucho más eficiente para el re-escrutinio de la colección completa de cepas.

A partir de los ensayos realizados tanto en medio líquido como en medio sólido, en este Capítulo se han establecido 3 categorías de rizobios noduladores de alfalfa de acuerdo a sus pH mínimo de crecimiento: SA ("sensibles a la acidez") aquellos que no logran crecer a pHs inferiores de 6,0; rizobios TMA ("moderadamente tolerantes") que crecen a pHs no inferiores a 5,5; y finalmente rizobios TA ("tolerantes a la acidez") con capacidad de crecer aún a pHs inferiores a 5,0. En el crecimiento en medio líquido los aislamientos SA y TMA presentaron un comportamiento de tolerancia a la acidez similar al previamente descrito para algunos *Sinorhizobium meliloti* y para la cepa *S. medicae* WSM419 (Howieson y Ewing, 1986): (1) hay un incremento en el tiempo de generación al disminuir el pH; (2) dejan de crecer en el intervalo de pH 6,0-5,5 y (3) mejoran su crecimiento en acidez al añadir Ca^{++} (Segundo *et al.*, 1998; Glenn *et al.*, 1994; Graham, 1992). Cabe señalar que las asignaciones de *S. meliloti* y *S. medicae* han sido generadas a partir del grupo de cepas originariamente designadas como *Rhizobium meliloti* (Rome *et al.*, 1996). Segundo *et al.* (1998) en colaboración con nuestro laboratorio han asignado la especie *S. meliloti* a los aislamientos MAT basado en el secuenciamiento parcial del ARN 16S.

Los aislamientos TA, en los ensayos de crecimiento líquido, apenas variaron su crecimiento por las modificaciones de pH entre 7,0 y 5,6 (Balagué, comunicación personal; ver curvas de crecimiento de la cepa LPU83 en Figura VII.3., capítulo VII) con lo que mostraron un comportamiento muy diferente con respecto a la tolerancia a la acidez descrita para *S. meliloti* y *S. medicae*. Estos rizobios tienen una ácido tolerancia comparable a la de rizobios aislados de alfalfa en suelos ácidos de Oregón como la cepa *R. spp.* Or191 con capacidad de crecer a pH 5,2 (Eardly *et al.*, 1992; 1994). La velocidad de crecimiento en acidez de nuestros aislamientos TA no se modifica por el agregado del catión Ca^{++} (Segundo *et al.*, 1998).

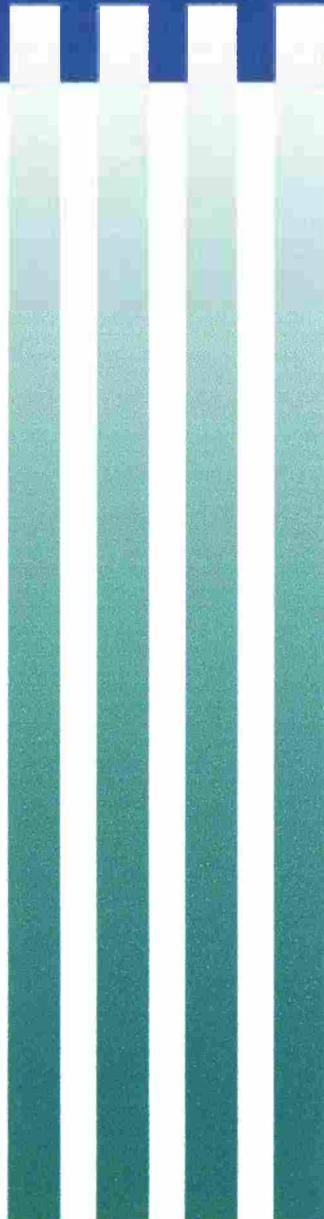
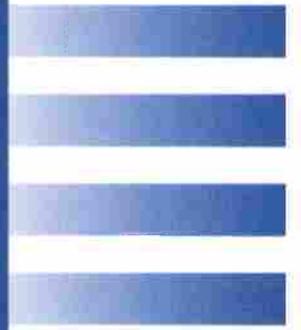
De acuerdo a los grupos que hemos definido en este capítulo, los aislamientos de los grupos SA y TMA tienen un comportamiento similar al descrito en la literatura para distintas cepas de *S. meliloti* / *S. medicae* (Howieson *et al.*, 1992; Reeve *et al.*, 1993). Cabe destacar además, que las cepas *S. medicae* WSM419 y *S. meliloti* WSM826 consideradas en la literatura (Howieson *et al.*, 1988) como buenas tolerantes a la acidez (pH 5,6), en nuestras condiciones no presentaron diferencias significativas con los aislamientos TMA locales. En medios agarizados a pH 5,5 no hemos observado crecimiento de las cepas WSM419 y WSM826 (resultados no mostrados). Esta última desarrolla sin embargo una simbiosis efectiva con alfalfa en suelos ácidos (Tiwari, comunicación personal). Es evidente que la ácido tolerancia de la cepa WSM826 le permite en las condiciones de los suelos ácidos inoculados expresar en forma adecuada sus características simbióticas.

En este Capítulo hemos realizado el aislamiento de cepas naturalizadas de rizobios noduladores de alfalfa con el propósito de obtener germoplasma local y analizar sus características de tolerancia a la acidez en condiciones de laboratorio, en una primera fase. En los capítulos siguientes presentaremos la caracterización fenotípica y genotípica de aislamientos representativos de los grupos TMA y TA (Capítulo IV), su caracterización

simbiótica (Capítulos V y VI), y finalmente el análisis de determinantes genéticos de ácido tolerancia y su relación con la simbiosis (Capítulo VII).

CAPÍTULO IV

Estudio de la biodiversidad de los rizobios que nodulan alfalfa aislados de suelos ácidos locales.



IV. INTRODUCCIÓN.

IV.1. Métodos utilizados en la caracterización genotípica de rizobios.

Como ocurre con otros géneros bacterianos, los estudios sobre biodiversidad de rizobios han sido realizados empleando distintas técnicas de caracterización fenotípica (producción de melanina, morfología de colonia, crecimiento con distintas fuentes de carbono y energía, perfiles de lipopolisacáridos, ensayos de nodulación con distintas plantas hospedadoras, perfil de proteínas totales, etc.) y genotípica (análisis del perfil de plásmidos, amplificación de genes específicos, hibridación de ácidos nucleicos, técnicas de huella digital de ADN (*fingerprints*), etc.) (de Bruijn *et al.*, 1992; Leung *et al.*, 1994, Simon *et al.*, 1991; Casse *et al.*, 1979; Martínez-Romero, 1994; Martínez Romero y Caballero Mellado, 1996).

Las nuevas metodologías para la caracterización genotípica de microorganismos basadas en métodos moleculares, han alcanzado una amplia difusión debido fundamentalmente a la rapidez y sensibilidad de los ensayos, al número de muestras que pueden ser procesadas simultáneamente y en un corto período de tiempo, y a la reproducibilidad de los resultados obtenidos. En particular, es muy amplio el uso de las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Saiki *et al.*, 1988). Dicha reacción puede resultar en un único producto de amplificación al usar cebadores oligonucleotídicos específicos de cepas, especies, géneros o grupos de bacterias. Esos productos pueden ser comparados en su tamaño o en su secuencia nucleotídica ya sea por secuenciamiento directo, o por técnicas como SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*), o DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), por ejemplo. Alternativamente, la PCR puede dar lugar a varios productos de amplificación si se emplean cebadores adecuados. Estos productos de amplificación que pueden ser muy variados en tamaño e intensidad, son usados frecuentemente para definir "huellas digitales de ADN" (*fingerprints*) en geles de agarosa o acrilamida que son característicos de una determinada cepa o aislamiento. Este tipo de perfiles de amplificación pueden ser obtenidos con cebadores cortos de secuencias arbitrarias (DAF, Caetano Anollés *et al.*, 1991; RAPD, Williams *et al.*, 1990), o con cebadores que poseen secuencias conservadas y repetidas en genomas de bacterias (Versalovic *et al.*, 1991; De Bruijn *et al.*, 1992). En relación a estos últimos han sido muy utilizadas como cebadores las secuencias palindrómicas extragénicas repetitivas (REP, *Repetitive Extragenic Palindromic sequences*), y las secuencias intergénicas consenso repetidas en enterobacterias (ERIC, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences*) (Versalovic *et al.*, 1991; De Bruijn *et al.*, 1992). Los elementos ERIC fueron descubiertos en regiones intergénicas no codificantes de *E. coli* y *S. typhimurium* (Hulton *et al.*, 1991). Estas son unidades repetitivas pequeñas que contienen una región central conservada. Usando los cebadores complementarios a las secuencias conservadas, Versalovic *et al.* (1991) demostraron que pueden generarse perfiles complejos de amplificación usando la técnica

de PCR en bacterias pertenecientes a *Enterobacteriaceae*. Sin embargo hibridaciones *Southern* y amplificaciones por la técnica de PCR indicaron una amplia distribución de las secuencias ERIC (y similares a ERIC) en otras eubacterias.

Además de los métodos anteriores, desde 1988 se han utilizado en *Sinorhizobium meliloti* técnicas de *IS-fingerprints* que consisten en digerir el ADN total bacteriano con una enzima de restricción, y observar el patrón de hibridación que aparece con una sonda de ADN correspondiente a una secuencia de inserción particular (Weatcroft *et al.*, 1988). Las secuencias de inserción (IS) se definen como entidades genéticas móviles relativamente pequeñas (de 700 a 2500 pb nucleotídicas), y que a diferencia de los transposones no poseen genes de resistencia a drogas y/o antibióticos. Las inserciones de estos elementos que se encuentran dispersas en el genoma (plásmidos y cromosoma) son capaces de provocar inversiones, deleciones y fusiones de replicones que conduzcan a la activación y expresión de genes crípticos. En *S. meliloti* se ha utilizado la técnica de *IS-fingerprint* con la secuencia de inserción ISRm2011-2 para caracterizar, por ejemplo, poblaciones de cepas de *S. meliloti* aisladas de suelos (Kosier *et al.*, 1993; Selbitschka *et al.* 1995; Villadas *et al.*, 1996; Niemann *et al.*, 1997). Dicha secuencia de inserción de 1055 pb fue aislada de *S. meliloti* 2011 en 1991 (Simon *et al.*, 1991) y tiene la particularidad de estar presente en todas las cepas de *S. meliloti* que han sido analizadas. Esta característica la hace muy útil en su uso como sonda para la generación de *fingerprints* por hibridación. Este tipo de herramientas ha sido utilizada recientemente para caracterizar las cepas de la colección que hemos presentado en el Capítulo precedente (Wegener *et al.*, 2001).

Además de los métodos que hasta aquí he comentado existen otras metodologías que están dirigidas al estudio de la sistemática de bacterias más que a la caracterización de la diversidad genética entre cepas relacionadas. Entre los métodos que se emplean para establecer el género y especie de bacterias y en particular de rizobios se destacan: el estudio de la secuencia (parcial o total) de nucleótidos del ARN ribosómico 16S (Young *et al.*, 1992, Weisburg *et al.*, 1991), ensayos de hibridación ADN-ADN (Crow *et al.*, 1981), el análisis del polimorfismo de fragmentos de restricción de ADN (RFLP), el estudio del polimorfismo de enzimas multilocus (MLEE) (Selander *et al.*, 1986). Tanto la conservación del ARN ribosómico, por ser parte fundamental del ribosoma, como la existencia de variabilidad en alguno de sus dominios hacen de la secuencia de genes del ARN ribosómico (5S, 16S, y 23S) una herramienta muy útil para la genocaracterización de organismos y la inferencia de sus filogenias (Martínez-Romero, 1994). La secuenciación parcial y total de ADN ribosómico (ADNr) 16S, a partir de amplificadores obtenidos por PCR con cebadores específicos ha sido una de las técnicas más utilizadas para la genotipificación de rizobios (Young *et al.*, 1991; Yanagi y Yamasoto, 1993). La secuenciación parcial del ADNr 16S fue el criterio fundamental para proponer nuevas especies como es el caso de *Rhizobium etli* (Segovia *et al.*, 1993) y agrupar especies bajo un mismo género como es el caso de *Sinorhizobium fredii* y *Sinorhizobium meliloti* (De Lajudie *et al.*, 1994). La secuenciación total de ADNr 16S ha sido el principal criterio para separar las especies *S. medicae* de *S. meliloti* (Rome *et al.*, 1996).

Varias de las técnicas que aquí he revisado han sido utilizadas por nuestro laboratorio y por laboratorios con los que hemos colaborado, para caracterizar la especie y diversidad genética de los aislamientos noduladores de alfalfa que hemos obtenido de los suelos ácidos.

IV.2. Asignación de especie a los aislamientos TA y TMA presentados en el capítulo anterior.

Como se ha descrito en la introducción de esta tesis, la ácido tolerancia de los aislamientos de *S. meliloti* es poco marcada en relación a la de otros rizobios. Como consecuencia de ello, *S. meliloti* muestra una muy escasa capacidad de crecimiento a pHs inferiores a 5,6. (Glenn *et al.*, 1994; Tiwari *et al.*, 1992). Sin embargo se han descrito en la literatura un tipo diferente de rizobios con capacidad de nodular alfalfa y con una ácido tolerancia a la acidez que les permite crecer a pH 5,2 en medios de laboratorio (Eardly *et al.*, 1992). La cepa representativa de estos rizobios cuya especie aún no ha sido asignada, es el aislamiento *R. spp* Or191 (Eardly *et al.*, 1985) recuperado de un suelo de Oregon-USA. Eardly *et al.*, (1992) han encontrado las siguientes características diferenciales entre esta cepa y los aislamientos de *S. meliloti*:

TABLA IV.1. Características generales de la cepa *R. spp* Or191 respecto de *S. meliloti*.

Características Diferenciales	Tipo de rizobio	
	<i>R spp.Or191</i>	<i>S. meliloti</i>
Tolerancia a la acidez	Hasta pH 5,2 (Eardly <i>et al.</i> , 1992)	Hasta pH 5,6 (excepcional)
Crecimiento en TY a 37°C	-	+
Rango de hospedador	<i>M. sativa</i> - <i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Medicago</i> , <i>Melilotus</i> y <i>Trigonella</i>

(datos extraídos de Eardly *et al.*, 1985; 1992)

El fenotipo de tolerancia a la acidez de los aislamientos TA locales resultó coincidente con el de la cepa Or191. La presunción que los aislamientos locales TA podían estar genotípicamente relacionados pudo ser confirmada mediante el secuenciamiento de una porción del 16S ADNr (Young *et al.*, 1992) de las cepas locales TA realizada por miembros del laboratorio del Dr. N. Toro en colaboración con nuestro laboratorio (Del Papa *et al.*, 1999; Wegener *et al.*, 2001). Todos los aislamientos locales TA (LPU81, LPU83, LPU84, LPU119, LPU154, LPU158, LPU250, LPU266, LPU275, LPU284, LPU285, LPU286) mostraron 100% de identidad de secuencia 16s ADNr con la región homóloga de

la cepa Or191. Estos rizobios, además, no dan señal de hibridación con la secuencia de inserción IS Rm-2 (Wegener, *et al.* 2001), característica de la especie *S. meliloti*.

En relación a las cepas TMA LPU 30, LPU11 LPU63, LPU119, LPU18, LPU7; Segundo *et al.*, (1999) han determinado por secuenciación de la misma región 16S de DNAr que corresponden a la especie *S. meliloti*. Además, en estas cepas puede reconocerse la presencia de la secuencia de inserción ISRm 2 (Segundo *et al.*, 1999). El IS *fingerprint* de estas cepas no fue en ningún caso coincidente con el de las cepas inoculantes recomendadas por INTA empleadas en Argentina.

Sobre la base de estos resultados, en el presente capítulo se presenta un análisis comparativo de la biodiversidad fenotípica y genotípica presente en los rizobios TA de tipo Or191 y entre los aislamientos TMA de *S. meliloti* aislados de suelos ácidos de la región central de Argentina.

IV.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Con el propósito de investigar cuál es el grado de diversidad entre los aislamientos de cada uno de los grupos de rizobios definidos en el capítulo anterior, hemos realizado una caracterización fenotípica y genotípica de los mismos empleando ensayos y metodologías convencionales para el análisis de rizobios.

IV.2.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA.

IV.2.1.1. Capacidad de los aislamientos para crecer en medio TY a 37 °C y en medio LB a 28 °C.

Los estudios de tolerancia a la temperatura que se presentan aquí fueron realizados teniendo en cuenta los datos de tolerancia a la temperatura descrita en la literatura para la cepa *R.ssp.* Or191 (Eardly *et al.*, 1992). Esta bacteria no fue capaz de crecer a 37°C en medio TY (Eardly *et al.*, 1992). El mismo comportamiento mostraron todos los aislamientos TA (Tabla IV.2., columna 6). Los aislamientos TMA y SA fueron por su parte capaces de crecer en medio TY a 37°C. Ambos tipos de rizobios se pudieron diferenciar muy claramente en base a su sensibilidad a la temperatura. Otra diferencia que hemos observado entre los dos grupos de rizobios es que mientras los aislamientos tipo Or191 no son capaces de crecer en medio LB a 28°C, los aislamientos locales de *S. meliloti*, si lo hacen (Tabla IV.2., columna 5).

IV.2.1.2. Producción de melanina.

La capacidad de producir melanina es una característica que muchas veces permite diferenciar cepas de *S. meliloti*. Para evaluar esta característica en nuestras cepas TA y TMA utilizamos la técnica descrita por Cubo *et al.* (1988). Las placas con el medio de crecimiento con tirosina y Cu^{++} (Mat. y Mét. sección II.6.) se inocularon con los distintos rizobios y se incubaron durante 7 días a temperatura ambiente. Los aislamientos considerados como productores de melanina fueron aquellos que producían un pigmento marrón difusible (ver ejemplo en la Figura IV.1.). El análisis de esta característica en los aislamientos TA y TMA de la colección se presenta en la columna 7 de la Tabla IV.2. Se observa una gran homogeneidad dentro del grupo de los aislamientos TA, donde todos ellos resultaron incapaces de



Figura IV.1. Producción de melanina por aislamientos locales TMA de *S. meliloti*.

producir melanina en las condiciones de ensayo utilizadas. Los aislamientos de *S. meliloti* TMA presentaron un comportamiento heterogéneo siendo algunos de ellos capaces de producir melanina. En la Figura IV.1. se muestra el aspecto que presentaron los aislamientos que produjeron el pigmento. La capacidad de producir melanina que puede estar codificada por plásmidos, no ha podido relacionarse hasta el momento con ninguna propiedad adaptativa particular de los rizobios (Cubo, *et al* 1988). Ha sido, sin embargo, útil para la diferenciación de cepas como en nuestro caso con los rizobios MAT (productores y no productores).

IV.2.1.3. Análisis de perfiles de lipopolisacáridos (LPS) de membrana externa de los aislamientos TA en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE).

Los LPS constituyen un componente ubicuo de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Dada la diversidad estructural que este polisacárido presenta entre bacterias de diferentes especies y aún entre cepas de una misma especie, el análisis electroforético en SDS-PAGE de LPSs ha sido muy utilizado para la caracterización y quimio-tipificación de cepas bacterianas. (Prieto *et al.*, 2000).

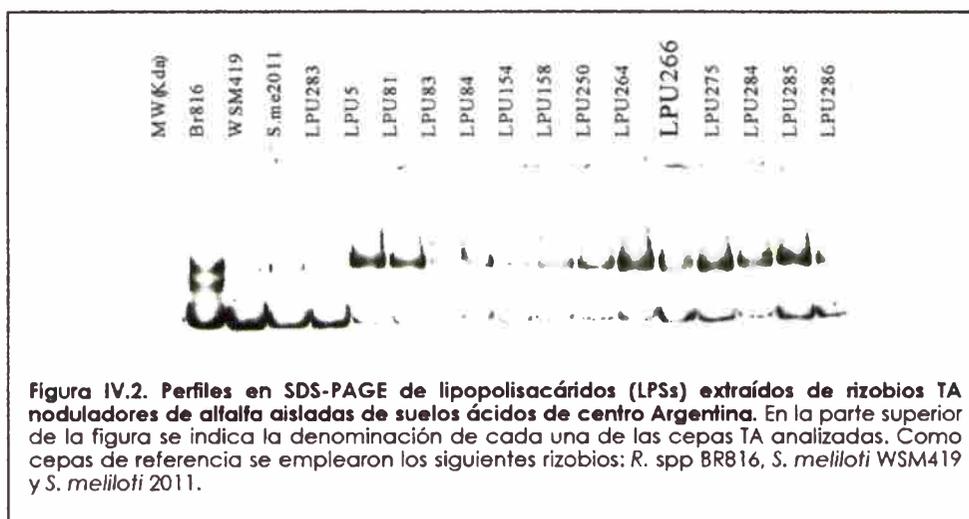


Figura IV.2. Perfiles en SDS-PAGE de lipopolisacáridos (LPSs) extraídos de rizobios TA noduladores de alfalfa aisladas de suelos ácidos de centro Argentina. En la parte superior de la figura se indica la denominación de cada una de las cepas TA analizadas. Como cepas de referencia se emplearon los siguientes rizobios: *R. spp* BR816, *S. meliloti* WSM419 y *S. meliloti* 2011.

En la Figura IV.2. se muestran los perfiles correspondientes a un SDS-PAGE teñido con plata de preparaciones de LPS obtenidas a partir de las cepas TA. Las muestras de LPS fueron preparadas por extracción de las bacterias con EDTA-trietilamina, y luego purificadas por afinidad con polimixina B unida a un soporte sólido según se detalla en Materiales y Métodos sección II.7. Las bandas de mayor movilidad corresponden a aquellas especies de LPS que sólo poseen lípido A-core (R-LPS, *rough*-LPS). Las bandas de menor movilidad corresponden a las especies de LPS que poseen además una cadena de antígeno O unida al lípido A-core (S-LPS, *smooth*-LPS). Salvo en el caso de *S. meliloti* en que los LPSs son muy similares entre las distintas cepas, las formas de S-LPS son por lo general muy variadas aún entre rizobios de la misma especie presentando en muchos casos varias

bandas (patrones polimórficos). Las cepas TA presentaron todas un mismo patrón electroforético caracterizado por la presencia de una banda única de S-LPS, como también ocurre en *S. meliloti* (véanse por ejemplo los patrones de la cepa australiana *S. meliloti* WSM419 y de la cepa *S. meliloti* 2011). En forma análoga a lo que ocurrió al analizar la tolerancia a la temperatura y la producción de melanina, todas las cepas TA resultaron indistinguibles. Los resultados obtenidos, ponen de manifiesto en su conjunto una muy escasa diversidad entre todas las cepas TA que hemos aislado en los suelos locales.

IV.2.2. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA.

IV.2.2.1. Análisis de los megaplásmidos presentes en los aislamientos TA mediante geles tipo Eckhardt de lisis *in situ*.

Con el propósito de caracterizar los elementos extracromosomales presentes en cepas locales tolerantes a la acidez, investigamos el tipo y diversidad de plásmidos presentes en el conjunto de aislamientos TA usando la técnica de lisis *in situ* según se detalla en Materiales y Métodos (sección II.9.1.). La Figura IV.3. muestra los perfiles plasmídicos obtenidos y pone en evidencia la presencia de un patrón de bandas muy similar en la mayoría de los aislamientos TA excepto en el perfil correspondiente al aislamiento LPU266. La banda megaplasmídica de menor movilidad en los aislamientos TA fue siempre coincidente con la banda correspondiente a los megaplásmidos simbióticos de *S. meliloti*, pSym a y pSym

b que en las condiciones experimentales utilizadas fueron resueltos. Debe considerarse que cada banda del gel corresponde al menos a una especie plasmídica. Como en el caso anterior puede ocurrir que una única banda contenga a más de un plásmido de similar movilidad electroforética. El análisis de elementos extracromosomales mostró, en concordancia con los análisis fenotípicos, una marcada similitud entre los aislamientos TA locales entre si y con la cepa *R.spp* Or191. Resultados que aquí no se presentan mostraron un comportamiento similar para dos rizobios TA que fueron recuperados de suelos de

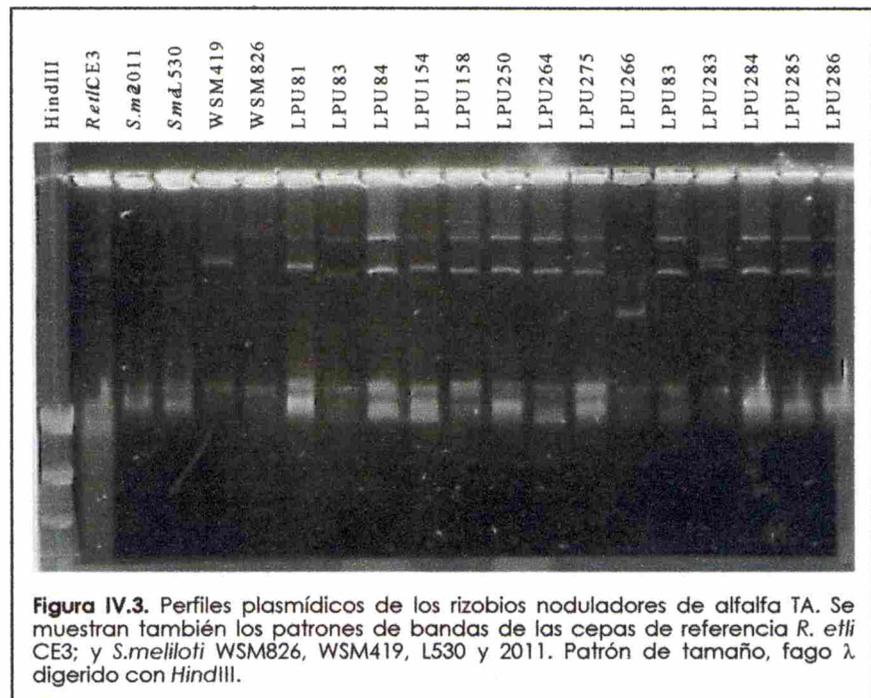


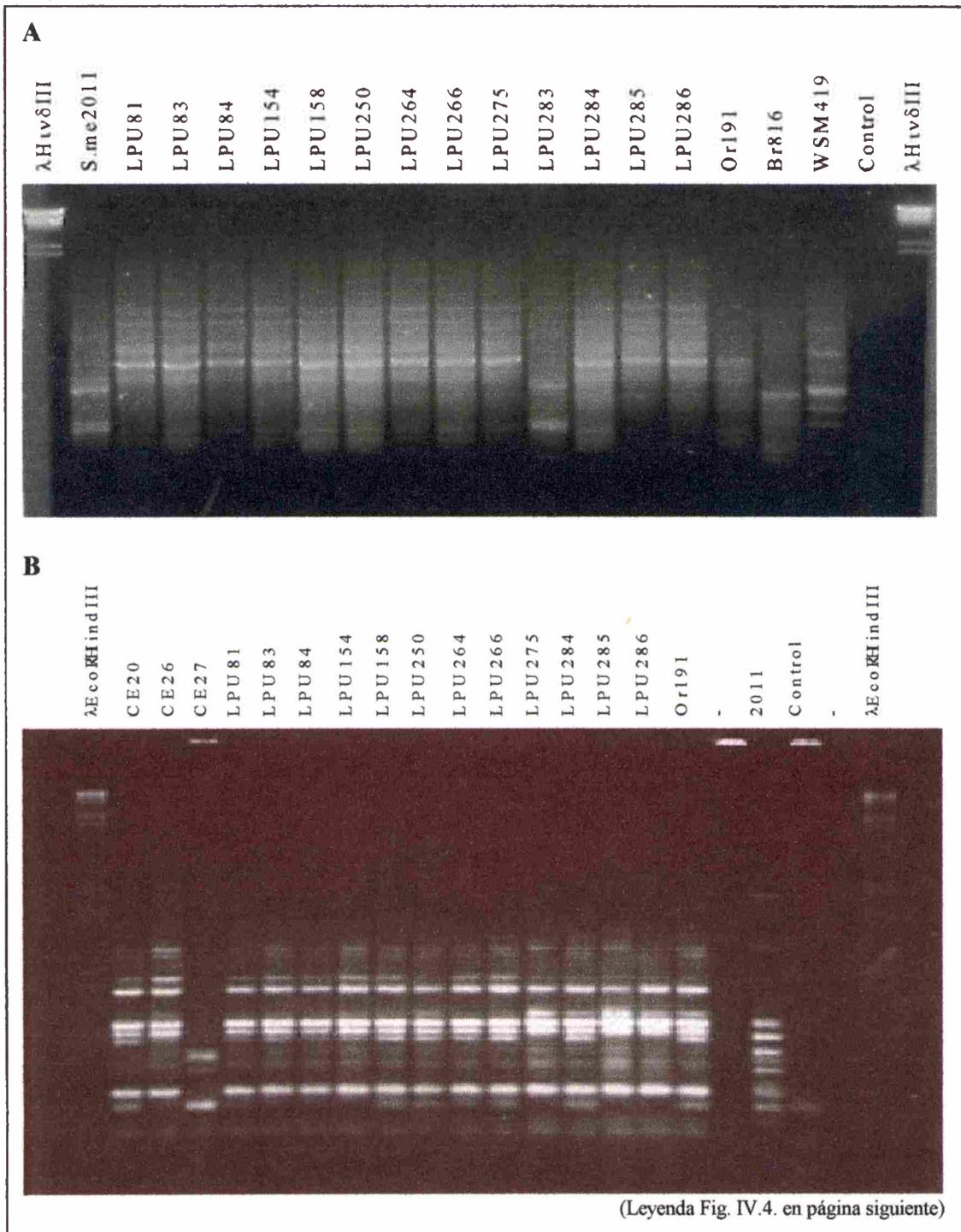
Figura IV.3. Perfiles plasmídicos de los rizobios noduladores de alfalfa TA. Se muestran también los patrones de bandas de las cepas de referencia *R. effi* CE3; y *S.meliloti* WSM826, WSM419, L530 y 2011. Patrón de tamaño, fago λ digerido con *HindIII*.

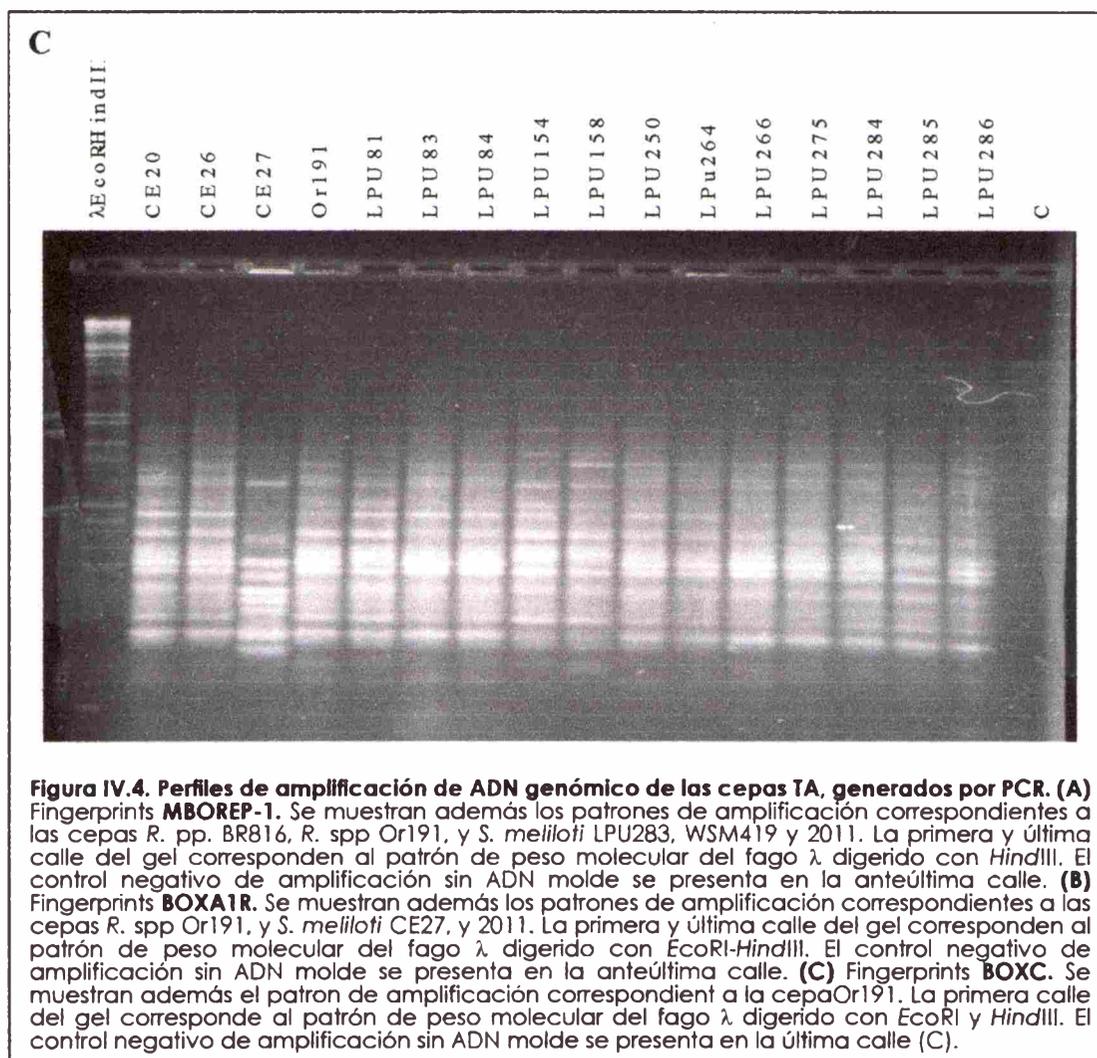
que en las condiciones experimentales utilizadas fueron resueltos. Debe considerarse que cada banda del gel corresponde al menos a una especie plasmídica. Como en el caso anterior puede ocurrir que una única banda contenga a más de un plásmido de similar movilidad electroforética. El análisis de elementos extracromosomales mostró, en concordancia con los análisis fenotípicos, una marcada similitud entre los aislamientos TA locales entre si y con la cepa *R.spp* Or191. Resultados que aquí no se presentan mostraron un comportamiento similar para dos rizobios TA que fueron recuperados de suelos de

Uruguay (aislamientos CE20 y CE26, laboratorio Dra. G. Martínez-Drets, Instituto Clemente Estable, Montevideo).

IV.2.2.2. Fingerprints de ADN total generados por métodos de PCR.

Para evaluar si la aparente similitud genética de los aislamientos TA a nivel plasmídico se extiende al resto del genoma, los mismos fueron analizadas mediante técnicas de generación de huellas digitales por PCR (PCR-fingerprint). En las figura IV.4. se muestran los patrones de amplificación de ADN representativos de los diferentes aislamientos empleando los cebadores MBOREP-1 (parte A), BOXA1R (parte B), y BOXC (parte C).





Cualquiera sea el cebador utilizado, los perfiles de los aislamientos TA así como el de la cepa *R. spp.* Or191 resultaron indistinguibles (sólo en algunos casos se observaron leves diferencias en la intensidad relativa de las bandas). Por el contrario, las cepas ensayadas de *S. meliloti* fueron todas diferentes entre si (con los tres cebadores). Estos resultados ponen en evidencia que el germoplasma de las cepas TA es mucho más homogéneo que el correspondiente al simbionte de alfalfa fijador de nitrógeno, *S. meliloti*. Esta idea ha sido confirmada por resultados más recientes en los que las características de diversidad de las cepas TA han sido analizadas en más detalle y en forma comparativa con distintos aislamientos de *S. meliloti* por distintos métodos moleculares (Wegener *et al.*, 2001).

En la Tabla IV.2. se presenta un resumen de las diferentes características fenotípicas que hemos evaluado en los aislamientos LPU. También se muestran 2 rizobios aislados en Uruguay(CE) y rizobios de referencia como *R. spp* Or191; *S. meliloti* 2011 y L530; *R. etli* CE3; y *R. tropici* CIAT899.

TABLA IV.2..Características fenotípicas y genotípicas de rizobios noduladores de alfalfa aislados de suelos ácidos de la región central de Argentina.

Cepa (a)	Lugar de aislamiento (b)	pH del suelo original	Capacidad de crecer en SGM a pH 5,0	Capacidad de crecer en LB a 28°C	Capacidad de crecer en Ty a 37 °C	M E L A N (d)	n i f H	n o d H	Perfil Mbo-REP (c)	Perfil de Plásmidos (c)
LPU 5	ND	ND	-	+	+	-	+	+	e	m
LPU 7	Castelar. Arg.	5.60	-	+	+	+	+	+	b	m
LPU 11	Castelar. Arg.	5.96	-	+	+	+	+	+	g	ND
LPU 18	Castelar. Arg.	5.60	-	-	-	-	+	+	b	n
LPU 30	Rafaela.. Arg.	6.04	-	+	+	-	+	+	c	o
LPU 63	Castelar Arg.	5.89	-	+	+	-	+	+	c	q
LPU 283	Santa Fe. Arg	5.68	-	+	+	+	+	+	b	o
LPU 119	Arrecifes. Arg	6.64	-	+	+	+	+	+	b	m
CE 47	Dpto.de Soriano. Uru.	5.72	-	+	+	-	+	+	c	ND
LPU 81	Castelar. Arg.	6.08	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 83	Castelar. Arg.	6.08	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 84	Castelar Arg.	6.08	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 154	Arrecifes.Ar g.	6.20	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 158	Arrecifes.Ar g.	6.20	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 250	Arg.	5.49	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 264	Arg	5.52	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 266	Arg	5.52	+	-	-	-	+	+	a	r
LPU 275	Arg.	5.92	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 284	Arg.	5.55	+	-	-	-	+	+	a	m
LPU 285	Arg.	5.55	+	-	-	+	+	+	a	m
LPU 286	Arg.	5.55	+	-	-	-	+	+	a	m

Cepa (a)	Lugar de aislamiento (b)	pH del suelo original	Capacidad de crecer en SGM a pH 5,0	Capacidad de crecer en LB a 28°C	Capacidad de crecer en Ty a 37 °C	MELAN (d)	nifH	nifD	Perfil Mbo-REP (c)	Perfil de Plásmidos (c)
CE 20	Dpto. De Colonia. Uru	5.96	+	-	-	-	+	+	a	m
CE 26	Dpto de Colonia. Uru	5.95	+	-	-	-	+	+	a	m
R. spp. OR 191	Early, B., USA	NA	+	-	-	ND	+	+	a	m
S. <i>meliloti</i> 2011	Dénarié, J., Francia	ND	-	+	+	+	+	+	b	q
S. <i>meliloti</i> L530	Dénarié, J., Francia	NA	-	+	+	+	+	+	ND	ND
R. <i>etli</i> CE3	Martínez, E. México	NA	+	ND	ND	ND	+	-	e	r
R. <i>tropici</i> CIAT 899 (tipo IIB)	CIAT, Colombia	NA	+	ND	ND	ND	+	-	f	s

a- LPU: Universidad de La Plata, CE: Clemente Estable, Uruguay

b- La ubicación geográfica de cada localidad es mostrada en la Figura III.1. del Capítulo precedente.

Arg: Argentina, Uru: Uruguay.

c- Letras diferentes en la misma columna corresponden a distintos perfiles de plásmidos/*fingerprinting* en los geles de agarosa.

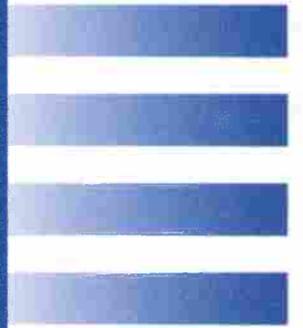
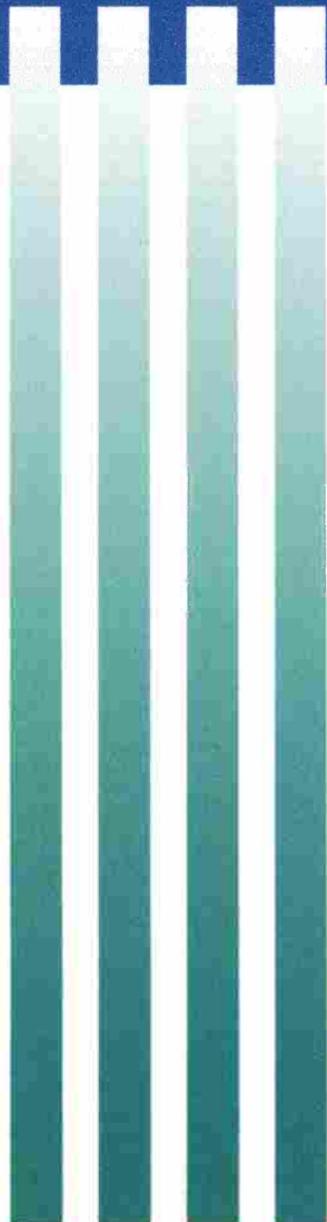
d- MELAN: Producción de melanina

Los resultados han mostrado características fenotípicas y genotípicas prácticamente indistinguibles para los aislamientos TA locales y de Uruguay y para la cepa *R. spp.* Or191 aislada en Oregon-USA en 1984. En general, es muy común encontrar variaciones genéticas entre rizobios de una misma especie cuando se emplean los métodos que hemos presentado en las secciones precedentes. En el caso particular de *S. meliloti*, por ejemplo, es muy frecuente que existan diferencias genotípicas aún entre aislamientos recuperados de un mismo suelo (Kosier *et al.*, 1993; Segundo *et al.*, 1999; resultados de nuestro laboratorio). En este marco, resultan difícil de explicar las escasas diferencias que hemos observado entre los rizobios TA. Puede especularse por cierto que el bajo nivel de

diversidad encontrado podría derivar de la acción de factores ecológicos específicos y de la existencia nichos especializados (Martinez Romero y Caballero-Mellado, 1996). Grupos con pequeña variabilidad genética suelen ocupar habitats específicos que favorecen la selección de unos pocos organismos adaptados a condiciones particulares (Hildebrand et al., 1982). Si ese fuera el caso de los aislamientos TA, desconocemos hasta el momento cuál es el factor que ha limitado la escasa deriva genética de estos rizobios. Es posible que el bajo pH sea ciertamente un factor de selección positivo para estas cepas que tienen un muy buen crecimiento en condiciones de acidez. Para la mayoría de las cepas de *S. meliloti* y de *S. medicae* un pH de 6,0 en el suelo es suficiente para restringir la nodulación en suelo (Rice, 1977) y el crecimiento en condiciones de laboratorio. Especular que la presencia y la escasa diversidad de las bacterias TA han sido sólo consecuencia de su ácido tolerancia, limita sin embargo el análisis al desenvolvimiento de estos rizobios en su vida libre no simbiótica. Y por cierto un análisis más riguroso debe considerar también al nicho simbiótico.

CAPÍTULO V

Búsqueda y Caracterización
de genes *nodH* en la cepa
TA *R.spp* LPU83



V.1. INTRODUCCIÓN.

Una de las características más distintivas de las interacciones simbióticas de alfalfa con rizobios es la marcada especificidad de la planta para asociarse con *Sinorhizobium meliloti*. A pesar de esta característica que es muy bien conocida, los resultados que hemos presentado hasta este momento han mostrado que en los suelos ácidos de centro Argentina existen al menos dos poblaciones de rizobios noduladores de alfalfa bien diferenciadas: una población mayoritaria constituida por cepas de *S. meliloti*, y otra minoritaria representada por cepas mucho más ácido tolerantes y genéticamente relacionados con la cepa *R. spp. Or191*. Los primeros aislamientos de este tipo de cepas ya habían sido realizados con anterioridad en un suelo ácido de Oregon-USA (Eardly *et al.*, 1985). En razón de la mencionada selectividad de alfalfa por *S. meliloti*, se plantea entonces la cuestión sobre cuáles son los mecanismos y señales que emplean estos rizobios para su asociación con esta leguminosa. El avance sobre estos puntos será importante para conocer si existen otras señales diferentes a las de *S. meliloti* que permiten a los rizobios infectar alfalfa. Asimismo, se espera contar con mejores herramientas de análisis para evaluar la evolución posible de ambas poblaciones de rizobios en suelos de cultivo.

V.1.1. Relevancia del grupo sulfato para la actividad biológica de los factores de nodulación (FN) activos en alfalfa.

Dénarié y colaboradores reportaron en 1991 en un trabajo histórico para la fisiología de las asociaciones rizobio-leguminosa, que el resultado de la inducción de genes *nod* por la acción coordinada de flavonoides provenientes de la planta huésped es la síntesis por parte de la bacteria de señales lipo-oligosacáridicas sustituidas denominadas factores de nodulación (FN, *Nod factors*) que son liberado al medio extracelular (Dénarié *et al.*, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993). Dichos FN son señales indispensables para la infección radicular y el desarrollo de los nódulos en la raíz de la leguminosa. Cuando los FN entran en contacto con la planta hospedante inducen una serie de respuestas morfológicas que se acompañan con inducción de nuevos genes cuyos productos de expresión son conocidos como nodulinas (proteínas expresadas mayoritariamente en el nódulo). Entre las respuestas fisiológicas que acompañan a la morfogénesis del nódulo se han observado, por ejemplo, alteraciones en el desarrollo de la raíz (van Brussel *et al.*, 1986; Zaat *et al.*, 1987) e inducción de la división de células corticales en vicia (Spaink *et al.*, 1991); y deformación (Faucher *et al.*, 1988) y depolarización (Ehrhardt *et al.*, 1992) de pelos radiculares y activación del ciclo celular y de la ruta de biosíntesis de isoflavonoides en alfalfa (Savouré *et al.*, 1994).

Los FN producidos por *S. meliloti* (Nod-Sme) consisten en un tetrasacárido de β -1,4-N-acetil-D-glucosamina con un grupo sulfato como sustituyente en el C-6 del azúcar del extremo reductor. El grupo amino del extremo no reductor por su parte está sustituido con un resto de ácido graso no saturado de 16 carbonos de extensión (Lerogue *et al.*, 1990). Además, *S. meliloti* también sintetiza también variantes de FN de cuatro o cinco unidades

de N-acetil-D-glucosamina aciladas en el extremo no reductor con ácidos grasos hidroxilados.

La estructura básica de los FN es sintetizada por los productos de los genes "comunes" de nodulación *nodABC* (Fisher y Long, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993). El producto del gen *nodC* se ha visto que muestra homología con quitina-sintasas, y cataliza la oligomerización inicial de los monómeros β -1,4 de N-acetil-D-glucosamina. El producto del gen *nodB* deacetila a la N-acetil-D-glucosamina del extremo no reductor (John *et al.*, 1993), lo cual parece ser un requerimiento previo a la transferencia del ácido graso a esa posición, reacción que sería a su vez catalizada por la proteína NodA (John *et al.*, 1993). En combinación con la estructura básica de N-acetil-D-glucosamina de los FN, la especificidad de la actividad biológica de esta señal está fuertemente determinada por el tipo de sustituyentes sacarídicos y por las decoraciones no sacarídicas que se agregan a la estructura base de tipo quitina. Así, el tipo de decoración que caracteriza a las diferentes especies de rizobios depende de la actividad de otro grupo de genes *nod* denominados "específicos". En *S. meliloti*, una sustitución esencial para que los FN sean activos sobre raíces de alfalfa es la sulfatación del C6 del extremo reductor mencionada precedentemente (Lerouge *et al.*, 1990). A ese respecto, la sulfatación de los FN sintetizados por *S. meliloti* es dependiente de las proteínas NodP-NodQ (homólogas a ATP-sulfurilasa y APS-quinasa, respectivamente, enzimas estas que generan sulfatos activados) y de la proteína NodH (con actividad sulfotransferasa) (Schedock y Long, 1992, Fisher y Long, 1992; Dénarié y Cullimore, 1993). Se ha observado así que mutantes de *S. meliloti* alterados en el gen *nodH* producían FN no sulfatados, eran no infectivos en alfalfa, pero resultan activos en *Vicia sativa* (Roche *et al.*, 1991). Es interesante que los FN de *R. leguminosarum* *bv. viceae*, simbionte natural de *V. sativa*, no están sulfatados. Los FN sintetizados por *R. leguminosarum* *bv.viceae* son semejante a los de *S. meliloti* en su estructura básica, excepto que el ácido graso insaturado es de 18 carbonos, llevan un acetilo en el C6 del extremo no reductor, y como se ha mencionado no poseen el sustituyente sulfato (Spaink *et al.*, 1991).

Nodulación de alfalfa por cepas tipo *R. spp.* tipo Or191.

Una de las características interesantes de las cepas *R. spp.* tipo Or191 es su amplio rango de hospedadores incluyendo la poco común capacidad para nodular alfalfa. Junto a *S. meliloti*, estos rizobios son los únicos descritos hasta el momento que inducen nódulos en esta leguminosa. Sin embargo, aunque la bioquímica y biología molecular de los FN de *S. meliloti* ha sido bastante estudiada, nada se conoce sobre la naturaleza de las moléculas señal de estos rizobios. En este capítulo presentaremos un conjunto de resultados que ponen en evidencia algunos aspectos comunes empleados por los rizobios TA de tipo Or191 y *S. meliloti*, el simbionte mayoritariamente recuperado de nódulos de alfalfa.

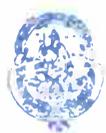
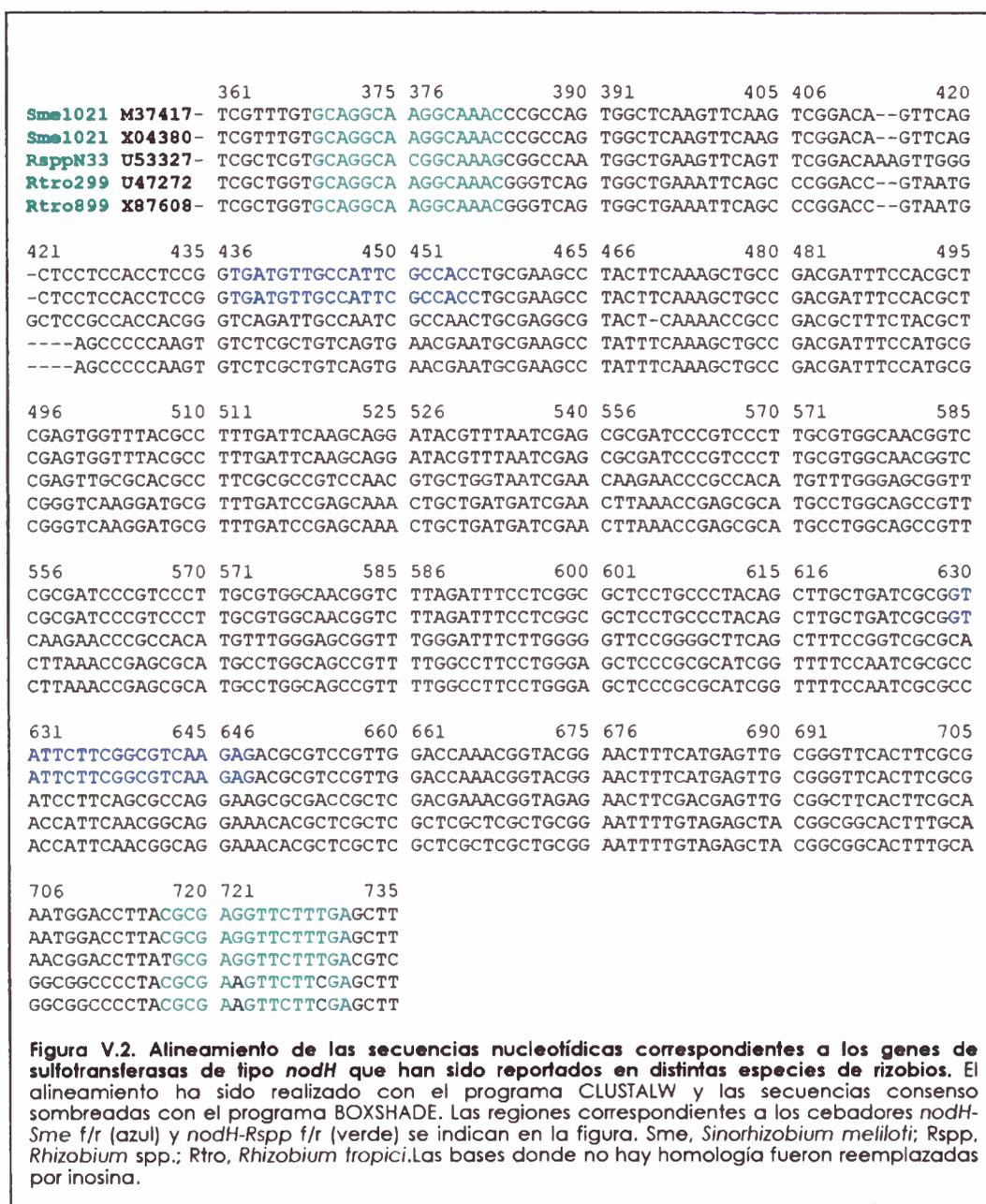
V.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

V.2.1. Amplificación por PCR de secuencias homólogas a genes de tipo *nodH*.

Existen diferentes rizobios en los que se han detectado secuencias de ADN homólogas al gen *nodH* de *S. meliloti* y que codifican para sulfotransferasas (Hanin, *et al.* 1997; Cloutier *et al.*, 1996; Laeremans *et al.*, 1996). Teniendo en cuenta entonces las secuencias depositadas en Genbank bajo los números de acceso M37417, X04380, U53327, U47272, y X87608 correspondientes a los genes *nodH* de *S.melloti*1021, *S.melloti* AK631, *R.spp.*N33, *R.tropici* 299 y *R.tropici* CIAT899, respectivamente, se realizó el alineamiento que se muestra en la Figura V.1.. Como resultado de dicho alineamiento se identificaron regiones de ADN con secuencias consenso a partir de las cuales se sintetizaron los pares de cebadores *nodH-Sme f/r* y *nodH-Rspp f/r* (ver Figura V.2.). El primer par de cebadores (en azul) corresponde a secuencias consenso presentes en los genes *nodH* de las cepas *S. meliloti* AK631 y 1021. El segundo par de cebadores (en rojo) se corresponde con regiones conservadas en todas las secuencias *nodH* alineadas. En la Figura V.2. se muestra la electroforesis en gel de agarosa en la que se analizaron los productos de PCR obtenidos al emplear los cebadores *nodH-Sme f/r* y diferentes ADN molde de *S. meliloti* y de cepas TA *R.spp.* noduladoras de alfalfa. Los resultados muestran un producto de amplificación único cuando se usa como molde ya sea ADN total de la cepa *S.*



meliloti 2011 (calle 2) como de las cepas *R. spp.* Or191 y LPU83 (calles 3 y 4). Este resultado sugirió entonces que los rizobios del tipo *R. spp.* Or191, noduladores de alfalfa, poseían posiblemente algún gen relacionado en su secuencia al gen *nodH* de *S. meliloti*. La amplificación por PCR de ADN extraído de distintas bandas de geles de lisis *in situ* permitió además determinar que las secuencias relacionadas a *nodH* presentes en las cepas *R. spp.* Or191 y LPU83 estarían localizadas en los megaplásmidos de mayor tamaño presentes en dichas cepas (Figura V.2., amplicones de las calles 6 a 8). En el plásmido de mayor tamaño presente en las cepas tipo Or191 hemos podido establecer además la presencia de secuencias correspondientes al gen estructural de la nitrogenasa *nifH* (resultados no presentados). Ambas observaciones sugieren que éste es un megaplásmido simbiótico en las cepas TA.



En un segundo grupo de ensayos hemos realizado una PCR en la que utilizamos el par de cebadores *nodH-Rspp f/r* diseñados en base a todas las secuencias *nodH* disponibles. En ese ensayo obtuvimos un claro producto de amplificación tanto a partir de ADN molde de las cepas control *S. meliloti* 2011 y *S. meliloti* LPU63, como en la cepa TA R. spp. LPU83. (ver calles 1-3 del gel de la Figura V.4. de la sección siguiente). La obtención de productos de amplificación con el nuevo par de cebadores refuerza en forma independiente la evidencia de que en las cepas TA de tipo-Or191 existen secuencias de ADN homólogas a las de los genes *nodH* descritos en otros rizobios.

V.2.2. Ensayos de hibridación entre sondas generadas por PCR a partir de la cepa LPU83, y ADN genómico y productos de PCR homólogos y heterólogos.

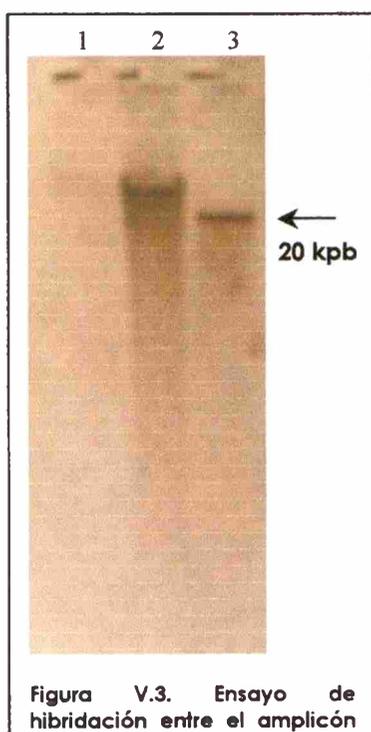


Figura V.3. Ensayo de hibridación entre el amplicón generado con los cebadores *nodH-Rspp f/r* a partir de ADN molde de la cepa TA LPU83, y ADN total de la misma cepa LPU83 y de la cepa *S. meliloti* 2011 digerido con la enzima *EcoRI*. Calle 1: ADN del fago lambda digerido con las enzimas *EcoRI* y *HindIII* (patrón de peso molecular, hibridación negativa), calle 2: ADN genómico de la cepa *S. meliloti* 2011 digerido con *EcoRI*, calle 3: ADN genómico de la cepa TA R. spp. LPU83 digerido con *EcoRI*.

Con el propósito de investigar el número de copias del gen *nodH* en las cepas tipo Or191 se realizó un ensayo de hibridación entre una sonda generada con los cebadores *nodH-Rspp f/r* a partir de ADN molde de la cepa TA LPU83 (Mat. y Mét., sección II.9.2.3), y ADN total de la misma cepa LPU83 y de la cepa *S. meliloti* 2011 digeridos con la enzima *EcoRI* (Figura V.3.). El resultado positivo con una señal única (1 banda, calle 3) sugiere que las secuencias *nodH* en la cepa LPU83 están en copia única como ocurre en *S. meliloti* 2011 (calle 2). Esta última hibridación positiva entre la sonda de LPU83 y el ADN de *S. meliloti* 2011 pone además en evidencia una elevada similitud de secuencia entre los genes *nodH* de ambos organismos dadas las condiciones estrictas de hibridación empleadas en el ensayo (Mat. y Mét., sección II.19). Esta interpretación es correcta sobre la base de asumir que el producto de PCR de LPU83 empleado como sonda corresponde en efecto a una región de *nodH*. Para confirmar esta suposición investigamos si los amplicones generados con cada uno de los pares de cebadores a partir de las cepas tipo Or191, tienen homología de secuencia entre si, y con los amplicones de *S. meliloti* que sí sabemos corresponder a secuencias *nodH*. Así, los productos de amplificación generados con los cebadores *nodH-R.spp* fueron hibridados con una sonda generada con los cebadores *nodH-Sme*, y viceversa. En todos los casos la sonda fue amplificada a partir de ADN molde de la cepa TA R. spp. LPU83. Los resultados que se presentan en la Figura V.4. muestran hibridación positiva de las sondas de ADN de la cepa LPU83 con los productos de amplificación de *S. meliloti* demostrando que

en efecto, todos los amplicones contienen secuencias asociadas a genes de la familia *nodH*. Se observó, sin embargo, que el producto de amplificación generado con los cebadores *nodH-Sme f/r* es algo más pequeño en *S. meliloti* que en la cepa LPU83 (Figura V.4. A, calles 1 y 2 vs 3).

V.2.3. Estrategia para el clonado y caracterización del gen *nodH* presente en la cepa local TA R. spp. LPU83.

A partir de los resultados obtenidos y para avanzar en la caracterización del gen *nodH* presente en la cepa LPU83, delineamos una estrategia que permitió aislar un fragmento de ADN genómico *Sau3A* portador de dicho gen. Para ello, en una primera

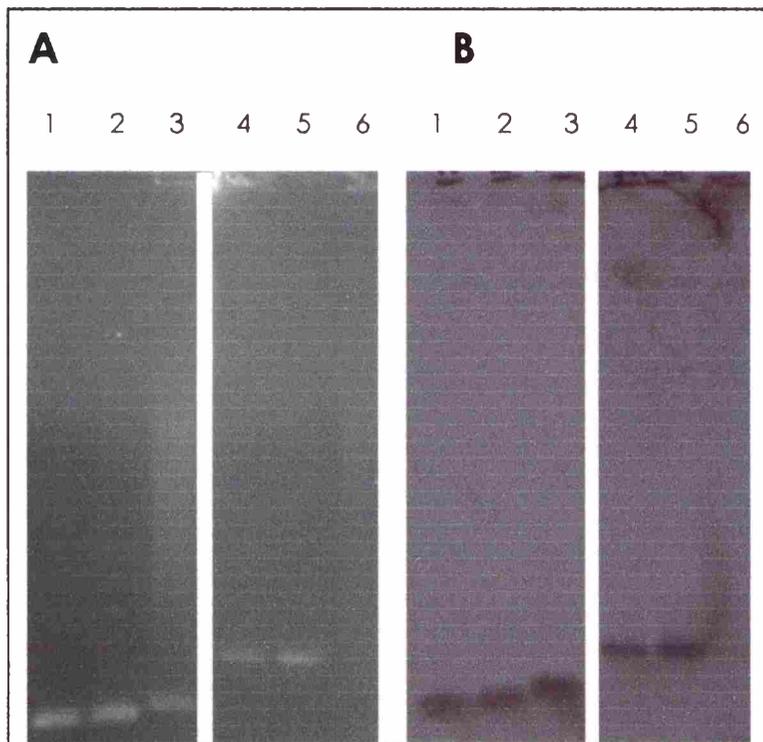


Figura V.4. Hibridación cruzada entre los amplicones *nodH* generados con los cebadores *nodH-Sme f/r* y *nodH-Rspp f/r* a partir de ADN de las cepas de *S. meliloti* y tipo Or191. Panel A: Gel de agarosa 1,5%. Panel B: Hibridación del material presente en el gel del Panel A empleando como sonda ya sea el amplicón generado con los cebadores *nodH-Rspp f/r* (calles 1-3) o el generado con los cebadores *nodH-Sme f/r* (calles 4-6), siempre a partir de ADN molde de la cepa LPU83. Calle 1: amplicón *nodH-Sme f/r* de la cepa *S. meliloti* 2011, Calle 2: amplicón *nodH-Sme f/r* de la cepa *S. meliloti* LPU63, Calle 3: amplicón *nodH-Sme f/r* de la cepa *R. spp* LPU83, Calle 4: amplicón *nodH-Rspp f/r* de la cepa *S. meliloti* 2011, Calle 5: amplicón *nodH-Sme f/r* de la cepa *S. meliloti* LPU63, Calle 6: amplicón *nodH-Sme f/r* de la cepa *R. spp* LPU83.

etapa se construyó una biblioteca genómica de la cepa LPU83 empleando el plásmido Hypercos1 como vector de clonado y el sistema de empaquetamiento *in vitro* del bacteriofago lambda, según se describe en la sección II.25. de Materiales y Métodos. Dicha estrategia permitió obtener más de 1200 clones iniciales, con insertos cuyos tamaños variaron entre 50 y 90 kb. Una biblioteca con estas características es esperable que sea estadísticamente representativa de un genoma con tamaño cercano a las 6 megabases como puede ser el de la cepa *R. spp.* LPU83. A partir de dicha biblioteca, en el laboratorio del Dr. Toro con el que he colaborado se pudieron identificar 5 cósmidos distintos que por hibridación resultaron portadores de secuencias

relacionadas al gen "común" de nodulación *nodD* que fue empleado como sonda. Dichos cósmidos fueron designados pRVD1, pRVD2, pRVD3, pRVD5, y pRVD7. Dado que una de las características de los genes de nodulación de rizobios es que se encuentran agrupados en una misma región del genoma (sea en plásmidos o cromosoma según la especie de

rizobio), analizamos si alguno de los cósmidos anteriores portadores de secuencias *nodD* contenían además secuencias del gen *nodH*. Empleando los ensayos de PCR descritos en la sección anterior obtuvimos una amplificación positiva y del tamaño esperado al emplear como molde el cósmido pRVD7 (resultado no presentado). Para confirmar este resultado, el producto de digestión *EcoRI* de dicho cósmido fue analizado en gel de agarosa e hibridado con una sonda específica para el gen *nodH* según se muestra en la Figura V.5..

V.2.4. Caracterización funcional del gen *nodH* de *R. spp.* LPU83: Evaluación de la complementación de un mutante heterólogo *nodH* de *Sinorhizobium meliloti*.

Complementación de un mutante *nodH* de *S. meliloti*. Dado que el aislamiento del gen *nodH* en la cepa *R. spp.* LPU83 lo hemos realizado sobre la base de ensayos de hibridación y PCR, para investigar si existe en efecto una relación funcional con el gen *nodH* de *S. meliloti*, hemos evaluado la capacidad del cósmido pRVD7 para complementar un mutante Tn5-*nodH* de la cepa *S. meliloti* AK631. Para ello se llevó a cabo una conjugación triparental entre el mutante *nodH* de *S. meliloti*, la cepa *E. coli* NM554 portadora del cósmido movilizable pRVD7, y la cepa DH5-alfa (pRK2013) que utilizamos como *helper* (ver conjugaciones triparentales en Materiales y Métodos sección II.8.2). A continuación, la mezcla de transconjugantes fue empleada "en masa" como inoculante en un ensayo de nodulación de alfalfa realizado en potes con vermiculita y medio Fahreaus. Como controles se crecieron plantas sin inocular, y plantas inoculadas sólo con el mutante *nodH*. Las macetas se mantuvieron bajo condiciones controladas de luz y temperatura (ver ensayos de nodulación, Mat. y Mét. sección II.20.), y a las tres semanas post-inoculación se relevaron las raíces para evaluar la presencia/ausencia de nódulos. En la Figura V.6. se muestran las macetas correspondientes a las plantas de cada uno de los tratamientos. Sólo se observó presencia de nódulos en las plantas que habían sido inoculadas con la mezcla de la conjugación triparental. El resultado sugirió que el mutante *nodH* había posiblemente incorporado y recombinado en su genoma el cósmido pRVD7, y a consecuencia de ello recuperado la capacidad de

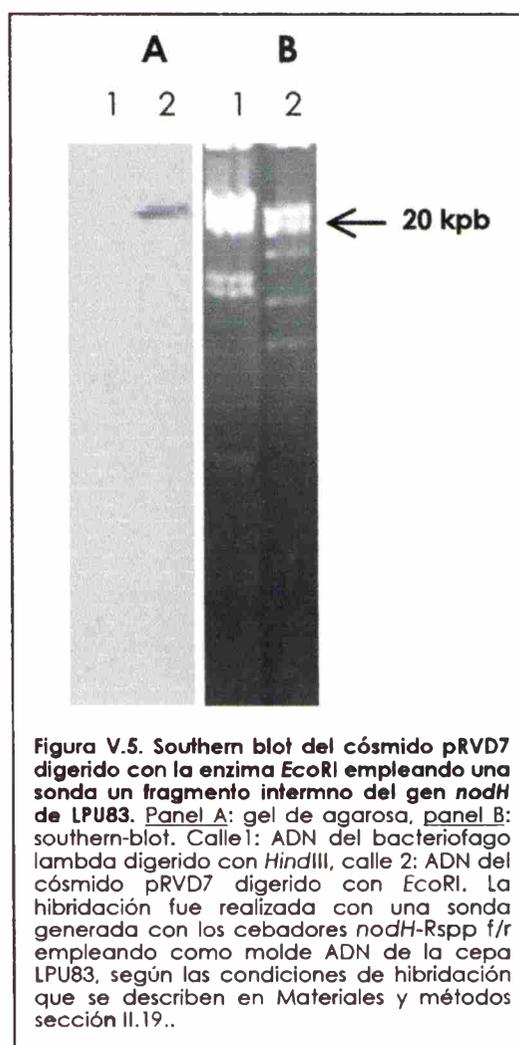


Figura V.5. Southern blot del cósmido pRVD7 digerido con la enzima *EcoRI* empleando una sonda un fragmento interno del gen *nodH* de LPU83. Panel A: gel de agarosa, panel B: southern-blot. Calle 1: ADN del bacteriofago lambda digerido con *HindIII*, calle 2: ADN del cósmido pRVD7 digerido con *EcoRI*. La hibridación fue realizada con una sonda generada con los cebadores *nodH*-Rsp *f/r* empleando como molde ADN de la cepa LPU83, según las condiciones de hibridación que se describen en Materiales y métodos sección II.19..

nodular alfalfa. Debe recordarse que tanto el *Tn5* presente en el mutante *nodH* como el Hypercos 1 empleado como vector poseen el gen *nptII* de resistencia a neomicina a través del cual puede producirse la recombinación homóloga e integración del vector en el genoma.

Análisis de las bacterias presentes en los nódulos. Para confirmar que en efecto los nódulos recuperados del experimento de inoculación en masa correspondían a infecciones del mutante *nodH* que había sido complementado, realizamos los siguientes ensayos confirmatorios:

- En primer lugar se extrajeron bacterias de los nódulos, y las mismas fueron analizadas para evaluar: a) si eran resistentes a neomicina, b) si poseían el marcador *bla* (beta lactamasa presente en el Hypercos 1), y c) si en un *fingerprint* de ADN se obtenían patrones coincidentes con el de la cepa receptora mutante *nodH*. Los dos primeros ensayos dieron resultado positivo (resultados no mostrados), y en la Figura V.7. se muestran los *fingerprints* ERIC-2 (ver Materiales y Métodos, sección II.9.2.1.) de varios clones extraídos de nódulos y que resultaron coincidentes con el correspondiente al mutante *nodH*.

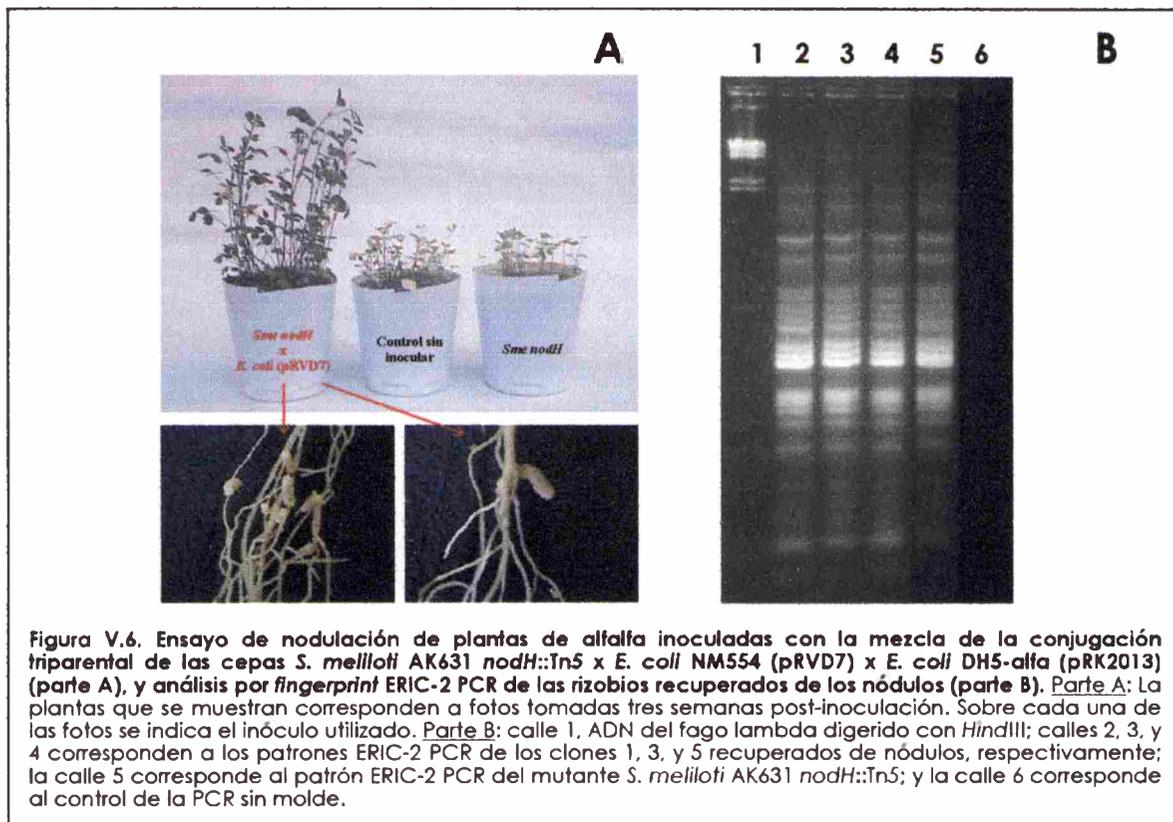
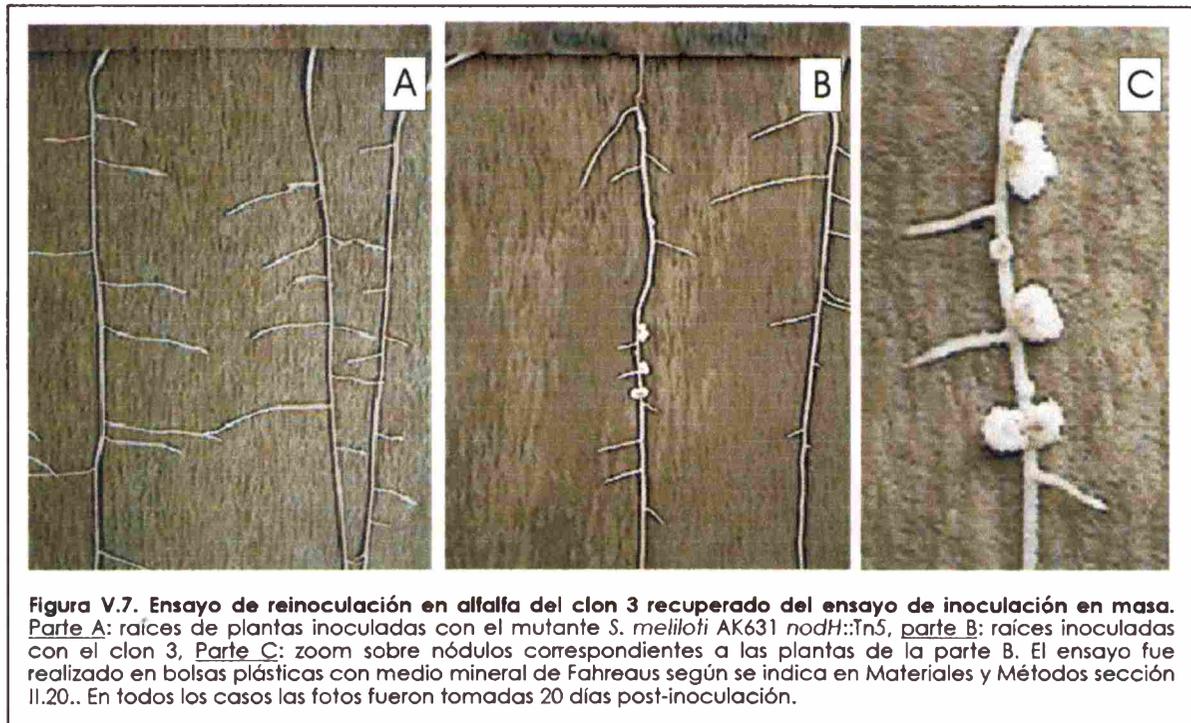


Figura V.6. Ensayo de nodulación de plantas de alfalfa inoculadas con la mezcla de la conjugación triparental de las cepas *S. meliloti* AK631 *nodH::Tn5* x *E. coli* NM554 (pRVD7) x *E. coli* DH5-*alpha* (pRK2013) (parte A), y análisis por *fingerprint* ERIC-2 PCR de los rizobios recuperados de los nódulos (parte B). Parte A: La plantas que se muestran corresponden a fotos tomadas tres semanas post-inoculación. Sobre cada una de las fotos se indica el inóculo utilizado. Parte B: calle 1, ADN del fago lambda digerido con *HindIII*; calles 2, 3, y 4 corresponden a los patrones ERIC-2 PCR de los clones 1, 3, y 5 recuperados de nódulos, respectivamente; la calle 5 corresponde al patrón ERIC-2 PCR del mutante *S. meliloti* AK631 *nodH::Tn5*; y la calle 6 corresponde al control de la PCR sin molde.

- En segundo lugar uno de los posibles complementados fue reinoculado en plantas de alfalfa para verificar el fenotipo Nod+. En la Figura V.7. se muestran las raíces

correspondientes a las plantas inoculadas con el mutante *nodH*, y las de plantas inoculadas con la cepa complementada (clón 3).

Todas estas evidencias indican que en efecto el mutante *nodH* de *S. meliloti* ha incorporado el cósmido pRVD7 portador del gen *nodH* de una cepa LPU83, y ha sido complementado en su capacidad de nodulación.



V.2.5. Secuencia parcial de un fragmento interno del gen *nodH* de la cepa LPU83. Relaciones filogenéticas con los genes homólogos de otros rizobios.

Finalmente hemos realizado el secuenciamiento de una parte del gen *nodH* de la cepa LPU83 de modo de confirmar la identidad del mismo y confirmar los ensayos previos de hibridación y complementación de mutantes. Hemos obtenido así una secuencia de 244pb, correspondiente a las bases 255-527 (273 pb) de la secuencia *nodH* de *S. meliloti* 1021 (Genbank M37417). La secuencia nucleotídica parcial de *nodH* de la cepa LPU83 que hemos obtenido la hemos comparado frente a bancos de datos empleando el algoritmo blastx de GenBank (traducción automática y comparación con banco de proteínas). Se obtuvieron similitudes de secuencia a nivel de proteína que variaron entre 71%-83% con fragmentos de los productos NodH de los genes que se han listado en la Figura V.2. de este capítulo. En la Figura V.8. se muestra el alineamiento de aminoácidos del fragmento NodH correspondiente a la cepa LPU83 respecto de sus homólogos en los otros rizobios. Se observa claramente que la región de aminoácidos que hemos analizado tiene una secuencia con características intermedias entre las correspondientes a cepas de *S. meliloti*, y las de *R. tropici*. Un análisis más detallado de las relaciones filogenéticas a nivel de ADN y aminoácidos se presenta en la Figura V.9. Si bien en el análisis de distancias genéticas a

1021	1	LLERAF	FLFY	PHSD	KV	THVGCK	INEPQ	QER	S	FFAEL	TAMP	PGLK	VILVI	RR	TLES	SLR
Rm41	1	LLERAC	WCY	PHSD	K	THVGCK	INEPQ	QER	S	FFAEL	TAMP	PGLK	VILVI	RR	TLES	SLR
LPU83	1	LLERAF	FMRY	PLRSG	KV	MHVGCK	INEPQ	QER	G	FAELAA	P	LKI	IILVI	K	TLES	SLR
299	1	LLEL	YMY	YPP- AK	KV	THVGCK	INEPQ	YER	G	DELAR	QGLK	VILLT	-	TLES	SLR	
899	1	LLEL	YMY	YPP- AK	KV	THVGCK	INEPQ	YER	G	DELAR	QGLK	VILLT	-	TLES	SLR	
N33	1	LLEL	YVRC	TWSD	T	THVGCK	VINEPQ	HDH	G	FAELAR	P	LKV	VV	RR	TLES	SLR

1021	61	EFVQAR	QTR	WIK	K	KSDSS	-A
Rm41	61	EFVQAR	QTR	WIK	K	KSDSS	-A
LPU83	61	EFVQAR	QTR	WIK	K	DSVNA	-A
299	59	ELVQAR	QTG	WIK	K	SPDRN	--
899	59	ELVQAR	QTG	WIK	K	SPDRN	--
N33	61	ELVQAR	SG	WIK	K	SSDKVGA	

Figura V.8. Alineamiento de la secuencia parcial de aminoácidos de la proteína NodH de la cepa LPU83 con secuencias homólogas de otros rizobios. El alineamiento fue realizado con el programa Clustal 1.8 y editado con Boxshade. La relación filogenética de las mismas secuencias se presenta en la Figura V.9. siguiente.

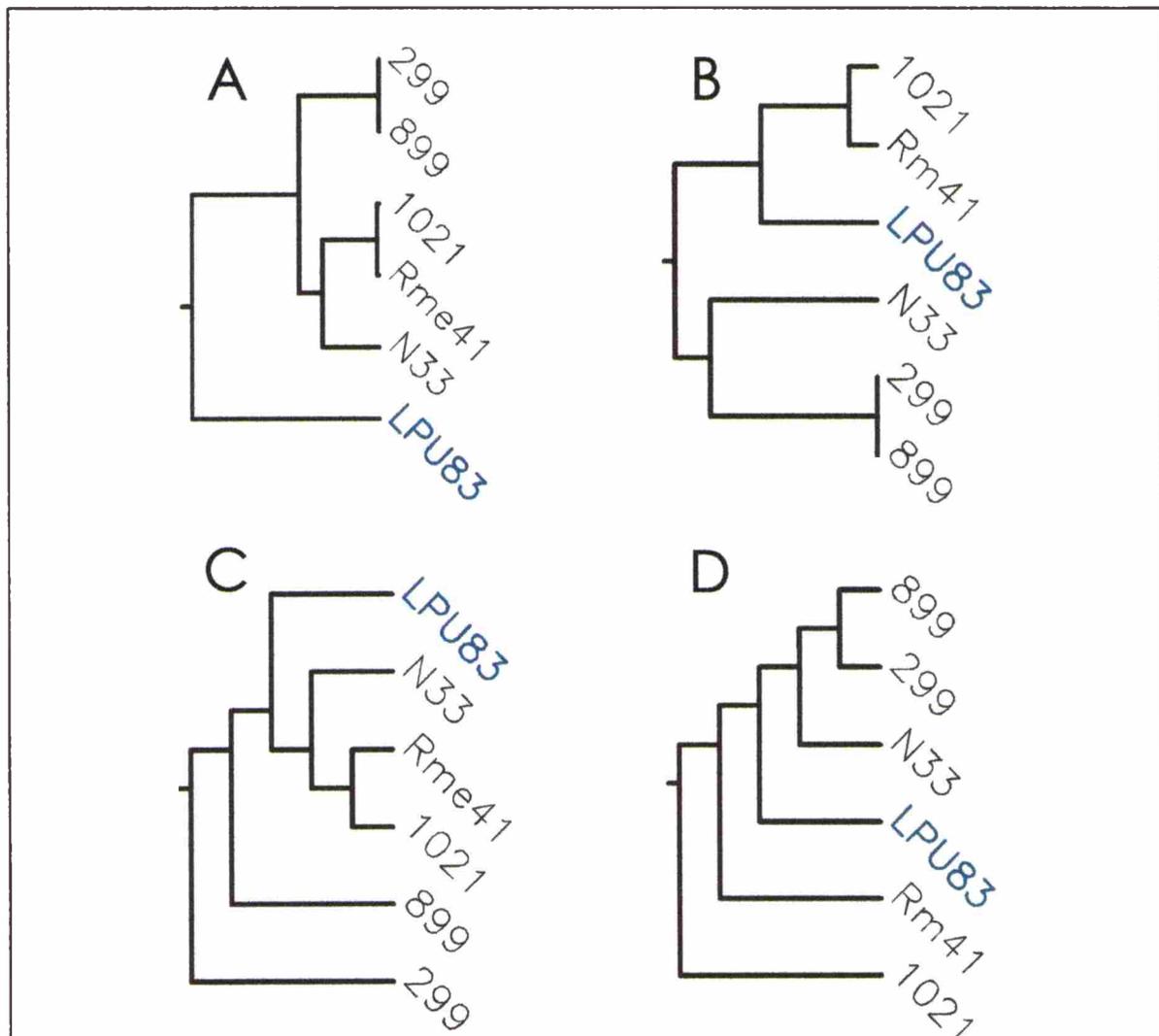


Figura V.9. Relaciones filigenéticas obtenidas a partir del análisis de un fragmento interno del gen *nodH* y de su producto de traducción. A: fenograma generado a partir de las distancias genéticas entre las secuencias de ADN correspondientes a un fragmento de 244 pares de bases de los genes *nodH* de cada una de los rizobios que se indican en la figura (nucleótidos 255-527 en la secuencia *nodH* de *S. meliloti* 1021, ver Figura V.2.). B: fenograma generado a partir de las distancias genéticas entre las secuencias de aminoácidos correspondientes al producto traducido del ADN analizado en la parte A. C: fenograma correspondiente a las relaciones filogenéticas deducidas por métodos de máxima parsimonia empleando las secuencias de ADN descritas en la parte A. D: fenograma correspondiente a las relaciones filogenéticas deducidas por métodos de máxima parsimonia empleando las mismas secuencias de aminoácidos de la parte B. Las secuencias fueron alineadas empleando el Clustal W 1.8. A partir de los alineamientos, las distancias genéticas fueron calculadas con el algoritmo UPGMA y los programas DNAdist y ProtDist según se trató de secuencias nucleotídicas o de aminoácidos, respectivamente. La filogenia deducida por métodos de parsimonia fue generada con los programa DNAPars y Protpars. Los gráficos de los fenogramas fueron generados empleando el programa Drawgram. Todo el software de para análisis de filogenia molecular es parte del paquete Phylip de Felsenstein.

nivel de ADN la cepa LPU83 aparece separada del resto de los rizobios (A), en el análisis de distancias deducido de la secuencias de aminoácidos la cepa TA LPU83 aparece en una posición intermedia agrupándose ya sea con *S. meliloti* (B, C) o con *R. tropici* (D). La posición intermedia de las secuencias nodH/NodH de LPU83 por filogenia molecular es interesante en razón de que la cepa LPU83 expresa fenotípicamente la capacidad de nodular tanto alfalfa como *Phaseolus vulgaris* (poroto), leguminosas hospedadoras de *S. meliloti* y *R. tropici* respectivamente.

En este Capítulo hemos iniciado la caracterización de los requerimientos de las cepas tipo Or-191 para nodular *M. sativa*. Como hemos mencionado en la Introducción de este capítulo, la presencia de un grupo sulfato en el C6 del extremo reductor de los FN sintetizados por *S. meliloti* es un requerimiento muy estricto para que ese rizobio pueda inducir primordios de nódulo e infectar la raíz de alfalfa. No se conoce hasta el momento la existencia de FN eficientes para mediar la nodulación de alfalfa por rizobios y que no estén sulfatados. Por esta razón, hemos analizado en este Capítulo si las cepas tipo Or191 eran portadoras de genes de sulfatación del tipo *nodH*. Los resultados que hemos presentado muestran que tanto la cepa *R. spp.* Or191 como la cepa *R. spp.* LPU83 aislada de un suelo local poseen ambas un gen análogo al *nodH* de *S. meliloti*. Como en *S. meliloti* dicho gen se encuentra en una única copia/genoma y en un megaplásmido de alto peso molecular. En ese mismo megaplásmido reside también el gen *nifH* que codifica para uno de los componentes estructurales de la enzima nitrogenasa. Actualmente hay depositadas en GenBank 5 secuencias de genes *nodH*, 2 de las cuales corresponden a *S. meliloti*, 2 a *R. tropici*, y una correspondiente a la cepa *R. spp.* N33 aislada de nódulos de *Oxytropis arctobia* (ver leyenda Figura V.2). Es interesante que mientras los rizobios TA de tipo Or191 son capaces de nodular alfalfa y también poroto, la secuencia parcial que hemos deducido para la proteína NodH de la cepa LPU83 (Figura V.8.) tiene características intermedias entre las secuencia NodH de *S. meliloti* simbiote de alfalfa, y *R. tropici* simbiote de poroto. Será interesante investigar la relación de secuencias entre los diferentes genes *nodH* hoy disponibles incluido el de la cepa LPU83 que hemos aislado en este trabajo, y las secuencias de otras sulfotransferasas que han sido recientemente identificadas en distintos rizobios (lentos y rápidos) noduladores de acacia. Será particularmente interesante analizar la especificidad de sulfatación de dichas enzimas y la capacidad de cada una de ellas para complementar mutantes *nodH* de rizobios heterólogos que producen FN estructuralmente muy diferentes. Algunos de los rizobios noduladores de acacia, por ejemplo, generan factores de nodulación fucosilados, una sustitución que está ausente en los FN de *S. meliloti*. Además, a partir de nuevos datos de secuencia se podrá investigar la evolución de la función de sulfatación entre los diferentes rizobios y determinar su grado de correspondencia con la taxonomía actual de los mismos

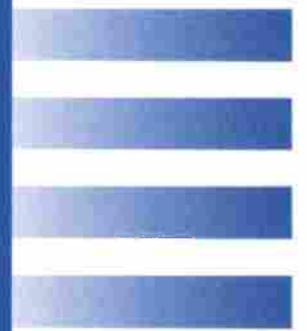
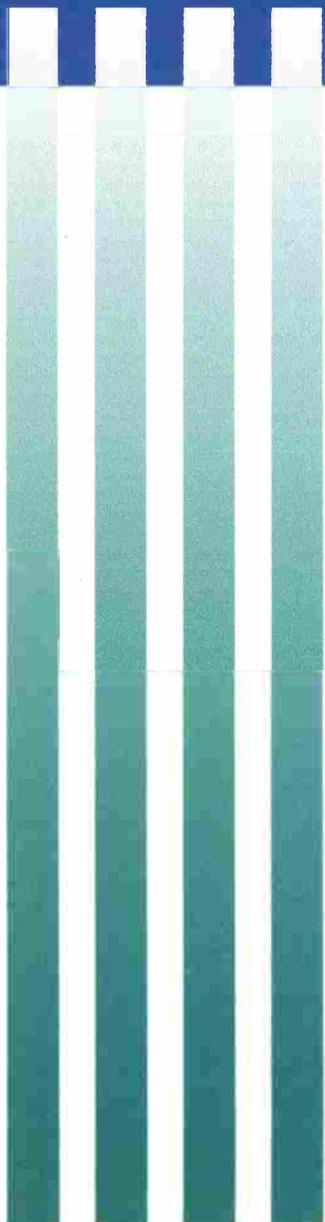
rizobios deducida ya sea a partir de marcadores cromosomales como el 16S (Young *et al.*, 1992, Weisburg *et al.*, 1991) o plasmídicos como el *nodA* (Lindstron, 1989).

En relación a las características funcionales del producto del gen *nodH* de la cepa TA LPU83 hemos mostrado que es capaz de corregir las deficiencias de nodulación de mutantes *nodH* de *S. meliloti*. Ello indica que a pesar de las divergencias de secuencia a nivel de proteína (12%) el producto NodH del rizobio TA es funcionalmente activo en *S. meliloti*. Habiendo reconocido que en la cepa LPU83 el gen *nodH* se encuentra en copia única, es esperable que la mutagénesis del mismo permita evaluar la importancia de *nodH* para la nodulación de alfalfa y de otras leguminosas por los rizobios TA tipo Or191. Lamentablemente, no hemos podido aún generar un mutante *nodH* de la cepa LPU83 para determinar si existen cambios en su capacidad de nodulación y/o en la amplitud del rango de hospedadores de este tipo de rizobios. La determinación de las estructuras de los factores de nodulación de la cepa LPU83 será un paso importante para determinar su grado de relación química con las moléculas señal de *S. meliloti* activas sobre alfalfa, una leguminosa extremadamente selectiva en la elección de su simbionte.

En el capítulo siguiente presentaremos un análisis comparativo de la simbiosis de los rizobios TA y de *S. meliloti* empleando ensayos de nodulación de alfalfa con diferentes tipos de inoculación (simple/doble) y condiciones de pH en el medio.

CAPÍTULO VI

Caracterización simbiótica
de aislamientos locales de
S. meliloti y TA tipo *R. spp.*
Or191



VI.1. INTRODUCCIÓN.

VI.1.1. La simbiosis *S. meliloti* - alfalfa en suelos ácidos. Cepas ácido tolerantes. Caracterización y selección de cepas inoculantes.

La acidez de los suelos es un factor que disminuye significativamente la productividad de las leguminosas (Munns y Fox, 1977, Muslera, E. y Ratera, C. 1991), y muy en particular la de los cultivos de alfalfa (Munns, 1968). Esta es una de las razones principales por la que se ha dedicado un importante esfuerzo al estudio y selección de cepas inoculantes de rizobios que permitan aumentar la persistencia y rendimiento de los cultivos en las condiciones de bajo pH (Graham, 1992; Howieson, 1995 b; Burton, 1972). Experimentos en campo y en invernadero mostraron que la población de *S. meliloti*, la nodulación, y la producción de alfalfa decrecían a medida que el pH del suelo descendía por debajo de 6,0 (Rice *et al.*, 1977; Rice, 1982). Entre las causas que condicionan la baja producción de la alfalfa a pH ácido se encuentra el efecto directo de la concentración de protones sobre la planta, la bacteria, y sobre las etapas del mismo proceso simbiótico (Caetano Anollés *et al.*, 1989; Munns, 1968, 1970; Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff. 1991b). Además, existe menos disponibilidad de algunos elementos como calcio, fósforo y molibdeno; y aumentos en la concentración de otros elementos que pueden alcanzar niveles tóxicos como en el caso del aluminio y el manganeso. En este marco complejo, uno de los puntos más vulnerables en la simbiosis de alfalfa a bajo pH es el propio rizobio, que en el caso de *S. meliloti* es naturalmente muy sensible a la acidez.

En los Capítulos III y IV precedentes hemos descrito la construcción y caracterización fenotípica y genotípica de una vasta colección de aislamientos de rizobios noduladores de alfalfa recuperados de suelos ácidos locales. Desde el punto de vista práctico la selección empírica de cepas de *S. meliloti* ácido tolerantes ha sido concebida como una estrategia útil en la búsqueda de nuevos rizobios que resulten más persistentes y más activas en su simbiosis en los suelos ácidos. Con este tipo de aproximaciones experimentales, aislamientos ácido tolerantes de *S. meliloti* obtenidos en Sardinia-Italia, por ejemplo, han favorecido en forma significativa el establecimiento de pasturas en suelos moderadamente ácidos de Australia occidental (Howieson, 1986). Así, es muy posible que la ácido tolerancia de esos rizobios haya contribuido a mantener la actividad metabólica de la bacteria en el suelo ácido y también su interacción simbiótica con la planta huésped. Sobre la base de estos resultados positivos, la obtención de cepas eficientes y tolerantes a la acidez parece una opción posible para el mejoramiento e implantación de cultivos de alfalfa en suelos de cultivo con bajo pH. Parece razonable además que los propios rizobios presentes en los suelos con bajo pH, como los que hemos aislado, sean portadores de germoplasma valioso para la adaptación y simbiosis de la bacteria a las condiciones de estrés ácido. En la búsqueda de dicho germoplasma hemos construido la colección de aislamientos presentada en el capítulo III de este trabajo. Será deseable entonces seleccionar cepas que manifiesten en acidez una destacada eficiencia para la

FBN, y al mismo tiempo sean competitivas para la nodulación en condiciones de acidez. En este sentido existen ejemplos en los que a veces ha sido necesaria una nodulación de las cepas inoculadas superior al 70% respecto del total de nódulos (cepas altamente competitivas para la nodulación) para que se aprecie un aumento de la producción vegetal cuando en el suelo existen rizobios ineficientes (Carter *et al.*, 1995; Rice *et al.*, 1977; Thies *et al.*, 1991).

De acuerdo a la tolerancia a la acidez y a las características genotípicas, los rizobios recuperados de los suelos locales fueron agrupados en dos poblaciones bien diferenciadas que correspondieron mayoritariamente a cepas de *S. meliloti* (SA y TMA), y en menor proporción a rizobios TA genéticamente relacionados con la cepa *R. spp.* Or191 (Del Papa *et al.*, 1999; Segundo *et al.*, 1999; Wegener *et al.*, 2001). Además, los resultados del capítulo precedente sugieren que la nodulación de alfalfa por los rizobios TA está muy posiblemente mediada por la participación de factores de nodulación sulfatados en acuerdo con la presencia del gen *nodH* que hemos identificado y caracterizado. Estas observaciones refuerzan la presunción de que la producción de factores de nodulación sulfatados es una condición estricta para que los rizobios puedan nodular alfalfa.

En este Capítulo presentamos un conjunto de ensayos que han sido diseñados para caracterizar y comparar los comportamientos simbióticos de aislamientos locales de *S. meliloti* y de rizobios TA tipo Or191. Hemos analizado la eficiencia de la fijación simbiótica de nitrógeno en condiciones neutras y ácidas; y los efectos de la acidez sobre la nodulación, la infectividad y la competitividad de las cepas. Los resultados obtenidos muestran características diferenciales muy notorias entre las cepas de *S. meliloti* y la cepa TA LPU83 representativa de los aislamientos tipo *R. spp.* Or191.

VI.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VI.2.1. Estimación de la fijación de nitrógeno (FBN) de rizobios locales *S. meliloti* y TA tipo Or191, en simbiosis con alfalfa en medio hidropónico a distintos pHs.

Uno de los parámetros más importantes que debe tenerse en cuenta a la hora de calificar el comportamiento simbiótico de un rizobio es su eficiencia para la FBN. En ese sentido, será deseable una alta tasa de FBN para cualquier cepa que sea utilizada en la inoculación de suelos de cultivo. En los ensayos que presentamos en esta sección, hemos intentado comparar la eficiencia para la FBN de aislamientos locales representativos de las dos poblaciones de rizobios noduladores de alfalfa que hemos encontrado en los suelos ácidos locales. En la literatura existe información muy abundante sobre distintas metodologías para estimar la FBN que van desde medidas de reducción de acetileno en ensayos de laboratorio, hasta el empleo del isótopo ^{15}N en condiciones de campo. Para la comparación de cepas en ensayos de laboratorio una de las metodologías más utilizadas para estimar la FBN ha sido la comparación del peso seco de plantas inoculadas vs. plantas control no inoculadas, ambas crecidas en un medio mineral libre de nitrógeno. Esa es la metodología que hemos utilizado en los ensayos que describimos a continuación.

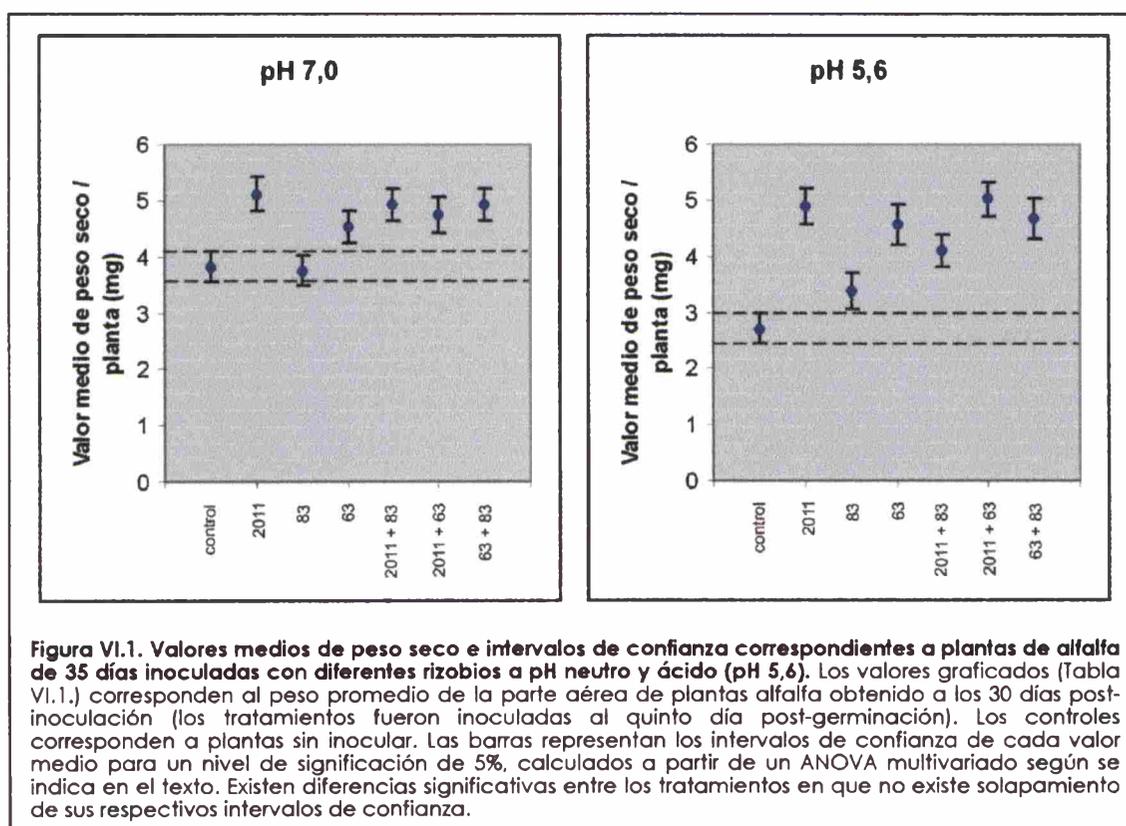
Tabla VI.1. Resultados de las medidas del peso seco de plantas de alfalfa inoculadas con diferentes cepas de rizobios.

Tratamiento y condición de pH		Peso medio/planta (mg)	Nº plantas/ Tratamiento	Valor mínimo observado	Valor máximo observado
Control	A	2,709	53	1	5
Control	N	3,813	46	1,4	6,8
2011	A	4,881	36	1,7	10,7
2011	N	5,118	38	1,7	11,9
LPU83	A	3,375	40	1,2	7,1
LPU83	N	3,751	43	1,5	7
LPU63	A	4,571	31	1,3	9,9
LPU63	N	4,531	39	1,8	10
2011+LPU83	A	4,096	47	1,5	9,7
2011+LPU83	N	4,981	39	1,1	9,4
2011+LPU63	A	4,763	40	1,1	9,5
2011+LPU63	N	4,74	35	1,4	8,6
LPU83+LPU63	A	4,678	32	1,4	9,7
LPU83+LPU63	N	4,917	42	1,4	8,7

Inmediatamente después de la inoculación de las plantas con los rizobios se realizó el recuento de bacterias viables en el inóculo. El número de bacterias inoculadas para cada rizobio fue el siguiente: *S.meliloti* 2011, $6,7 \cdot 10^6$ ufc/planta; LPU83, $7,8 \cdot 10^5$ ufc/planta y LPU63, $4,9 \cdot 10^6$ ufc/planta.

Las letras N y A denotan la condición neutra (7,0) o ácida (5,6) del medio al inicio del ensayo. Las variaciones de pH a lo largo de las cuatro semanas de experimento no fueron mayores que 0,5 unidades. El ensayo fue realizado empleando alfalfa variedad CUF101 como planta huésped.

Los experimentos de nodulación fueron realizados en bolsas plásticas para crecimiento de plantas (Mega-Mineapolis-USA) empleando medio hidropónico de Howieson a pH 7,0 y 5,6 según se describe en Materiales y Métodos sección II.21.. En cada una de las condiciones de pH utilizadas (neutra y ácida), las plantas fueron inoculadas con los aislamientos *S. meliloti* LPU63 y/o *R. spp.* LPU83, representativos de los grupos TMA y TA respectivamente. Como *S. meliloti* control se utilizó la cepa de referencia 2011. Como hemos dicho, la fijación de nitrógeno fue estimada a través del peso seco de las plantas 4 semanas luego de la inoculación. En la Tabla VI.1. se presentan los resultados de cada uno de los tratamientos ensayados (30-50 plantas/tratamiento, 541 plantas totales). Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) siguiendo el esquema de un experimento factorial completo y desbalanceado dado que no todos los tratamientos tuvieron exactamente el mismo número de réplicas (plantas). En la Figura VI.1. se muestran los valores medios de peso seco/planta para cada uno de los tratamientos, y los límites de confianza para un nivel de significación del 5%.



Del análisis de los resultados de peso seco pueden establecerse las siguientes conclusiones:

- 1) Existe diferencia significativa entre los controles ácido y neutro sin inocular lo que pone en evidencia el efecto negativo de la acidez en las condiciones de ensayo que hemos implementado.
- 2) Los valores de peso seco de los tratamientos inoculados presentan diferencias significativas respecto de los no inoculados, a excepción del tratamiento inoculado con la cepa TA LPU83 en condición neutra. Esta observación presenta a la cepa LPU83

como muy ineficiente para la FBN. En diferentes ensayos independientes esta cepa ha mostrado un comportamiento similar, en concordancia con las descripciones ya publicadas para la cepa relacionada *R. spp.* Or191 (Eardly *et al.*, 1985).

La diferencia significativa que se observa en el caso de la inoculación con la cepa LPU83 en acidez se debe muy posiblemente a que pequeños efectos del rizobio, aunque limitados, son considerables para las plantas que crecen bajo condiciones de estrés ácido. En otros experimentos independientes, no hemos observado sin embargo diferencias en ninguno de los dos pHs entre el peso de las plantas control sin inocular y el de las plantas inoculadas con el aislamiento LPU83 (véase por ejemplo el experimento que se muestra más adelante en la Figura VI.2., barras 3 y 7, pH5.6).

- 3) Existen efectos estadísticamente significativos de ambas variables del ensayo, el tipo de bacteria inoculada y el pH del medio, sobre el peso final de las plantas (variable de salida)(Figura VI.1.).

Además, en la Tabla VI.1. se observa que los valores medios de peso seco de los tratamientos a pH neutro (N), muestran en general valores superiores a los de sus correspondientes tratamientos en la condición ácida (A), excepto en dos casos en que las mediciones son prácticamente iguales: LPU63 (N y A); y 2011+LPU63 (N y A). Es interesante remarcar entonces que las

diferencias de peso seco originadas por las diferencias de pH no se manifiestan en dos tratamientos en los que ha sido inoculado el aislamiento eficiente LPU63 recuperado de un suelo ácido. Salvo en esas inoculaciones con el aislamiento LPU63 que lo presentan por tanto como muy interesante, se ve claramente la influencia de la variable pH sobre el desarrollo de las plantas. Además, se observa que el efecto negativo de la acidez se manifiesta mucho más claramente cuando las

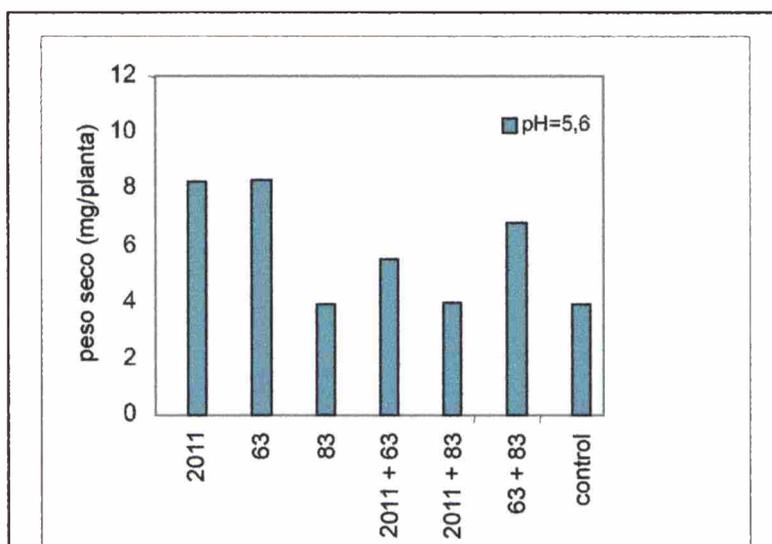


Figura VI.2. Peso seco de plantas de alfalfa variedad CUF101 cuatro semanas después de ser inoculadas con diferentes cepas de rizobios en medio mineral a pH 5,6. El experimento que se presenta en esta Figura es independiente del que se ha presentado en la Tabla VI.1. Los inóculos bacterianos son los mismos que se detallan al pie de la Tabla VI.2.

plantas no son inoculadas. Este hecho queda evidenciado por la muy marcada diferencia de pesos secos entre los controles no inoculados N y A. La inoculación con cepas eficientes disminuyó las diferencias generadas por el pH. Finalmente, debe destacarse que la cepa TA LPU83 presentó los valores más bajos de peso seco al compararlos con el resto de las combinaciones de bacterias, tanto en la condición ácida como en la neutra. En la Figura VI.2. se presenta una repetición de este ensayo en la condición ácida en la que se

pudo confirmar la eficiencia de la cepa LPU63, aún cuando fue coinoculada con la cepa ineficiente LPU83 (ver barras 2, 4 y 6 vs. barra 7 control).

VI.2.2. Dinámica de la infección de raíces de alfalfa por las cepas *S. meliloti* LPU63, y *R. spp.* LPU83.

VI.2.2.1. Caracterización de las cinéticas de nodulación. Evolución de la nodulación de cada rizobio en diferentes regiones topológicas de la raíz y a diferentes pHs.

Con el propósito de realizar una caracterización comparativa de las características con que cada uno de los rizobios infectan la raíz de alfalfa, analizamos en una primera

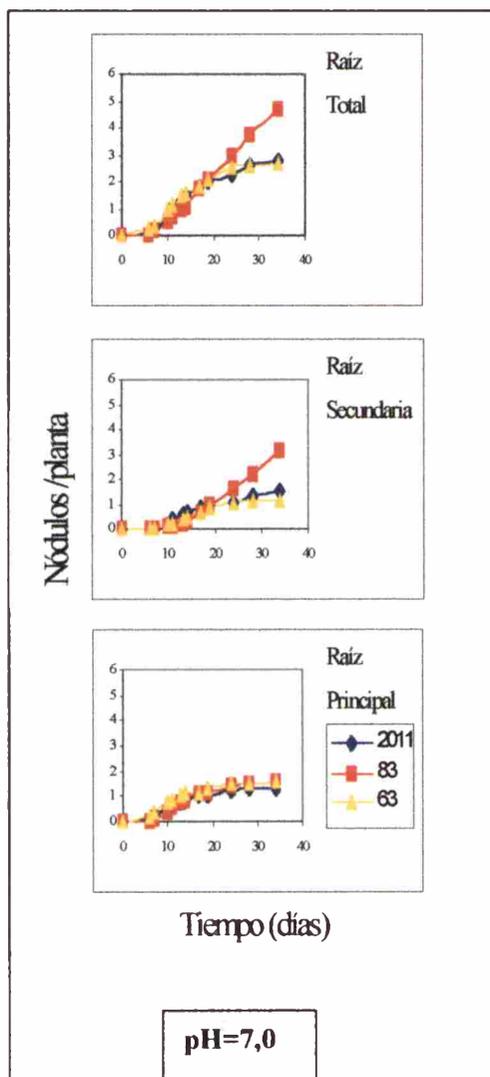


Figura VI.3. Cinéticas de nodulación de alfalfa en ensayos de inoculación simple a pH neutro con cepas de *S. meliloti* y rizobios TA ineficientes tipo *R. spp.* Or191. El experimento fue realizado en bolsas plásticas para crecimiento de plantas. Los inóculos bacterianos son los mismos que se detallan al pie de la Tabla VI.2. El número de nódulos/planta en cada punto a lo largo del ensayo corresponde al valor medio calculado sobre aproximadamente 100 plantas / tratamiento (aprox. 300 plantas totales).

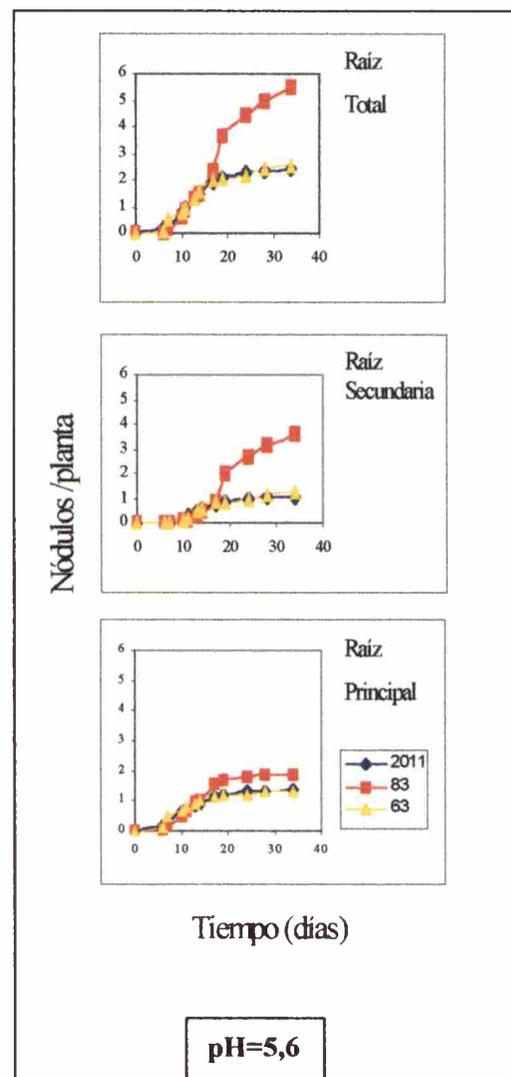


Figura VI.4. Cinéticas de nodulación de alfalfa en ensayos de inoculación simple a pH ácido con cepas de *S. meliloti* y rizobios TA ineficientes tipo *R. spp.* Or191. El experimento fue realizado en bolsas plásticas para crecimiento de plantas. Los inóculos bacterianos son los mismos que se detallan al pie de la Tabla VI.2. El número de nódulos/planta en cada punto a lo largo del ensayo corresponde al valor medio calculado sobre aproximadamente 100 plantas / tratamiento (aprox. 300 plantas totales).

instancia el progreso de la aparición de nódulos en el tiempo en las diferentes regiones del sistema radicular a lo largo de 6 semanas post-inoculación (cinéticas de nodulación). En las Figuras VI.3. y VI.4 se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de simple inoculación a pH neutro y a pH ácido (pH 5,6), respectivamente. Como es característico de la nodulación de alfalfa por *S. meliloti*, en el caso de las cepas 2011 y LPU63 el número de nódulos en el sistema radicular alcanza un máximo y permanece constante (*plateau*) luego de aproximadamente 2-3 semanas post-inoculación (ver raíz total en Figuras VI.3 y VI.4). Dicho comportamiento es el esperable a consecuencia del mecanismo sistémico de autorregulación del número de nódulos descrito en detalle en distintas leguminosas, incluida alfalfa (Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff. 1990, Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff. 1991b).

Si bien la planta requiere de nitrógeno que se incorpora a través de la fijación simbiótica, la sobreinfección no redundará en una mayor incorporación de nitrógeno y representa un costo energético adicional en la asociación con la bacteria. Una característica del aislamiento LPU83 que aparece en las Figuras VI.3. y VI.4, es su capacidad de nodular alfalfa en forma indefinida sin llegar a un valor constante en el número de nódulos, ya sea por ser incapaz de disparar la respuesta de autorregulación o

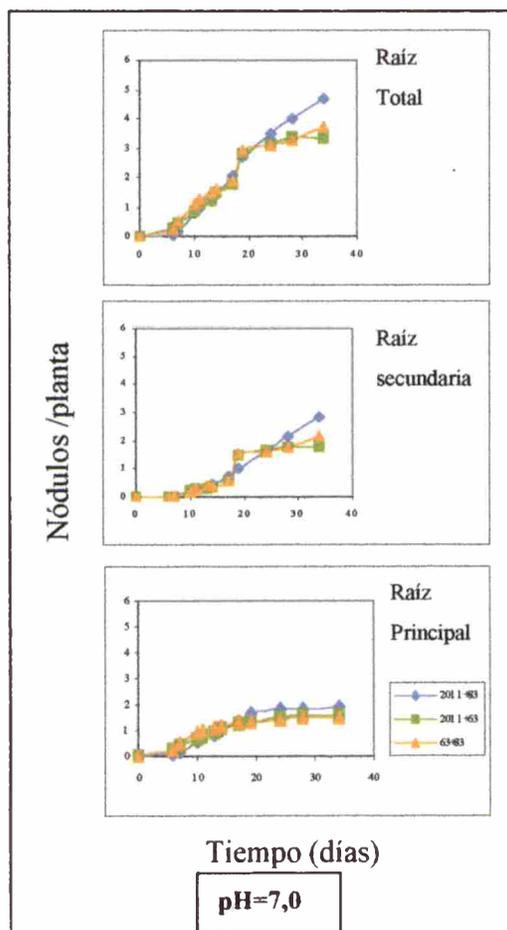


Figura VI.5. Cinéticas de nodulación de alfalfa en ensayos de doble inoculación a pH neutro con cepas de *S. meliloti* y rizobios TA inefficientes tipo *R. spp.* Or191. El experimento fue realizado en bolsas plásticas para crecimiento de plantas. Los inóculos bacterianos son los mismos que se detallan al pie de la Tabla VI.2.

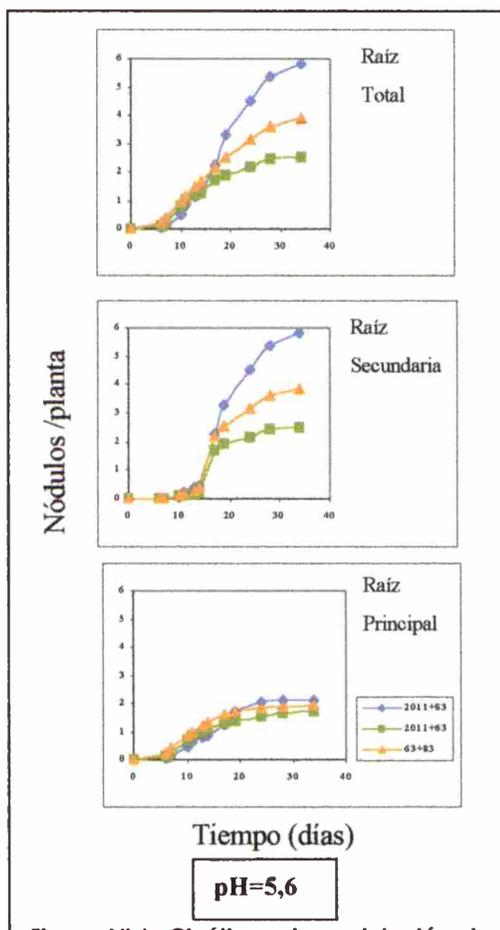


Figura VI.6. Cinéticas de nodulación de alfalfa en ensayos de doble inoculación a pH ácido con cepas de *S. meliloti* y rizobios TA inefficientes tipo *R. spp.* Or191. El experimento fue realizado en bolsas plásticas para crecimiento de plantas. Los inóculos bacterianos son los mismos que se detallan al pie de la Tabla VI.2.

por ser insensible a las señales involucradas en la misma. Esta última posibilidad está fuertemente apoyada por las cinéticas de nodulación que hemos realizado sobre tratamientos en los que hemos coinoculado la cepa LPU83 con las cepas de *S. meliloti* 2011 y LPU63, para verificar si la autoregulación que es claramente inducida por estos dos rizobios, es percibida o no por la cepa coinoculada LPU83 (Figuras VI.5. y VI.6.). En los ensayos de coinoculación, ambos tipos de rizobios pudieron ser recuperados de los nódulos (ver más adelante ensayos de competición). Los resultados indican entonces que la cepa LPU83 desarrolla una nodulación sostenida en el tiempo aún en presencia de nódulos que están ocupados por *S. meliloti* en la misma planta.

Teniendo en cuenta que la planta regula el número de nuevas infecciones en relación con el aporte de nitrógeno que recibe, existe seguramente una relación fisiológica estrecha entre el fenotipo de nodulación sostenida de la cepa TA LPU83 y su extremadamente baja o nula capacidad fijadora de nitrógeno. De acuerdo a estas consideraciones, es razonable que un patrón similar de nodulación se observe tanto a pH neutro como ácido (Figuras VI.4. y VI.6.). Por razones que hasta el momento desconocemos, la nodulación sostenida de la cepa LPU83 deriva casi en forma exclusiva de la formación de nuevos nódulos en raíces secundarias. Este hecho pone de manifiesto un comportamiento diferente de las distintas regiones topológicas de la raíz respecto de su susceptibilidad para ser infectadas, diferencia esta que es claramente puesta en evidencia por el patrón de infección de la cepa TA en raíz primaria y en las raíces laterales. Una observación que también debe ser remarcada es la mayor nodulación observada en acidez cuando la cepa TA estaba presente ya sea en inoculación simple o doble (nodulación LPU83 en Figura VI.4. vs. VI.3., y Figura VI.5. vs. VI.4. en las que la nodulación de la cepa LPU83 parece aún más marcada a pH 5,0 que a pH 5,6). Las evidencias encontradas hasta este punto muestran al aislamiento TA LPU83 como ineficiente y con una alta capacidad de nodulación en acidez que se manifiesta aun en presencia del simbionte de alfalfa fijador de nitrógeno, *S. meliloti*. Sin duda, este comportamiento representa un fenotipo de riesgo si se lo extrapola a condiciones de campo y especialmente en acidez. Sin embargo, el desempeño de la cepa TA LPU83 en condiciones de suelo debe ser aun analizado.

VI.2.2.2. Evaluación de la infectividad de las cepas *S. meliloti* LPU63 y *R. spp.* LPU83: capacidad de las mismas para nodular en forma temprana la raíz de alfalfa.

Además de la capacidad de una cepa para nodular la raíz de su planta huésped (número de nódulos formados), una característica que está más vinculada a la capacidad de nodulación en presencia de otras cepas competidoras es la velocidad con que el rizobio es capaz de infectar la raíz en crecimiento (infectividad). Tal parámetro es importante dado que, al estar limitado por la planta el número de infecciones (ver sección precedente), una mayor velocidad de infección y penetración radicular confiere a los rizobios una mayor ventaja para colonizar el nicho simbiótico. Las medidas de infectividad

pueden ser realizadas mediante diferentes técnicas, todas ellas orientadas a estimar el número de infecciones que se desarrollan en una ventana fija de tiempo (Olivares *et al.*, 1980, Caetano Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff, 1991b). En relación a ello ha sido bien documentado, por ejemplo, que la velocidad de infección de leguminosas es proporcional al número de nódulos desarrollados por encima de la posición que tenía el extremo radicular al momento de la inoculación (marca RT, *root tip*). Dado que la zona infectable de la raíz está cercana al extremo de la misma y se desplaza permanentemente a causa del crecimiento, cambios en el número de nódulos por encima de la marca RT (más cercanos al tallo) serán indicativos de diferencias en la infectividad de los rizobios.

En las secciones precedentes hemos analizado a diferentes pHs las características de nodulación de aislamientos locales representativos de las dos poblaciones que hemos encontrado en los suelos ácidos locales, así como su contribución al desarrollo de la parte aérea de la planta en medios libres de nitrógeno. Dado que hemos encontrado rizobios muy ácido tolerantes, ineficientes, y con una muy buena nodulación en alfalfa como la cepa LPU83; avanzamos ahora en el análisis de la infectividad de estas bacterias respecto de la de las cepas *S. meliloti* 2011 de colección y LPU63 que hemos aislado en este trabajo. En la Tabla VI.2. se muestran los resultados de las medidas de infectividad que he realizado a diferentes pHs para las cepas mencionadas, así como para inóculos preparados con las combinaciones de las mismas. Los resultados obtenidos indican por un lado que la cepa LPU63 es la que muestra la mayor infectividad en ambas condiciones de pH, con diferencias estadísticamente significativas respecto de las infectividades de las cepas *S. meliloti* 2011 y LPU83 tolerante a la acidez (prueba t, nivel de significación 5%).

Tabla VI.2. Infectividad de inóculos de distintos rizobios (simples y dobles) estimada a través de la determinación del número de nódulos desarrollados por las bacterias encima de la marca RT ^a.

Cepas Inoculadas	Numero de nódulos arriba de la marca RT / planta ^b	
	pH 7,0	pH 5,6 (ácido)
2011	0,93 ± 0,10	1,03 ± 0,14
LPU 63	1,32 ± 0,12	1,47 ± 0,16
LPU 83	0,79 ± 0,10	1,19 ± 0,14
2011+LPU 63	1,22 ± 0,17	1,02 ± 0,11
2011+LPU 83	0,92 ± 0,10	0,94 ± 0,10
LPU 63+LPU 83	1,05 ± 0,15	1,14 ± 0,11
Control sin inocular	-----	-----

El número de bacterias inoculadas para cada rizobio fue el siguiente: *S. meliloti* 2011, 4,9 10⁶ ufc/planta; LPU83, 2,9 10⁶ ufc/planta y LPU63, 4,9 10⁶ ufc/planta.

Las variaciones de pH a lo largo de las cuatro semanas de experimento no fueron mayores que 0,5 unidades. Como planta huésped se empleo alfalfa variedad CUF101. Los tratamientos en verde son los que muestran diferencias significativas entre la condición neutra (columna 2) y la ácida (columna 3) (prueba t, nivel de significación 1%). El número de plantas/tratamiento fue de aproximadamente 90 (630 plantas totales).

a: RT, marca que indica la posición que tenía el extremo radicular en el momento de la inoculación.

b: nódulos arriba de la marca RT / planta ± σ/\sqrt{n} , donde n=número de plantas.

nod por flavonoides, adsorción radicular, etc), y también en la infección (ej. infectividad, progreso de la infección en el tejido de la planta, etc.). En razón de ello, la competitividad será reflejo de cómo las condiciones del entorno y ambientales influyen los parámetros anteriores y finalmente la capacidad de cada rizobio por ocupar el limitado nicho simbiótico. En esta sección, presentamos los resultados de evaluación de competitividad a distintos pHs de cada una de las capas que hemos estudiado en este capítulo. Dado que el ensayo requiere identificar a cada uno de los rizobios que se recuperan de los nódulos, hemos obtenido un derivado resistente a estreptomicina y espectinomicina para la cepa 2011, y un derivado sólo resistente a estreptomicina para el caso de la cepa LPU63. Se empleó además la variante salvaje de la cepa LPU83, sensible a ambos antibióticos. Se verificó que las variantes resistentes de cada cepa no presenten diferencias de competitividad con la cepa madre original. Las distintas cepas fueron inoculadas en combinaciones de a pares en una relación de número 1:1, y a los 40 días post-inoculación se cortaron los nódulos de raíz principal, se esterilizaron en superficie, y se analizó el tipo de bacterias contenidas en su interior de acuerdo a los patrones de resistencia a antibióticos que hemos detallado. En la siguiente Figura VI.7. se presentan los porcentajes relativos de ocupación de nódulos para cada uno de los ensayos de coinoculación. Se observó que a pH neutro la cepa LPU83 es desplazada prácticamente en forma completa por la cepa LPU63 que resultó altamente competitiva en esa condición de pH. Sin embargo, a pH ácido aumentó en gran medida su competitividad (o disminuyó la de la LPU63) hasta casi igualarse el número de nódulos ocupadas por cada una de las cepas. Un comportamiento muy diferente resultó de los ensayos en los que se coinocularon las cepas 2011 y LPU83. En ambos casos hubo un amplio predominio de la cepa TA, y nuevamente la cepa mejoró su índice de ocupación en acidez. La comparación de ambas cepas de *S. meliloti* permite inferir que LPU63 es altamente competitiva frente a la *S. meliloti* 2011 independientemente del pH del medio.

Estos resultados muestran nuevamente una llamativa mejora en las características simbióticas de la cepa TA LPU83 en condiciones ácidas. Frente a ese comportamiento, la cepa LPU63 aparece igualmente competitiva en acidez, y conduciendo a un crecimiento de la planta similar al que se obtiene en ausencia de la cepa competidora ineficiente LPU83 (comparar las líneas 7 Ácido y 8 Neutro de la cepa LPU63 en la Tabla VI.1., con las líneas 13 Ácido y 14 Neutro correspondientes a los tratamientos en los que se coinoculó LPU63+LPU83). La cepa LPU63 resulta por tanto de interés práctico, y aparece como un muy buen material de análisis para investigar en más detalle el desarrollo de la simbiosis de *S. meliloti* con alfalfa a bajo pH.

El conjunto de ensayos que hemos presentado en este capítulo han enfocado el análisis de los efectos de la acidez sobre la asociación de distintas cepas de *Sino* (*Rhizobium*) con raíces de alfalfa. Todos los ensayos de inoculación de plantas han sido realizados en medio definido en el laboratorio y en condiciones controladas de luz y temperatura. Coincidente

con estudios previos de Munns (1968; 1970) con cepas de *S. meliloti*, nuestros resultados mostraron que la nodulación de *S. meliloti* 2011 y LPU63 disminuye al pH ácido moderado que hemos ensayado (nódulos totales a los 40 días post-inoculación Figuras VI.3. vs. VI.4.; y VI.5. vs VI.6.). Diferente ha sido el comportamiento de la cepa TA R. spp LPU83 que noduló profusamente la raíz en ambas condiciones de pH, y en mayor extensión a pH ácido. Este comportamiento mostró por otra parte ser "dominante" cuando la cepa TA fue inoculada conjuntamente con las cepas de *S. meliloti*. En los estudios de infectividad, aunque la cepa TA mostró a pH neutro una escasa nodulación por encima de la marca RT, fue la única que en la condición ácida mejoró significativamente (línea 3, Tabla VI.2.). Sin embargo, a pesar de la infectividad y capacidad de nodulación en acidez de la cepa TA, las plantas noduladas mostraron los valores más bajos de peso seco en medio libre de nitrógeno, con valores muy cercanos a los del control sin inocular (muy baja o nula FBN). Las características simbióticas que aquí hemos analizado presentan a este rizobio como muy ineficiente, pero con muy buena capacidad noduladora y competitiva en acidez (competencia por el nicho simbiótico). Además, para la condición de vida libre en acidez los rizobios TA tienen una ácido tolerancia natural que posiblemente se traduzca en una ventaja adaptativa respecto de *S. meliloti* mucho más sensible (Capítulo IV). Será importante evaluar por tanto cómo es la evolución futura de la población de estos rizobios ineficientes en acidez respecto de la población de *S. meliloti*, el simbiote de alfalfa fijador de nitrógeno. (Ver el apéndice: "Estudio de supervivencia de rizobios en muestras de suelo estéril en sistema de microcosmos efecto del pH y de la planta huésped"). La ineficiencia de la cepa LPU83 y su nodulación y competitividad a pH ácido respecto de *S. meliloti* muestra que los rizobios TA pueden representar un problema cierto en el momento de intentar establecer un inoculante bacteriano que mejore la producción de alfalfa en suelos ácidos de cultivo.

Contamos ahora con un rizobio como *S. meliloti* LPU63, que a pesar de presentar una ácido tolerancia muy similar a la mayoría de las cepas SA de *S. meliloti* (la hemos clasificado como TMA en Capítulo IV), es muy eficiente tanto en neutralidad como en acidez, y es muy competitiva incluso frente a la propia cepa TA LPU83 en condición la ácida (este Capítulo). Resultados similares a los que hemos obtenido para la cepa LPU63 han sido obtenidos por otros investigadores con los que hemos trabajado en colaboración, empleando un sistema hidropónico en el que las plantas permanecieron completamente sumergidas en solución mineral durante el tiempo completo del ensayo (Segundo *et al.*, 1999). En ese tipo de experimentos si bien las plantas sufren un estrés bastante considerable por la falta de aireación en la zona radical, se consigue un muy buen control del pH a lo largo de todo el ensayo. A pH neutro, el peso seco de los tratamientos inoculados con LPU63 fue significativamente mayor ($P < 0,05$) que el inoculado con las cepas GR4 o 2011. A pH 5,6 en las mismas condiciones de hidroponia, la mayor producción de parte aérea en las plantas de alfalfa fue obtenida nuevamente en el tratamiento inoculado con el aislamiento LPU63.

La cepa *S. meliloti* LPU63 ha sido aislado de un suelo ácido de la localidad de Castelar con pH 5,89. A raíz de ello es posible especular que el fenotipo que expresa frente a la planta puede derivar de una posible adaptación de la bacteria a la condición ácida de su suelo de origen. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la cepa LPU63 es igualmente competitiva a pH neutro, por lo que parece más probable que se trate de una bacteria en la que la capacidad simbiótica es funcional en un rango más extendido de pH, y no sólo adaptada a la condición ácida. La ácido tolerancia ha sido una de las características más valoradas en rizobios inoculantes de alfalfa para suelos ácidos (Howieson *et al.*, 1986). Desconocemos si la tolerancia a la acidez de esta cepa, que es muy moderada, es un factor importante para la expresión de su muy buena competitividad y nodulación a pH 5,6.

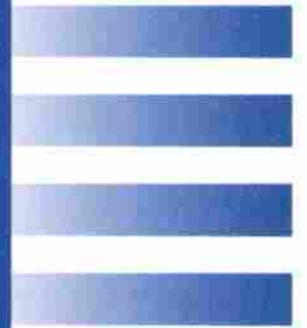
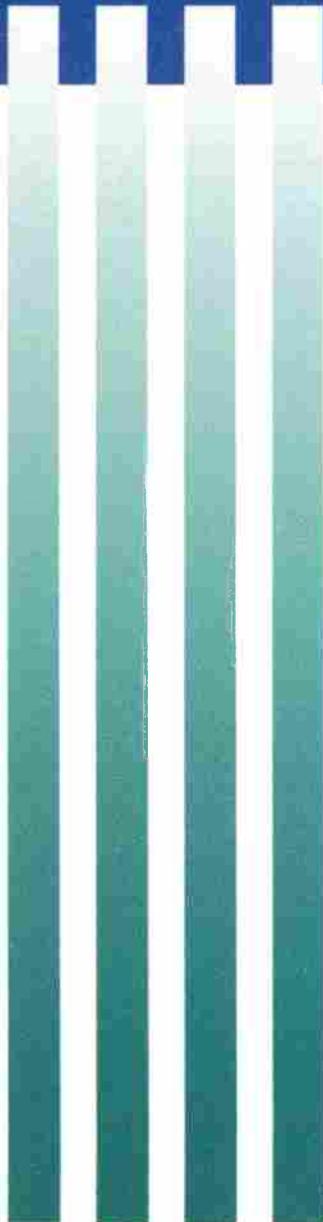
Los resultados obtenidos indicaron que la cepa *S. meliloti* LPU63 pertenece al grupos de cepas de *S. meliloti* aisladas de Argentina con mayor tolerancia a la acidez en medio mínimo (TMA, Capítulo IV), y que presenta una muy buena efectividad, nodulación, y competitividad tanto en acidez como en neutralidad. Dicho rizobio debe ser por tanto considerado como potencialmente útil para la elaboración de inoculantes de alfalfa para suelos ácidos. Las características de la cepa LPU63 que hemos descrito en este Capítulo, justifican la evaluación futura de esta cepa a campo en distintas condiciones de pH y en presencia y ausencia de rizobios naturalizados en el suelo.

En el capítulo que sigue mostraremos una estrategia para la identificación de determinantes de tolerancia a la acidez (*act*) en las cepas LPU63 y LPU83, para investigar luego cuál es la importancia de los mismos para el comportamiento simbiótico de dichas bacterias a bajo pH.

CAPÍTULO VII

Identificación de nuevos genes de ácido tolerancia (*act*).

Caracterización simbiótica de mutantes *act*.



VII.1. INTRODUCCIÓN.

VII.1.1. Ácido tolerancia, genes *act* y simbiosis en acidez. Aproximaciones experimentales al mejoramiento de la asociación rizobio-leguminosa a bajo pH.

Una de las estrategias experimentales que ha sido empleada para corregir las deficiencias de las asociaciones rizobio-leguminosa en condiciones de acidez, ha sido la de intentar el mejoramiento de las características simbióticas de cepas que naturalmente son ácido tolerantes (Hancai *et al.*, 1991). Dicha estrategia se contrapone a la opción de intentar el mejoramiento de la ácido tolerancia de cepas infectivas y eficientes a bajo pH (Glenn y Dilworth, 1994). La primera aproximación al problema está basada en el mejor conocimiento genético y bioquímico del funcionamiento de los genes simbióticos (*nod-nif-fix*) que el los genes que determinan la ácido tolerancia de los rizobios. Sin embargo, es muy posible que aumentos de la ácido tolerancia que puedan ser conseguidos por métodos recombinantes, permitan aumentar la supervivencia y el desenvolvimiento simbiótico de los rizobios a bajo pH, y en particular de *S. meliloti* que, como hemos discutido en la introducción de esta tesis, es muy poco tolerante a la acidez.

Desde el punto de vista empírico, la ácido tolerancia de los rizobios ha sido considerada como una característica fenotípica que influye positivamente en el establecimiento de la simbiosis en condiciones de acidez (Howieson, 1986). Por ello, la identificación de determinantes genéticos de tolerancia a la acidez en *S. meliloti* ha sido considerado un punto importante hacia el diseño y generación de bacterias recombinantes que tengan mejor persistencia y actividad simbiótica a bajo pH. Sin embargo, la biología molecular de la ácido tolerancia ha puesto en evidencia un panorama complejo que requiere hoy de mucha más información básica para avanzar en la comprensión de los mecanismos que usa la bacteria para protegerse de la acidez del medio. Existen en este momento unos pocos genes de *S. meliloti* que han sido identificados como marcadores de tolerancia a la acidez (genes *act*) y cuya mutagénesis conduce a fenotipos bacterianos más sensibles a las condiciones de bajo pH en condiciones de laboratorio (Goss *et al.*, 1991, Tiwari *et al.*, 1992; 1996a, 1996b). Además, los cambios de tolerancia a la acidez en los mutantes *act* descritos hasta el momento son pequeños respecto del comportamiento de la cepa salvaje. La evidencia disponible indica que la tolerancia a la acidez en *S. meliloti* es un fenotipo multigénico, donde los genes participantes que han sido identificados corresponden a marcos de lectura cuya expresión está asociada posiblemente a más de una función celular y no exclusivamente (y como función principal) a determinar el perfil de ácido tolerancia de la bacteria. La manipulación racional de la ácido tolerancia para el mejoramiento de cepas requerirá entonces de una mayor caracterización genética y funcional de los marcadores *act*. El hecho de que los genes *act* que han sido identificados estén presentes en cepas sensibles y en cepas tolerantes sugiere que las diferencias fenotípicas entre cepas podrían eventualmente derivar de distintas combinaciones alélicas más que de la presencia-

ausencia de genes *act* específicos (Glenn y Dilworth, 1994). Tales cuestiones muestran el carácter incipiente de nuestro conocimiento sobre los mecanismos fisiológicos que determinan las características de tolerancia a la acidez en *S. meliloti*. Asimismo, tampoco han sido evaluadas en forma comparativa la persistencia y simbiosis a bajo pH de rizobios isogénicos (salvajes y mutantes) con distinta tolerancia a la acidez haciendo difícil evaluar cuáles son los cambios de ácido tolerancia (magnitud) que resultan en modificaciones significativas del comportamiento simbiótico a bajo pH. La observación de que cepas más tolerantes han tenido un mejor desempeño simbiótico en acidez ha estado siempre condicionado a la comparación de cepas con constituciones genéticas diferentes.

En este Capítulo mostraré los avances que he realizado en la identificación y caracterización molecular de nuevos marcadores *act* de rizobios noduladores de alfalfa, *S. meliloti* y *TA R. spp.* de tipo Or191. Presentaré finalmente los resultados de ensayos de nodulación y competición con los que he evaluado las características simbióticas de los mutantes respecto de la de sus respectivas cepas salvajes a pH neutro y en acidez.

VII.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

VII.2.1. Estrategias para la identificación de nuevos determinantes de ácido tolerancia (genes *act*) en rizobios noduladores de alfalfa.

Para intentar identificar nuevos determinantes genéticos de tolerancia a la acidez en los rizobios noduladores de alfalfa, hemos realizado una mutagénesis generalizada de con *Tn5* (salvaje o *Tn5B20* que genera fusiones transcripcionales *lacZ*), y a *posteriori* hemos seleccionado en medio ácido aquellos mutantes que resultaron alterados en su crecimiento respecto del comportamiento a pH 7. La mutagénesis fue realizada sobre la cepa eficiente y competitiva en acidez *S. meliloti* LPU63, y sobre la cepa TA ineficiente LPU83 de tipo Or191. Los mutantes por transposición crecidos en medio TY con neomicina, fueron repicados en medio sólido SGM a pH 7,0 (control), y analizados en su capacidad de crecer en el mismo medio mínimo pero a pH ácido 5,6 ó 5,0 según se trató de *S. meliloti* o de la cepa TA LPU83, respectivamente. En el Capítulo III hemos descrito el uso del mismo medio para evaluar la ácido tolerancia de todas las cepas de la colección.

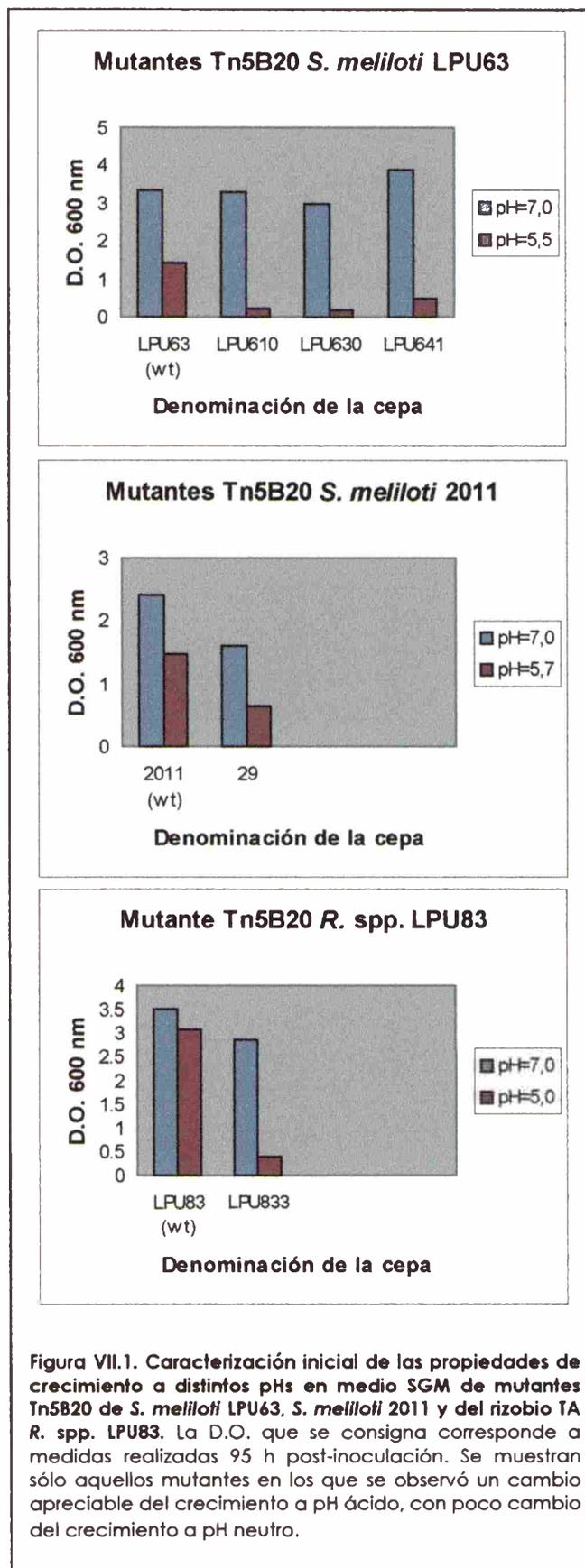
En una primera instancia se buscaron potenciales mutantes que creciendo normalmente a pH 7.0 perdieran completamente la capacidad de crecer en su respectiva condición ácida (5,6 ó 5,0 según el tipo de rizobio). Con ese propósito se escrutaron sin éxito más de 2000 mutantes insercionales *Tn5* de la cepa *S. meliloti* LPU63, y más de 3000 de la cepa *R. spp.* TA LPU83: No se obtuvieron mutantes con las características mencionadas en ninguna de las dos cepas. El resultado sugirió que probablemente se requieran cambios en más de un gen para generar modificaciones marcadas en la ácido tolerancia de estos rizobios. Los resultados refuerzan al mismo tiempo la idea de que la tolerancia a la acidez es posiblemente un fenotipo multigénico y relacionado con la estructura global propia de cada especie bacteriana (*S. meliloti* / tipo Or191). En ese caso la adaptación de las cepas a cambios marcados de pH será seguramente difícil dado que se requerirá el efecto de varias mutaciones acumuladas.

Empleando una estrategia diferente procedimos entonces a la búsqueda de genes *act* que, aunque no modifiquen el crecimiento de la bacteria en una relación de "todo-a-nada" al cambiar de neutralidad a acidez, produzcan cambios moderados de tolerancia a la acidez sin alterar significativamente el crecimiento a pH neutro. Los resultados que obtuvimos luego de escrutar más de 6000 nuevos mutantes mostraron que la mayoría de los clones que crecían con dificultad en la condición ácida, crecían también con dificultad en la condición neutra. Es muy posible que esos mutantes hayan perdido alguna(s) función(es) central(es) del metabolismo celular por inserción del transposón (*housekeeping genes*). Sin embargo, unos pocos mutantes estuvieron más severamente afectados en su crecimiento en acidez. Los clones mutantes identificados con estas características fueron 4 y se designaron según se indica a continuación: LPU610, LPU630, y LPU641 (mutantes de la cepa LPU63); y LPU833 (mutante de la cepa LPU83). Con la misma estrategia de análisis hemos obtenido un mutante ácido sensible de la cepa de referencia

S. meliloti 2011 y que hemos identificado como clón 29. En la Figura VII.1. se muestran las D.O. 600 nm alcanzadas por cultivos de esas bacterias cuando fueron cultivadas durante aproximadamente 95 h en medio mínimo a pH neutro y a pH ácido (pH 5,5-5,7 para los mutantes derivados de la cepa LPU63 y 2011, y pH 5,0 para los mutantes derivados de la cepa TA LPU83). En acuerdo con los resultados del análisis en medio sólido, todos los mutantes presentaron un crecimiento similar al de la cepa salvaje o muy poco disminuido a pH neutro (con excepción de la cepa *S. meliloti* 29), pero significativamente menor a pH ácido. Los resultados sugerían por tanto que estos mutantes estaban afectadas en determinantes genéticos que afectaban en forma específica el crecimiento en acidez. Los mutantes que presentan en la Figura VII.1. fueron seleccionados luego del escrutinio de más de 6.000 inserciones *Tn5* considerando todas las cepas en su conjunto.

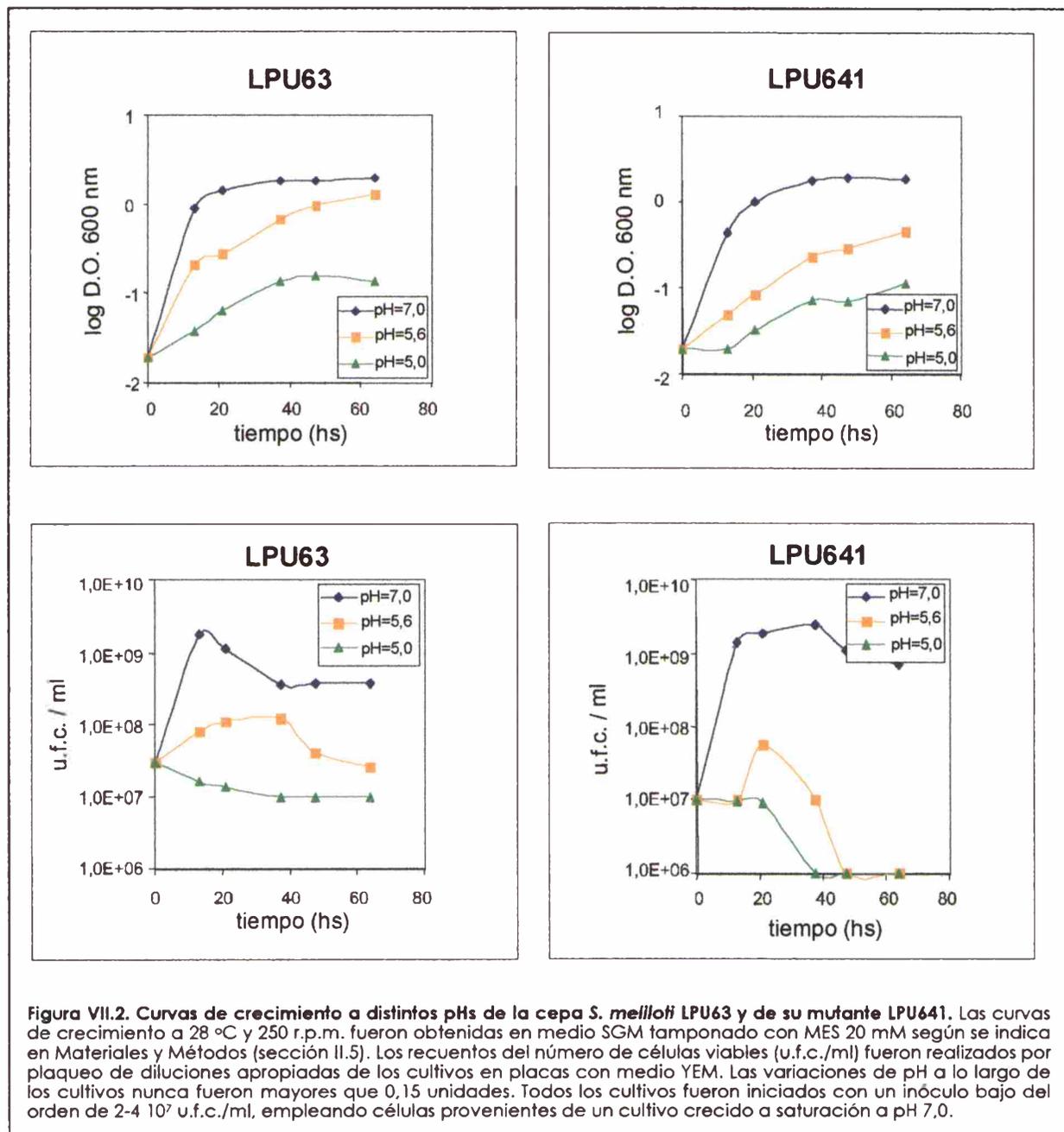
VII.2.2. Caracterización de las propiedades de crecimiento de los mutantes *S. meliloti* LPU641 y *R. spp.* LPU833 a pH ácido y neutro.

De los mutantes presentados en la Figura VII.1. se escogieron dos de ellos, *S. meliloti* LPU641 y *R. spp.* LPU833 para una caracterización más detallada de sus propiedades de crecimiento en medio líquido. Dada la baja frecuencia con que pudieron seleccionarse cepas ácido sensibles, los mutantes LPU641 y LPU833 fueron comparados con sus correspondientes cepas salvajes por PCR-BOXA1R-*fingerprint* para descartar que se



trate de otros rizobios/bacterias contaminantes que se hayan introducido en el curso del experimento en las etapas de mutagénesis y selección. Los patrones obtenidos para los mutantes fueron indistinguibles de los de sus correspondientes cepas salvajes.

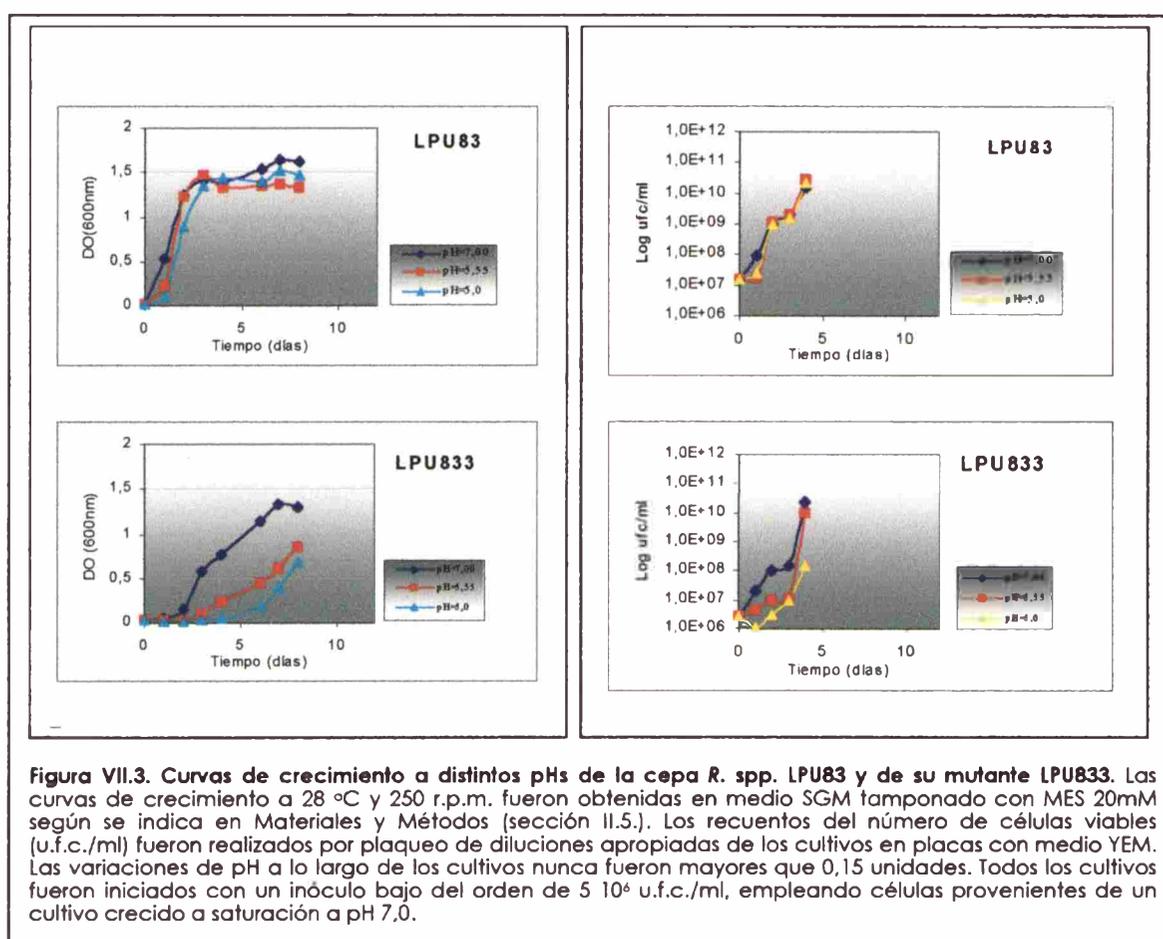
Las curvas de crecimiento de las cepas en medio líquido fueron realizadas en medio mínimo SGM tamponado a pH 7,0 y a pH ácido según se indica en Materiales y Métodos sección II.5.. En la Figura VII.2. se muestran los crecimientos correspondientes a la



cepa LPU63 y a su mutante LPU641. Ambas cepas presentaron un comportamiento comparable a pH 7,0 tanto en la evolución de la O.D. 600 nm como en el número de células a lo largo del cultivo. Sin embargo, existieron diferencias apreciables entre la

evolución de la D.O. de cada una de las cepas tanto a pH 5,6 como 5,0. El análisis de la u.f.c. en los cultivos ácidos revela que a pH 5,6 la cepa salvaje en su condición de MAT (ver Capítulo III) crece aunque con dificultad hasta las 40 h luego de iniciado el cultivo. Contrastando con ese comportamiento, el mutante LPU641 inicia una fase de muerte celular luego de 20 h en la condición ácida, ya sea a pH 5,6 ó 5,0 cayendo los recuentos a cerca de 10^6 u.f.c./ml a las 50 h. La cepa salvaje nunca mostró recuentos inferiores que 10^7 u.f.c./ml en las condiciones de crecimiento ácido.

Tanto en la cepa salvaje como en el mutante en acidez se observa un aumento evidente en la D.O. 600 nm aun en fases de los cultivos en acidez en las que no se observa un aumento paralelo en el número de células. Dado que en general la lisis celular va acompañada de una disminución de la densidad óptica de los cultivos, es probable que los rizobios que a consecuencia de la acidez han detenido su división crecimiento continúen produciendo metabolitos extracelulares por un cierto período de tiempo.



En la Figura VII.3. se muestran las curvas de crecimiento correspondientes al mutante LPU833 derivado de la cepa TA *R. spp.* LPU83. Como en el caso del mutante descrito precedentemente se observan claras diferencias de crecimiento respecto de la cepa salvaje. Aunque a pH neutro el mutante presenta una diferencia inicial en el progreso de la D.O. 600 nm respecto de la cepa mutante, la misma no se ve reflejada en los

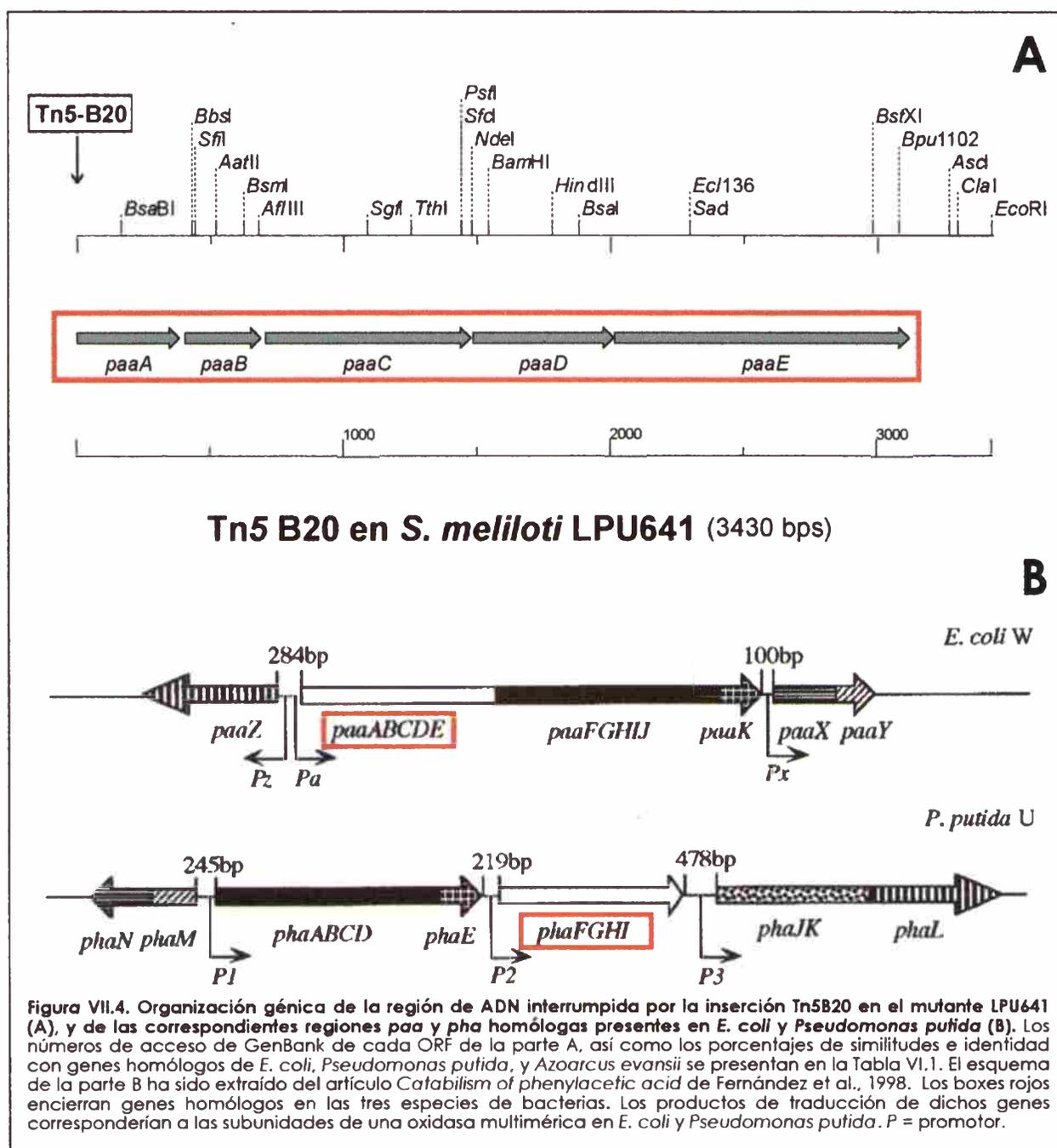
recuentos de células viables correspondientes a una y otra cepa a pH 7,0 que presentan una evolución comparable (u.f.c./ml en curvas azules de ambos rizobios a pH neutro). Sin embargo, en condiciones ácidas existen claras diferencias tanto en la evolución de la D.O. como en la de los recuentos. La diferencia en estos últimos alcanzó hasta dos órdenes de magnitud luego de 5 días de cultivo. Esta diferencia parece estar asociada especialmente a la existencia de una fase *lag* inicial en el caso del mutante que no se observó en el crecimiento de la cepa LPU83. Como se indica en la leyenda de las figuras, todos los inóculos bacterianos fueron preparados a partir de cultivos crecidos a pH neutro. No hemos ensayado el crecimiento de las cepas mutantes a pH ácido empleando inóculos previamente crecidos en la misma condición ácida para investigar si se genera algún cambio en las deficiencias de crecimiento en acidez que hemos observado en las Figuras VII.2. y VII.3..

VII.2.3. Caracterización genético-molecular de las mutaciones inducidas por *Tn5B20* en los rizobios ácido sensibles *S. meliloti* LPU641 y *R. spp.* LPU833.

VII.2.3.1. Análisis del mutante *S. meliloti* LPU641.

Con el propósito de investigar cuáles eran los genes alterados en las cepas LPU641 y LPU833 cuya alteración conduce a un fenotipo más ácido sensible, procedimos al clonado y caracterización molecular de la región de ADN interrumpida por el *Tn5B20*. En el caso de la cepa LPU641, el clonado de la zona de inserción del transposón se realizó por digestión *EcoRI* de ADN genómico del rizobio, ligación del mismo con el plásmido pUC18 digerido con la misma enzima, y posterior transformación de los productos de ligación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α (Materiales y Métodos, sección II.16). Los clones de *E. coli* que resultaron portadores de las resistencias a neomicina (*Nm^r*, marcador *nptII* presente en el transposón) y ampicilina (*Ap^r*, marcador *bla* presente en el vector) fueron analizados para determinar las características de los plásmidos e insertos presentes. En dichos clones pudo confirmarse por análisis de restricción con *EcoRI* la presencia de un plásmido correspondientes al tamaño del vector pUC18, y la de un inserto de ADN de aproximadamente 8 kb. Dado que el transposón *Tn5B20* posee un sitio *EcoRI*, el inserto obtenido debe contener sólo uno de los extremos del transposón unido al ADN del rizobio mutado. La presencia de secuencias del transposón en el plásmido obtenido fue confirmada en una primera instancia por PCR empleando cebadores específicos para amplificar un fragmento de 1187 pb de las secuencias de inserción IS50. El secuenciamiento parcial de dicho clon fue realizado según se indica a continuación. Partiendo desde el extremo de la secuencia de inserción IS50 se secuenció una parte de esta y la región de ADN del rizobio contigua a la misma (sitio de transposición). El secuenciamiento fue extendido aproximadamente 3,5 kb sobre una de las hebras de ADN empleando cebadores específicos diseñados cada aproximadamente 300-400 pb (*primer walking*). La secuencia de ADN obtenida fue compaginada y depositada en el GenBank

bajo el número de acceso AF350436. La misma fue analizada en paralelo para determinar el tipo y número de marcos de lectura abiertos (ORFs) potencialmente presentes. Mediante el uso del programa ORF finder y el análisis de potenciales sitios de inicio de la traducción y de unión a ribosomas hemos podido asignar la estructura de ORFs que se presenta en la Figura VII.4.A.. Comparada contra las secuencias de Genbank, mostró porcentajes de identidad muy significativos con proteínas del catabolón de la fenilacetil-Coenzima-A (PhAc-CoA) presente en *E. coli*, *Pseudomonas putida*, y *Azoarcus evansii* entre otros organismos. Dicha ruta catabólica constituye la etapa final de la degradación de diferentes compuestos aromáticos estructuralmente relacionados como el ácido fenilacético (PhAc), la feniletilamina, el etilbenceno, el estireno, el ácido trópico, el ácido *trans*-estirilacético, y en general ácidos *n*-fenilalcanoicos (*n*-PhAs) con número impar de átomos de carbono.



En la Tabla VII.1. se presentan las principales características de los genes identificados en las cercanías de la inserción Tn5B20 del mutante *S. meliloti* LPU641, y sus relaciones con los genes *paa* / *pha* de las bacterias mencionadas precedentemente.

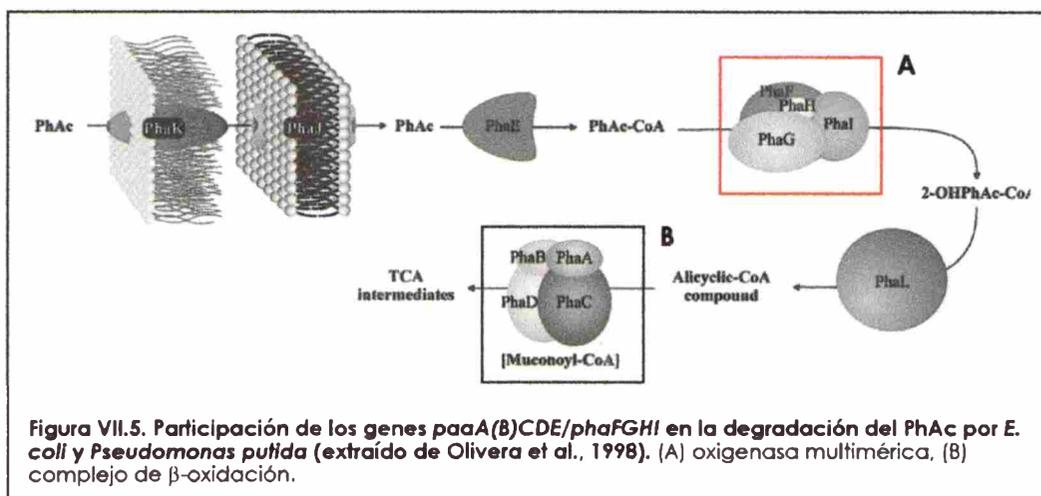
Tabla VII.1. Denominación asignada al marco de lectura mutado en la cepa LPU641 ácido sensible. Marcos de lectura vecinos y sus similitudes con genes presentes en otros organismos.

Marco de lectura / denominación en <i>S. meliloti</i> (GenBank) ^a	Genes con similitud de secuencia reportados en otros organismos			
	Denominación	Organismo	Genbank (proteína)	% similitud en aa (% Identidad)
paaA (+3) (secuencia parcial disponible, interrupción Tn5 en LPU641)	<i>phaF</i> (329 aa)	<i>Pseudomonas putida</i>	AAC24334	81 (69)
	<i>paaA</i> (303 aa)	<i>Escherichia coli</i>	CAA69090	76 (63)
paaB (+1) 285 pb, PaaB 94 aa	<i>paaB</i> (95 aa)	<i>Escherichia coli</i>	P76078	80 (66)
	<i>pacF</i> (95 aa)	<i>Azoarcus evansii</i>	CAC10607	79 (63)
paaC (+3) 768 pb, PaaC 255 aa	<i>paaC</i> (248 aa)	<i>Escherichia coli</i>	P76079	59 (43)
	<i>paaC</i> (252 aa)	<i>Azoarcus evansii</i>	AAG28970	59 (46)
paaD (+3) 525 pb, PaaD 174 aa	<i>paaD</i> (167 aa)	<i>Escherichia coli</i>	P76080	60 (48)
	<i>paaD</i> (163 aa)	<i>Azoarcus evansii</i>	AAG29971	61 (52)
paaE (+1) 1077 pb, PaaE 358 aa	<i>paaE</i> (360aa)	<i>Azoarcus evansii</i>	AAG28972	61 (45)
	<i>phal</i> (311 aa)	<i>Pseudomonas putida</i>	AAC24337	67 (49)

a: números de acceso de las secuencias nucleotídicas en GenBank.

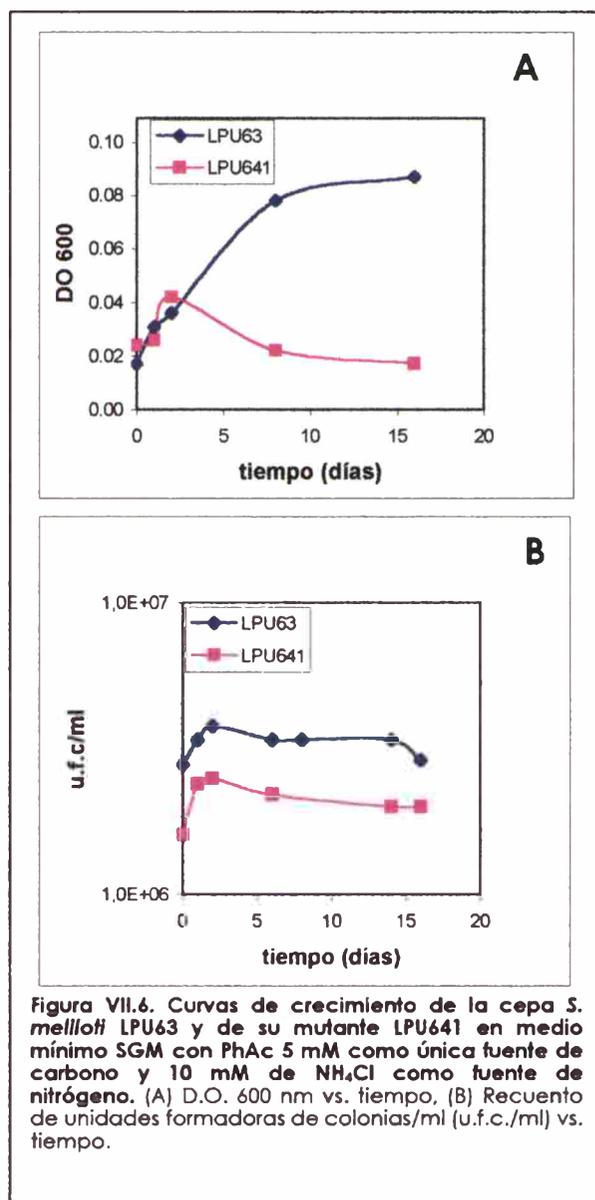
En el mutante LPU641 se ha interrumpido el gen *paaA*. Los genes homólogos de *E. coli* (*paaA*) y *Pseudomonas putida* (*phaF*) codifican para una de las subunidades de una oxigenasa multimérica responsable de generar el producto 2-OHPhAc-CoA (Fernández et al., 1998; Olivera et al., 1998). En la Figura VII.5. se muestra un diagrama en el que se indican las funciones propuestas para cada una de las proteínas asociadas a los genes *paa/pha* (Fernández et al., 1998; Olivera et al., 1998). Si se tiene en cuenta la organización transcripcio-nal de los genes *paaA(B)CDE* de *E. coli* y también de sus homólogos *phaFGHI* de *Pseudomonas putida* como parte de un mismo operón (Figura VII.4.B.), es posible que la mutación *paaA* presente en la cepa LPU641 tenga un carácter polar con pérdida de todos los componentes de la oxigenasa multimérica. Más aún, en *E. coli* la interrupción del gen *paaA* conduce a una mutación polar que afecta a todas las subunidades de la oxigenasa y también a las del complejo enzimático involucrado en los procesos posteriores de β -oxidación (ver Figuras VII.4.B., y VII.5.B). En *P. putida* la pérdida de enzimas de esta ruta conduce a la pérdida de la capacidad de crecer en medio mínimo con PhAc como única fuente de carbono. El crecimiento en esos ensayos ha sido evaluado a través de la capacidad de generar aumentos (muy leves) en la D.O del cultivo hasta alcanzar valores

constantes no mayores que 0,15 unidades (Olivera *et al.*, 1998). En ningún caso se evaluó la evolución del número de células del el

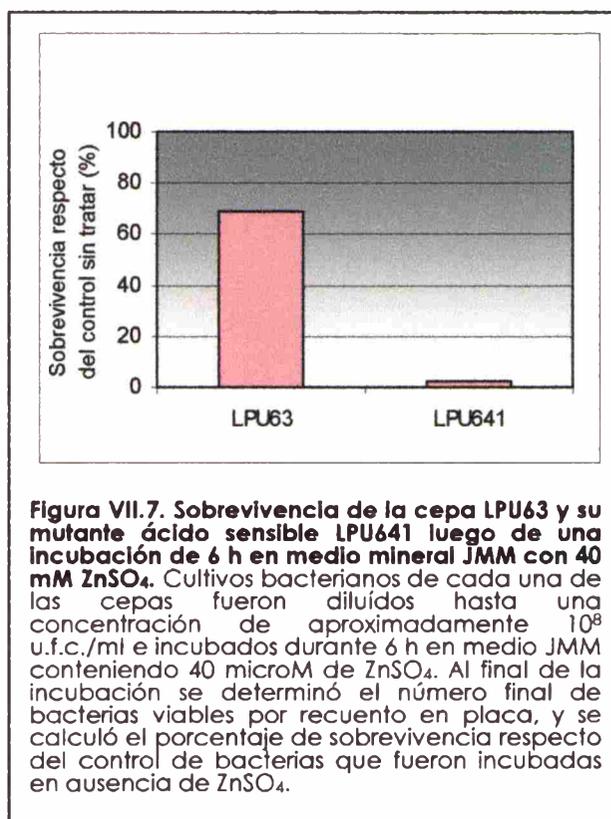


cultivo. Coincidente con esos resultados, en la Figura VII.6.A. se muestra cómo la cepa salvaje *S. meliloti* LPU63 es capaz de aumentar la D.O. 600 nm de cultivos en medio mínimo con PhAc como única fuente de carbono (curva azul), comportamiento que no fue observado en el caso del mutante *paaA S. meliloti* LPU641 (curva rosa). Si bien el pobre aumento de D.O. observado en los ensayos de la Figura VII.6.A. cuestiona seriamente el uso eficiente del PhAc como fuente de carbono, el mismo tipo de aumento de D.O. fue observado en cultivos de *P. putida* habiéndose verificado por métodos cromatográficos que la cepa efectivamente degrada el PhAc (García *et al.*, 1999). Aunque es claro que en la cepa salvaje *S. meliloti* LPU63 existe una actividad metabólica ausente en el mutante, de ninguna manera puede afirmarse que existe un crecimiento diferencial en favor de la cepa salvaje de acuerdo al recuento de células viables que se presenta en la parte B de la figura.

Como ocurre con el resto de los genes ya descritos en *S. meliloti* asociados a la tolerancia a la acidez, es también difícil en este caso determinar la conexión fisiológica precisa entre la pérdida de función del



catabolón del PhAc-CoA y los cambios de tolerancia al bajo pH que expresa la mutante *S. meliloti* LPU641. Sin embargo, a partir del análisis de los productos de los genes *paa* y de evidencias previas de la literatura pueden realizarse algunas consideraciones generales. El análisis de la secuencia de los productos Paa de *S. meliloti* mostró que la proteína PaaE posee un dominio homólogo a regiones de transmembrana presentes en reductasas de Fe³⁺ de levaduras (ej. proteína Frp1) y también con proteínas de fagocitos humanos como el citocromo B-245 que transfiere electrones al O₂ para generar aniones superóxido. Todas estas proteínas son potenciales miembros de una familia de flavocitocromos con capacidad de moverse a través de la membrana plasmática (familia Genbank-PF01794, representada por 47 miembros) (Roman *et al.*, 1993). Es interesante la evidencia de que, por ejemplo, la proteína Frp1 de *Sacharomices pombe* es requerida para la reducción superficial del hierro, habiéndose observado que mutantes en dicha proteína son deficientes en la incorporación de ese metal (Roman *et al.*, 1993). Debe considerarse que esa alteración puede estar compensada con el ingreso de otros cationes a la célula. Nuestro mutante *paaA* está alterado en un componente proteico del mismo complejo enzimático del que forma parte la proteína PaaE, pudiendo ocurrir además que la inserción Tn5B20 del mutante en el gen *paaA* tenga un efecto polar sobre el gen *paaE* como ocurre en *E. coli* y en *Pseudomonas putida*. Es muy posible que estas alteraciones modifiquen actividades de oxidorreducción a nivel de membrana, y como consecuencia de ello cambien las propiedades de permeabilidad a protones y otros cationes. En la proteína PaaE de *S. meliloti* hemos detectado la presencia de dominios de unión a clusters 2Fe-2S, y de unión a FAD/NADH común en familias de flavoproteínas citocromo-reductasas. Es probable que las alteraciones presentes en la cepa LPU641 deriven en cambios en el balance redox de la célula, y en su relación con el entorno iónico. En este sentido, ya se han reportado cambios en el intercambio y balance de iones en mutantes ácido sensibles de otros rizobios en los que el balance redox citoplasmático estaba posiblemente alterado (Ricciolo *et al.*, 2000, mutante en la enzima glutatión reductasa). Es muy probable que la alteración presente en la cepa LPU641 haya afectado actividades de la bacteria que no sólo están ligadas al catabolón de la PhAc-CoA sino también a otros procesos celulares importantes para el mantenimiento del equilibrio iónico intracelular. En apoyo de esta



posibilidad, hemos observado que el mutante LPU641 está severamente afectado en la tolerancia al efecto tóxico del catión Zn^{++} (Figura VII.7.). En acuerdo con este resultado y con los datos precedentes es muy posible que la mutación en genes *paa* facilite el ingreso de determinados cationes a la célula cuya penetración está naturalmente más restringida. Debe recordarse que una característica muy extendida de los mutantes *act* que han sido descritos en *S. meliloti*, es su marcada sensibilidad a la presencia de metales pesados en el medio extracelular (incluido el Cu^{++} y Zn^{++}). Será importante por tanto avanzar en la búsqueda de procesos centrales en los que existan alteraciones comunes a los aparentemente muy diferentes mutantes ácido sensibles que hasta hoy han sido caracterizados en *S. meliloti*. En favor de que posiblemente existan unas pocas alteraciones fisiológicas finales que definen el proceso de pérdida de la tolerancia a la acidez, está la observación precedente de que una proporción importante de los mutantes *act* son menos tolerantes a la presencia de metales pesados, a pesar de que sus mutaciones primarias tienen "aparentemente" poca relación funcional.

VII.2.3.2. Análisis del mutante *R.spp.* LPU833.

En el caso del mutante LPU833, la caracterización del sitio de inserción del transposición *Tn5B20* fue realizada por clonado de un fragmento de restricción *KpnI* de 22 kpb en el plásmido de bajo número de copias pLow1 (Hansen *et al.*, 1997) digerido con la misma enzima. Como en el caso anterior, las mezclas de digestión fueron ligadas y electroporadas en *E. coli* DH5 α . Previo al empleo del vector pLow1 se realizaron varios intentos sin éxito empleando el plásmido multicopia pUC18. Es posible que la falta de clones positivos con el vector pUC18 se haya debido al tamaño de más de 20 kb del inserto *KpnI* buscado. La estrategia empleada nos permitió realizar el secuenciamiento desde el *Tn5B20* en ambas direcciones, obteniendo las secuencias del ADN flanqueante del rizobio a ambos lados del transposón. El secuenciamiento fue realizado desde una de las IS50 y desde secuencias próximas al comienzo del gen *lacZ* en el extremo opuesto del *Tn5B20*. La secuencia obtenida en ambas direcciones fue compaginada en un único fragmento de aproximadamente 3,5 kb y analizada como hemos descrito en la sección anterior para identificar la presencia de marcos abiertos de lectura. En la Figura VII.8. se muestra la estructura génica propuesta que hemos deducido de los datos de secuencia.

Las características de cada uno de los ORFs y su similitud con otros genes depositadas en Genbank se presentan en la Tabla VII.2. En la Figura VII.8. e puede observar que el *Tn5B20* se ha insertado muy cerca del extremo 3' del marco de lectura o que hemos designado ORF1. En relación a este ORF, hemos detectado una buena similitud de secuencia entre su producto de traducción y una proteína de función aun desconocida de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 cuyo genoma completo ya ha sido secuenciado.

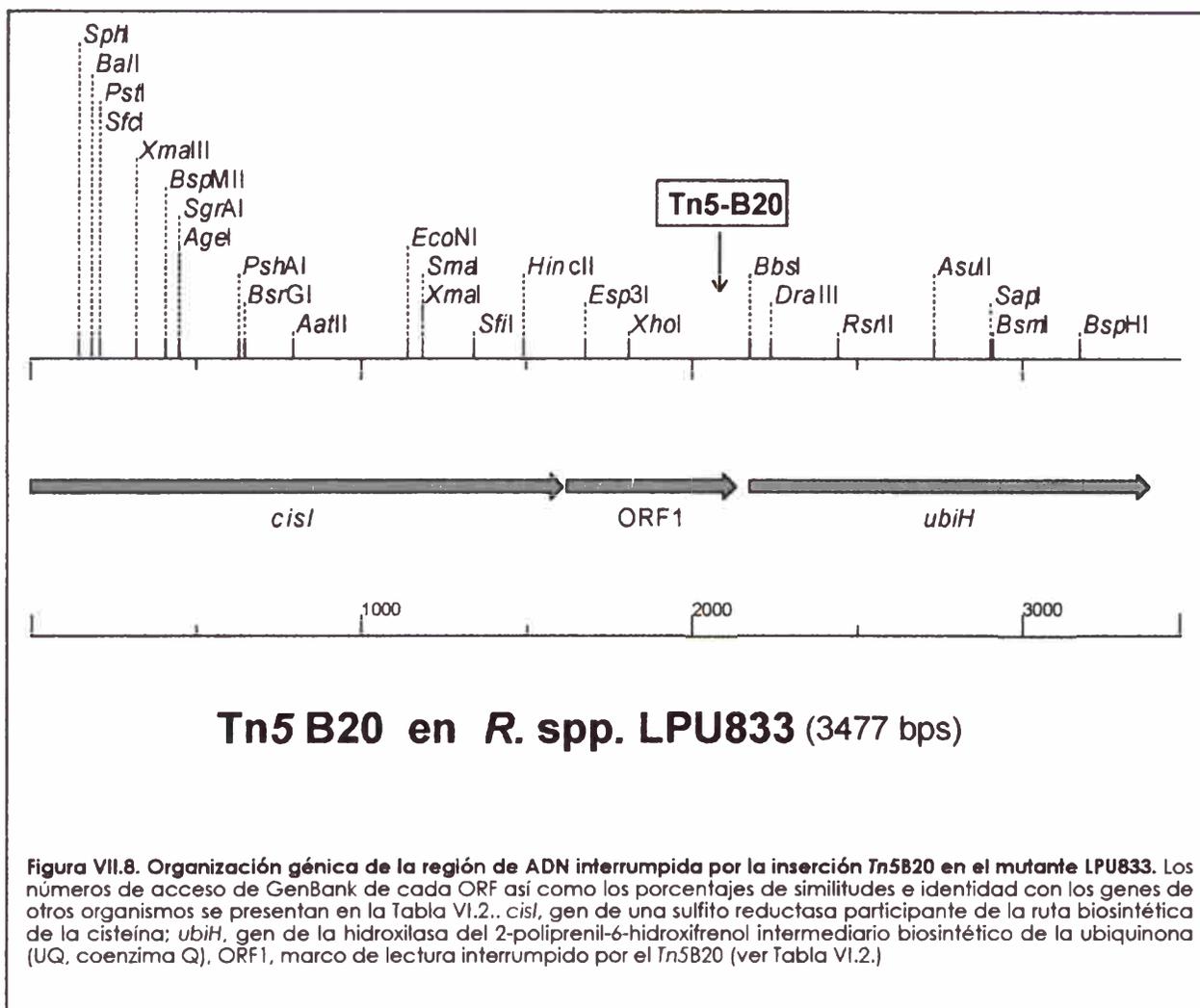


Tabla VII.2. Denominación asignada al marco de lectura mutado en la cepa LPU833 ácido sensible. Marcos de lectura vecinos y similitudes con otros organismos.

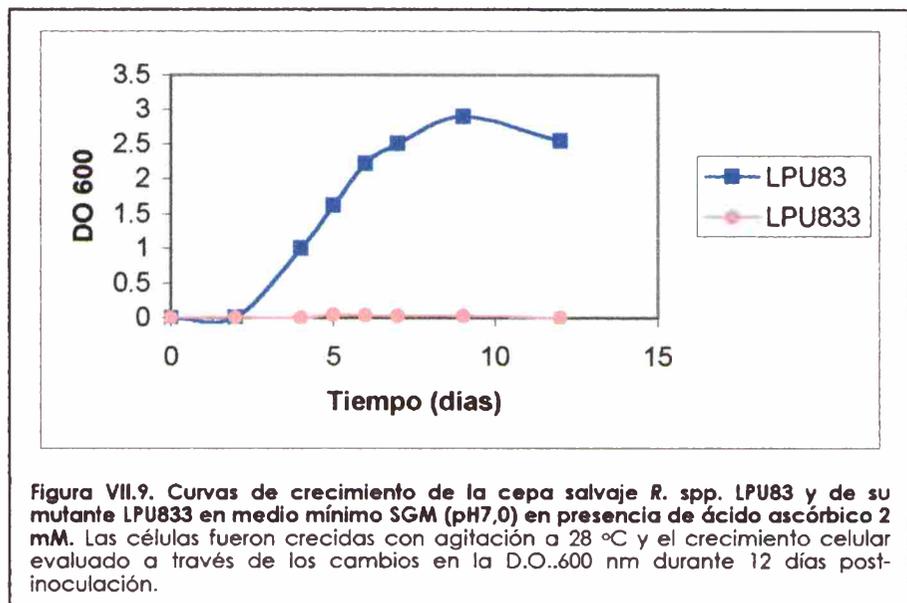
Marco de lectura / denominación en <i>S. meliloti</i> ^a	Genes con similitud de secuencia reportados en otros organismos			
	Denominación	Organismo	Genbank ^a	% Similitud (Identidad) -
<i>cysI</i> (secuencia parcial disponible)	<i>CysI</i>	<i>Escherichia coli</i>	AAF87215	sulfito reductasa síntesis de cisteína
ORF1 (secuencia interrumpida por Tn5 en <i>R. spp.</i> LPU833)	<i>Ubi?</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	AA607516	biosíntesis UQ?
<i>ubiH</i> 1209pb, UbiH 403 aa	<i>UbiH</i>	<i>Escherichia coli</i>	AAF27309	2-octaprenil-6-metoxifenol hidroxilasa Biosíntesis UQ

^a: La secuencias no han sido aun depositadas en el GenBank.

Además, hemos podido detectar una similitud parcial de secuencia con una proteína de *Thermotoga maritima* MSB8 perteneciente a una superfamilia de NADH deshidrogenasas - ubiquinona. Esta relación una proteína posiblemente involucrada en el metabolismo de ubiquinona se corresponde con la presencia río abajo (*downstream*) del ORF1 de un gen homólogo del gen *ubiH* de *E. coli*. Este gen codifica para la síntesis de una hidroxilasa del 2-octaprenil-6-metoxifenol, enzima que cataliza la sexta etapa en la vía de biosíntesis de ubiquinona (UQ) desde el precursor corismato (Søballe y Poole, 1999) por la vía aeróbica de biosíntesis. Dicha ruta de biosíntesis requiere oxígeno, monooxigenasas unidas a flavina y NADH. Sin embargo, en *E. coli* existe una vía alternativa que opera en anaerobiosis y emplea otras tres hidroxilasas y átomos de oxígeno que provienen del agua (Alexander y Young, 1978; Meganathan, 1996). No se conoce hasta el momento en *Rhizobium* cuál es la estructura de la ruta biosintética de la UQ, y si existe más de un camino alternativo. Dado el requerimiento obligado de oxígeno por parte de los rizobios, no debería ser viable un bloqueo completo de la producción de UQ. Tengase en cuenta que es muy posible que los rizobios no posean menaquinona por ser esta una quinona característica de organismos anaerobios estrictos o facultativos. En el caso particular del mutante LPU833, la interrupción del ORF1 ha producido un cambio fenotípico evidente en el comportamiento de la bacteria según hemos visto en el análisis de las cinéticas de crecimiento (Figura VII.3.). En base a los datos de secuencia que hemos obtenido es muy probable que las alteraciones del mutante deriven de cambios primarios que tienen alguna conexión con la ruta biosintética de UQ. Existe la tendencia a considerar al *pool* de quinonas como un mero grupo de transportadores de equivalentes de reducción entre complejos proteicos de membrana. Esta idea deriva posiblemente del espectacular avance en la caracterización molecular de los complejos proteicos de transporte de electrones. Sin embargo, resulta hoy clara la participación de las quinonas en mecanismos de defensa contra el estrés oxidativo (la UQH₂ previene por ejemplo la iniciación y propagación de la peroxidación de lípidos de membrana), y posiblemente también en eventos de regulación génica (Søballe y Poole, 1999). Las propiedades antioxidantes de la UQ están asociadas a su presencia en altas concentraciones y en el estado reducido. Para ello, en *E. coli* ya se ha descrito la presencia de una proteína Qor (quinona-oxidoreductasa) soluble y complejada con NADPH posiblemente encargada de la mantención de un *pool* de quinonas en su estado reducido. El nivel de quinonas de membrana y su estado de oxidación-reducción está así íntimamente relacionado con el estrés oxidativo de la célula, y derivado de ello con la actividad de múltiples procesos celulares. En relación al estado redox intracelular y la capacidad de la célula para soportar situaciones de estrés, ya hemos comentado en la sección anterior que alteraciones en la síntesis de glutatión en *R. tropici* resultan en cambios drásticos en la tolerancia de la bacteria al bajo pH y también al estrés oxidativo (Riccillo *et al.*, 2000). En relación a la participación de las quinonas en fenómenos de tolerancia a situaciones particulares de estrés, recientemente se ha descrito el fenotipo pleiotrópico de mutantes *ubiCA* en los que se observó un aumento de la tolerancia a la temperatura por ejemplo. Es interesante

que esos mismos mutantes son más resistentes además a los compuestos fleomicina y ácido linoleico (Søballe y Poole, 1999). Todas estas características denotan posibles cambios estructurales en la membrana que resultan finalmente en alteraciones en la permeabilidad de la misma. No debe descartarse que cambios de este tipo puedan ser responsables del comportamiento alterado frente al bajo pH del mutante LPU833. Nuevamente surge la pregunta sobre cómo las posibles deficiencias de mutante alterados en la síntesis de UQ pueden derivar en cambios funcionales (posiblemente asociados a membrana) como los observados en los mutantes *ubi*. A ese respecto, el análisis de los mutantes *ubiCA* que hemos mencionado mostró también que los mismos eran muy sensibles a la acción del agente reductor ditiotreitolo, posiblemente como consecuencia de la incapacidad de la cadena respiratoria alterada para mantener el balance redox en el periplasma (Søballe y Poole, 1999). Tal observación pone de manifiesto la activa participación de las quinonas y de los componentes de su ruta biosintética en procesos celulares que van más allá del transporte de electrones vinculado sólo a procesos energéticos durante la respiración. En ese marco, es muy posible que el desequilibrio redox sea uno de las causas primarias de las disfunciones que derivan en una mayor sensibilidad a la acidez. Para investigar como era el comportamiento del mutante LPU833 frente a la presencia de compuestos reductores en el medio extracelular, analizamos su capacidad de crecer en presencia de ascorbato de sodio 2mM en medio mínimo SGM. Los resultados de la Figura VII.9. muestran que la cepa LPU833 es muy sensible a la presencia del agente reductor en el medio, comportamiento que no se observó en la cepa salvaje. Deberá

evaluarse en una próxima instancia si en efecto el mutante LPU833 está afectado en la síntesis de quinonas y en que extensión, y en segundo término cómo es el mecanismo que opera para hacer ineficiente el mantenimiento del equilibrio ácido-base intracelular.



En la sección siguiente analizaremos cuál es el comportamiento simbiótico de los mutante *S. meliloti* LPU641 y *R. spp.* LPU833 a pH neutro y pH ácido en ensayos de laboratorio, para evaluar si la disminución de ácido tolerancia observada en cada uno de ellos redundo en cambios apreciables de su capacidad de asociarse con alfalfa.

VII.2.4. Evaluación de la competitividad para la nodulación de los rizobios ácido-sensibles LPU641 y LPU833 en medio hidropónico a diferentes pHs.

De la misma forma en que ya ha sido descrito en el Cap. VI, hemos analizado la capacidad de los mutantes *Tn5* para nodular plantas de alfalfa. Los ensayos fueron llevados a cabo en bolsas plásticas según se describe en Materiales y Métodos, sección II.20.. Tanto el mutante LPU641 como el LPU833 fueron capaces de desarrollar nódulos en las raíces de las plantas alfalfa.

En una segunda instancia, para investigar si las mutaciones presentes en las cepas LPU641 y LPU833 afectan la eficiencia de alguna de las etapas de la simbiosis, hemos analizado la competitividad de cada una de estas cepas respecto de sus correspondientes rizobios salvajes. Los ensayos de competición fueron realizados a pH 7,0 y 5,6. Para identificar a cada uno de los rizobios que se recuperan de los nódulos, hemos plaqueado las bacterias extraídas de los nódulos en medio con y sin neomicina (solo las cepas que poseen el *Tn5* pueden crecer en presencia de antibiótico). Las cepas mutantes fueron coinoculadas con su respectivo rizobio salvaje en una relación de número 1:1. A los 40 días post-inoculación se cortaron los nódulos de la raíz principal, se esterilizaron en superficie, y se analizó el tipo de bacterias contenidas en su interior de acuerdo a los patrones de resistencia a antibióticos que hemos detallado. En la Tabla VII.3. se presentan los porcentajes relativos de ocupación para cada uno de los ensayos de coinoculación. Se observó que la cepa LPU83 desplaza por completo a la LPU833 independientemente del pH del medio en que fue realizado el ensayo. La cepa LPU63, por su parte, desplaza completamente al mutante LPU641 a pH 5,6 y en forma muy significativa en la condición neutra.

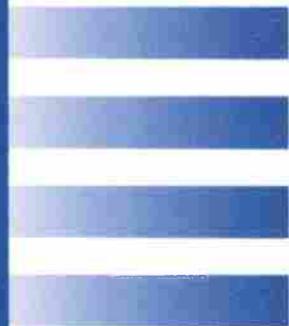
Tabla VII.3. Ensayo de competitividad a pH neutro y a pH 5,6 en los que se inocularon pares de bacterias isogénicas.

Inóculo	Ocupación	pH 7,0	PH 5,6
LPU63+LPU641	LPU63	88%	100%
	LPU641	12%	0%
LPU83+LPU833	LPU83	100%	100%
	LPU833	0%	0%

Los resultados muestran claras dificultades de ambos mutantes para competir por la ocupación de los nódulos. El hecho de que la cepa LPU641 está más alterada en la condición ácida refleja que al menos parte de su deficiencia se debe a etapas de la preinfección. Cabe recordar que ya ha sido reportado previamente que un mutante ácido sensible de otro rizobio, *R. tropici*, fue altamente defectivo en su competitividad frente a su cepa salvaje (Riccillo *et al.*, 2000). No debe descartarse que esta característica que ya ha sido observada en diferentes mutantes ácido sensibles pueda deberse a la incapacidad de los mismos para mantener el pH intracelular.

La posibilidad de contar con cepas isogénicas alteradas en su tolerancia a la acidez, será una herramienta importante para investigar cuáles son las consecuencias de la alteración de ese carácter sobre la persistencia de los rizobios en muestras de suelo ácido.

**DISCUSION
GENERAL y
CONCLUSIONES
FINALES**



DISCUSIÓN GENERAL.

¿Por qué hemos estudiado los efectos de la acidez sobre la simbiosis de rizobios con alfalfa?

Las simbiosis fijadoras de nitrógeno que se establecen entre rizobios y plantas leguminosas han sido descubiertas desde hace ya más de un siglo, y desde entonces su uso práctico ha atraído mucha atención por el potencial de las mismas para introducir nitrógeno a suelos de cultivo. Aunque muchas veces el establecimiento de la simbiosis y la producción de los cultivos es aceptable, existen situaciones en las que distintos factores edáficos y climáticos pueden perturbar muy seriamente el crecimiento de la planta y el proceso mismo de asociación con rizobios eficientes. Como consecuencia de ello se producen importantes reducciones en las tasas fijación de nitrógeno, en la producción y persistencia de los cultivos, y más a largo plazo en la conservación de la fertilidad nitrogenada del suelo. Un ejemplo paradigmático de este tipo de situaciones es el cultivo de alfalfa en condiciones de acidez.

En este trabajo de tesis he centrado la atención en el análisis de aspectos básicos de la simbiosis en acidez entre rizobios y alfalfa. La simbiosis a bajo pH ha sido estudiada desde larga data en diferentes laboratorios, impulsado probablemente por el hecho de que la acidez es una característica que afecta un área importante de los suelos cultivables del planeta (Von Uexküll y Mutert, 1995). Sin embargo, recién en los últimos años se ha comenzado a analizar con herramientas moleculares el efecto de la acidez sobre la interacción rizobio-leguminosa. En ese contexto, la asociación entre *S. meliloti* y alfalfa ha sido particularmente la más estudiada. (Glenn y Dilworth, 1994). La información disponible muestra que los efectos de la acidez sobre la simbiosis son variados y complejos, afectando a la bacteria, a la planta, y también al modo en que tiene lugar el diálogo simbiótico entre ambos. De todos estos factores, la muy escasa ácido tolerancia de *S. meliloti* aparece como uno de los factores que más condicionan el éxito de la simbiosis a bajo pH. Por ello, el mejoramiento de la asociación de alfalfa con rizobios en acidez, está fuertemente condicionado a la disponibilidad de mejores cepas que resulten metabólicamente y simbióticamente más activas a bajo pH.

La base sobre la que he desarrollado este trabajo de tesis ha sido la caracterización de las poblaciones de rizobios presentes en suelos ácidos de centro Argentina cultivados con alfalfa, el análisis de su interacción con la planta, y la identificación de nuevos marcadores genéticos de ácido tolerancia.

¿Cuáles son las características de las poblaciones de rizobios presentes en los suelos ácidos locales?

En el Capítulo III he presentado la construcción de una colección de más de 350 rizobios noduladores de alfalfa recuperados de suelos ácidos de la zona central de Argentina, mayoritariamente de la Pampa Ondulada. El muestreo de dichos suelos mostró que más del 40% de los mismos tenían pHs inferiores a 6,0. El análisis inicial de la colección mostró la presencia de esencialmente dos tipos de rizobios: un grupo mayoritario constituido por aislamientos sensibles a la acidez (SA) o con tolerancia muy moderada

(TMA), y otro grupo representado por rizobios mucho más resistentes que denominamos TA (Capítulo III, sección 2.2.). La población de rizobios SA y TMA mostró estar numéricamente mucho más representada (95%) que la de los rizobios TA (5%). Estudios de caracterización molecular de los dos grupos de aislamientos demostraron que mientras los rizobios de tolerancia más moderada pertenecen a la especie *S. meliloti*, los rizobios TA están estrechamente relacionados con la cepa *R. spp. Or191* aislada en Oregon-USA y cuya especie no ha sido aún asignada. Un aspecto distintivo de las cepas TA, incluido el aislamiento Or191 (que también fue recuperado de un suelo ácido), es la escasa diversidad fenotípica y genotípica que existe entre los diferentes aislamientos (Capítulo IV). Como hemos discutido en esta tesis, no resulta fácil atribuir a un único factor esta característica de los rizobios TA. Su escasa diversidad podría estar reflejando el transcurso de un período corto de tiempo desde el arribo de quizás unos pocos representantes TA a los suelos ácidos locales. Es también posible que los rizobios TA tengan una limitada tasa de incorporación de material genético desde otros rizobios y bacterias del suelo. No tenemos hoy evidencia concreta en apoyo de ninguna de estas posibilidades. Es interesante destacar que rizobios TA similares a los presentes en nuestros suelos fueron hallados también en suelos de Uruguay con bajo pH (Capítulo IV, Tabla IV.2.) sugiriendo que este tipo de bacterias podrían ser miembros ubicuos de los suelos ácidos. En efecto, la presencia de estos rizobios en suelos con bajo pH puede estar favorecida por su destacada tolerancia a la acidez. Por otra parte, los resultados mostraron que la simbiosis de los rizobios TA es muy activa en condiciones de acidez moderada. Por todas estas razones, uno de los puntos más relevantes en relación a los rizobios TA es si su número ya se ha estabilizado dentro de las poblaciones locales o si los mismos se encuentran en fase de crecimiento respecto del otro simbionte de alfalfa, *S. meliloti*. Los resultados que hemos obtenido muestran a las cepas TA como potencialmente riesgosos para el agroecosistema dada su ineficiencia para fijar nitrógeno, y su elevada competitividad frente a aislamientos de *S. meliloti* el simbionte de alfalfa fijador de nitrógeno (Capítulo VI, sección 2.3.). Los rizobios TA nodulan mejor y son más infectivos en acidez, condición en la que *S. meliloti* está seriamente afectado en su viabilidad y capacidad de interacción con la planta. Además, los rizobios TA desarrollan una nodulación sostenida que escapa a los controles de autoregulación previamente descritos para la nodulación de leguminosas (Caetano Anollés y Gresshoff, 1991b). A partir de estas evidencias será importante evaluar si el comportamiento de estos rizobios a campo refleja la misma tendencia que hemos observado en el laboratorio. Si así fuese, deberá controlarse cómo es la evolución de la población de rizobios TA en suelos ácidos de cultivo. Ya existen reportes en la literatura en los que se hace mención a que en suelos ácidos de larga data existe un predominio de cepas ácido tolerantes e ineficientes para la fijación de nitrógeno en alfalfa. (Barber, 1980). Lamentablemente, dichos trabajos no son recientes como para evaluar si las cepas dominantes a que se hace mención eran de *S. meliloti*, o TA del tipo Or191.

A pesar de la abundante nodulación de los rizobios TA y de la ventaja que ello representa en la competición por el nicho simbiótico, una observación que ha sido muy

frecuente es que son muy pocas las bacterias que se recuperan del interior de los nódulos. Tal característica pone en evidencia que la asociación con alfalfa es deficitaria, estando posiblemente limitada en etapas de la infección. Durante las etapas previas más tempranas, los FN sintetizados por los rizobios TA han mostrado ser eficiente en inducir muy activamente la diferenciación de nódulos radiculares. En razón de la baja promiscuidad de alfalfa como planta hospedadora, resultó de particular interés explorar cómo los rizobios TA generan señales activas sobre esta leguminosa. En este trabajo he demostrado que los dichos rizobios son portadores de una copia de un gen análogo a la sulfotransferasa NodH de *S. meliloti*. El estricto requerimiento de alfalfa por factores de nodulación de *S. meliloti* sulfatados por un lado, y la evidencia de que el gen *nodH* de la cepa TA LPU83 es capaz de complementar mutantes *nodH* de *S. meliloti* por el otro; sugieren fuertemente que las cepas TA también sintetizan FN sulfatados. Esta presunción deberá ser confirmada mediante ensayos de marcación de los FN con ³⁵S-sulfato para lo que previamente deberá intentarse la sobre-expresión de genes *nod* para aumentar la síntesis de FN como ha sido realizado para el análisis de las moléculas señal en *S. meliloti*. Aunque hemos intentado repetidas veces la mutagénesis del gen *nodH* de la cepa LPU83 por integración sitio-específica de un plásmido suicida, nunca hemos podido obtener la cepa mutante. La misma será necesaria para verificar si en efecto *nodH* participa en la sulfatación de los FN en las cepas TA, y para investigar si en el mutante modifica su capacidad de nodular alfalfa y/o su rango extendido de hospedadores. Es interesante que el análisis de una secuencia parcial de la proteína NodH del rizobio LPU83 (que nodula alfalfa y *P. vulgaris*) posiciona a la misma en una ubicación intermedia respecto de sus proteínas homólogas de *S. meliloti* (que nodula alfalfa) y *R. tropici* (que nodula *P. vulgaris*). El análisis de una región más extendida del *cluster nod* de estos rizobios se espera permitirá obtener nueva evidencia sobre el origen de las funciones de nodulación de los rizobios TA.

Cepas de *S. meliloti* eficientes en acidez - ácido tolerancia - marcadores act.

A partir de los comentarios precedentes son varias las acciones posibles para mejorar las deficiencias del cultivo de alfalfa en los suelos ácidos. Por lo pronto será prudente a la evolución de la población de rizobios TA en los suelos de cultivo. Al mismo tiempo será importante estimular el manejo sustentable de los cultivos de alfalfa incluyendo prácticas de inoculación que limiten la degradación de los suelos y eviten una mayor acidificación que favorezca el establecimiento de los rizobios TA ineficientes. Será importante entonces disponer de cepas de *S. meliloti* que sean ácido tolerantes y competitivas en acidez frente a las cepas ineficientes. En este trabajo hemos puesto en evidencia las muy buenas características simbióticas de la cepa TMA *S. meliloti* LPU63. Dicha cepa ha sido aislada de un suelo ácido, y como hemos visto tiene un muy buen desempeño tanto en acidez moderada como en condiciones de neutralidad. No se trata de una cepa cuya infectividad y competitividad sólo se manifiesta de manera particular en acidez. Esta observación sugiere que la expresión de una simbiosis eficiente en acidez no es incompatible con un comportamiento similar de la misma cepa a pH neutro. En términos moleculares ello sugiere que los componentes celulares y señales involucradas son

eficientes en ambas situaciones. Desde el punto de vista práctico esta observación es valiosa, dado que refuerza la posibilidad de que una misma cepa pueda ser empleada como inoculante para suelos neutros y suelos ácidos. Los resultados que hemos presentado en el desarrollo del Capítulo VI justifican la evaluación cuidadosa de la cepa LPU63 en condiciones de campo en suelos ácidos y neutros, y en presencia y ausencia de poblaciones naturalizadas de rizobios.

Si bien como hemos visto una cepa eficiente en su simbiosis en acidez puede ser útil para la inoculación a pH neutro, la ácido tolerancia será siempre un carácter deseable en particular para las cepas inoculantes de suelos ácidos. Claramente, una cepa que sea activa en su simbiosis con alfalfa en condiciones de acidez deberá tener un grado destacado de tolerancia para mantener metabólicamente activas las funciones simbióticas a bajo pH. Es esperable que la mejora de este carácter beneficie notablemente no solo la simbiosis, sino también la persistencia en la condición de vida libre respecto de otros rizobios más sensibles. Para la obtención de cepas más tolerantes existen al menos dos estrategias complementarias. Una de ellas es la selección de nuevos rizobios salvajes que, siendo simbióticamente activos a bajo pH, expresen una buena ácido tolerancia. Esta es la estrategia que hemos usado en este trabajo y nos ha permitido seleccionar el aislamiento LPU63. Pensando en el mediano plazo, podrá intentarse además la eventual manipulación genética de las cepas anteriores para exacerbar sus características de ácido tolerancia. Según hemos comentado oportunamente, el carácter multigénico y la complejidad de este fenotipo requiere hoy de mayor información y conocimiento básico sobre los mecanismos generales mediante los que la célula regula su pH interno y su relación iónica con el entorno. En el Capítulo VII hemos caracterizado el germoplasma de las cepas LPU63 (TMA) y LPU83 (TA) y avanzado en la identificación de nuevos marcadores genéticos involucrados en la determinación de la ácido tolerancia. Los resultados de ese análisis nos ha permitido reconocer varios mutantes *Tn5* que resultaron más ácido sensibles que sus correspondientes cepas salvajes, sin cambios apreciables del crecimiento a pH neutro. Dos de esos mutantes, LPU641 y LPU833, fueron caracterizados en detalle para identificar los genes afectados. Uno de ellos resultó alterado en un gen del catabolón de la fenilacetil-CoA (PhAc-CoA), mientras que en el otro el *Tn5* interrumpió un marco de lectura que tiene relación de secuencia con genes de una superfamilia de oxidorreductasas y que precede con la misma orientación al gen *ubiH* (síntesis de UQ). Hemos observado asimismo que este último mutante tiene una muy marcada sensibilidad a los ambientes reductores como ocurre con mutantes de *E. coli* que están alterados en la síntesis de quinonas. Según hemos discutido, en los dos mutantes que hemos estudiado, LPU641 y LPU833, es muy posible que se haya generado un desbalance redox, y como consecuencia de ello un cambio en la permeabilidad iónica en general y en el balance de protones en particular. De acuerdo a este modelo, en el mutante *paaA* (del catabolón de la PhAc-CoA) hemos observado una mucho mayor sensibilidad al catión Zn^{++} . En otros organismos ya se ha reportado que alteraciones en proteínas de la misma familia han generado cambios severos en la permeabilidad a formas iónicas de Fe

por ejemplo. La sensibilidad a metales pesados del mutante *paαA* se encuadra además en la observación previa de que varios de los mutantes *act* tienen una sensibilidad exacerbada a la presencia de metales pesados como Cu^{++} y Zn^{++} (conferencia Prof. M. Dilworth, UNLP año 2000). Esta característica de varios de los mutantes *act* refuerza la idea de que a pesar de la aparente diversidad de mutaciones "no relacionadas", es posible que todas ellas converjan en unos pocos mecanismos (de membrana) involucrados en procesos generales de mantenimiento del balance iónico celular. La búsqueda e identificación de tales funciones será una de las claves para posibilitar la manipulación racional de la ácido tolerancia con fines aplicados por métodos recombinantes.

CONCLUSIONES FINALES.

- El relevamiento y análisis de suelos ácidos locales ha permitido identificar y caracterizar dos poblaciones de rizobios noduladores de alfalfa bien diferenciadas, una constituida por aislamientos de *S. meliloti* y otra por rizobios relacionados con la cepa tolerante a la acidez, *R. spp.* Or191.
- Mientras la biodiversidad de los rizobios SA y TMA es fácilmente puesta en evidencia por diferentes métodos de análisis, los rizobios TA se caracterizan por una muy limitada diversidad feno- y genotípica. Tal propiedad puede estar ligada a una menor dinámica del genoma de estas bacterias, o bien al reciente arribo de unos pocos representantes TA a los suelos de donde estos rizobios han sido aislados. Hasta el momento la procedencia de las cepas TA es incierta.
- El análisis de los rizobios relacionados con la cepa Or191 reveló que los mismos son marcadamente ácido tolerantes (TA), muy infectivos y competitivos en acidez, pero ineficientes para fijar nitrógeno en asociación con alfalfa. Llamativamente, la capacidad simbiótica de estos rizobios se manifiesta más activamente en acidez que en neutralidad en contraposición a lo que ocurre con *S. meliloti*, el simbiote de alfalfa fijador de nitrógeno. Estas características presentan a los rizobios TA como un factor biótico de riesgo potencial contra del establecimiento de asociaciones simbióticas eficientes.
- Entre los aislamientos de *S. meliloti* locales hemos podido identificar una cepa, LPU63, moderadamente resistente a la acidez y con características muy destacadas de infectividad, competitividad, y fijación de nitrógeno en condiciones neutras y moderadamente ácidas. Dicha cepa resultó además muy competitiva frente a rizobios TA a bajo pH, hecho que la posiciona como un rizobio de elección para su evaluación futura en condiciones de campo y en acidez. Asimismo, el hecho de que la presencia de la planta haya mejorado la persistencia de todos los rizobios que hemos analizado en condiciones de suelo ácido en ensayos de microcosmos, sugiere que las prácticas

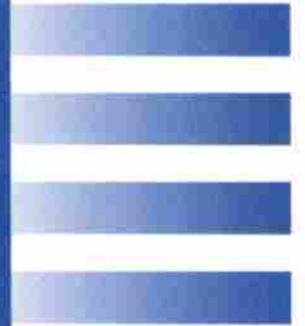
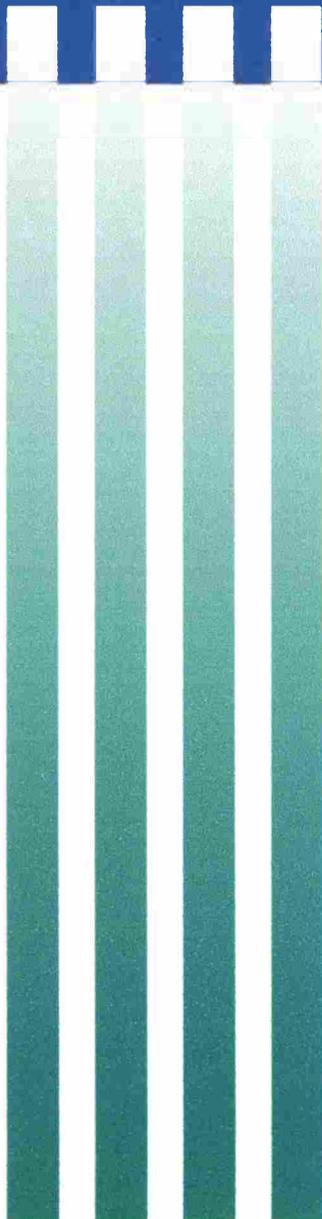
de cultivo no deben ser interrumpidas para contribuir a la preservación de las poblaciones naturalizadas de rizobios en los suelos ácidos. Desde el punto de vista práctico, podrá ensayarse en forma inmediata la evaluación a campo en acidez de la cepa LPU63 empleando técnicas usuales de inoculación de semillas

- La mutagénesis *Tn5* de cepas de *S. meliloti* y rizobios TA seguido de una cuidadosa selección de los fenotipos más ácido sensibles, nos ha permitido identificar nuevos determinantes genéticos de ácido tolerancia. El análisis de los mismos sugiere que muy posiblemente las alteraciones fenotípicas observadas derivan de cambios que se expresan finalmente a nivel de la membrana (los rizobios expresan cambios en su sensibilidad a metales como Zn^{++} , y son menos tolerantes a modificaciones en el potencial redox del medio extracelular, por ejemplo). Los resultados disponibles no descartan que las consecuencias fenotípicas de las diferentes mutaciones *act* hoy descritas, sean el resultado de la perturbación final de unos pocos mecanismos asociados a la conservación la homeostasis ácido base (y iónica en general) de los rizobios. En esa dirección deberá avanzarse en el análisis de las alteraciones bioquímicas precisas que resultan de las mutaciones que hemos generado.

Los resultados presentados han aportado nueva evidencia sobre las características simbióticas, moleculares, y de ácido tolerancia de las poblaciones de rizobios noduladores de alfalfa que están presentes en suelos ácidos de la región central de Argentina. La información recogida podrá ser utilizada para el diseño de mejores estrategias de trabajo e inoculación que, sobre una base racional, contribuyan al mejoramiento de la producción de alfalfa y al mismo tiempo a la conservación de la fertilidad nitrogenada de los suelos ácidos.

ANEXO

Estudio de supervivencia de
rizobios en muestras de suelo
estéril en sistema de
microcosmo:
Efecto del pH y de la planta
huésped



Como hemos mencionado en esta tesis una de las estrategias para aumentar la producción de alfalfa en suelos con bajo pH ha sido la inoculación de los cultivos con rizobios eficientes y competitivos para la nodulación, y persistentes en condiciones de suelo ácido (Burton, 1972; Howieson, 1995a). La ácido tolerancia y la persistencia de los rizobios en suelo ácido ha sido una característica que ha servido para definir criterios de selección de *S. meliloti* y *S. medicae* para ser usados como inoculantes de *Medicago* spp. en suelos con bajo pH (Howieson et al., 1986; Howieson et al., 1988; Howieson, 1995a; Howieson, 1995b). En este Apéndice mostraré resultados referidos a las propiedades de supervivencia de rizobios noduladores de alfalfa en muestras de suelo estéril ácido y neutralizado, en presencia y en ausencia de la planta huésped (*Medicago sativa* var. CUF101). Los ensayos que presentaré fueron realizados con suelo proveniente del INTA Castelar (pH original 5,6) el cual fue esterilizado mediante la aplicación de radiación gama (Ionic, Bs. As.). La decisión de utilizar muestras de suelo estéril se originó en la intención de eliminar en una primera instancia la influencia de factores bióticos que pudieran enmascarar los efectos de la variable pH analizada.

Todos los estudios de supervivencia fueron realizados en sistema de microcosmos consistente en tubos de vidrio semi-abiertos, en los que las muestras de suelo se depositaron sobre el fondo poroso de los mismos. La humedad en el suelo fue mantenida a través de una mecha de algodón que permaneció en contacto con un recipiente con agua estéril. Los ensayos se llevaron a cabo en la condición ácida natural del suelo usado (pH 5,6), y en una condición cercana a la neutralidad que se logró por agregado de KOH hasta alcanzar un pH cercano a 6,8 (Materiales y Métodos, sección II.2.1.4.5.2.). En la Figura A.1. se muestran los tubos de microcosmos durante el desarrollo del ensayo en cámara de plantas (22°C y fotoperíodo de 16-8 h día-noche). Como cepas inoculantes hemos utilizado los siguientes rizobios: *S. meliloti* 2011 (Sm^r, Sp^r) (cepa de referencia), y las cepas *S. meliloti* LPU63 (Sm^r) (TMA) y R. sp. LPU83 (Sm^r) (TA, tipo Or191) ambas aisladas de suelos locales y estudiadas en detalle en esta tesis. Tubos de microcosmos previamente esterilizados conteniendo 30 g de suelo fueron inoculados con los rizobios anteriores. A la mitad de los tubos se les incorporó dos plantas de alfalfa para investigar el efecto de la misma sobre supervivencia de las bacterias inoculadas. Periódicamente se tomaron muestras de suelos para medir las poblaciones bacterianas por medio de recuento de colonias en medio de

Figura A.1. Ensayo de supervivencia de rizobios en sistema de microcosmos. (A) Tubos con plantas en distintos estadios de crecimiento. (B) Disposición de la serie completa de tubos en la cámara de plantas.

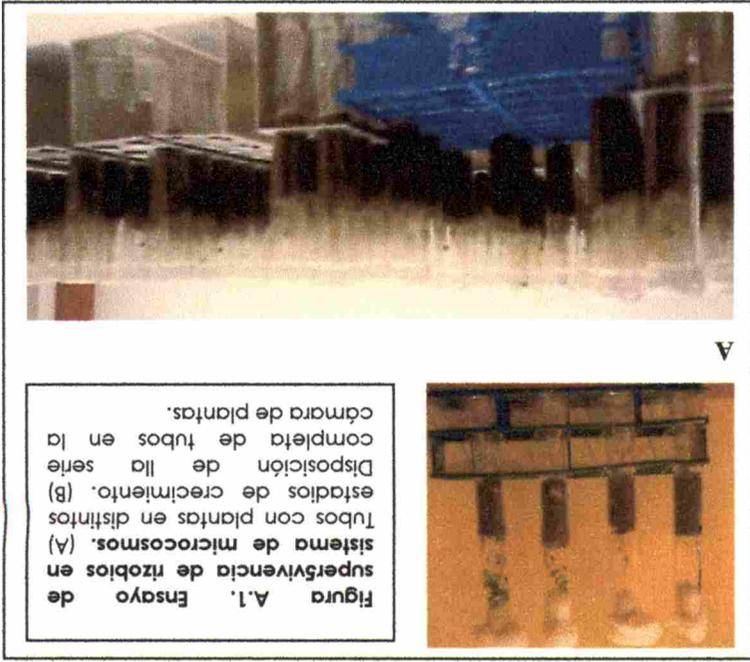
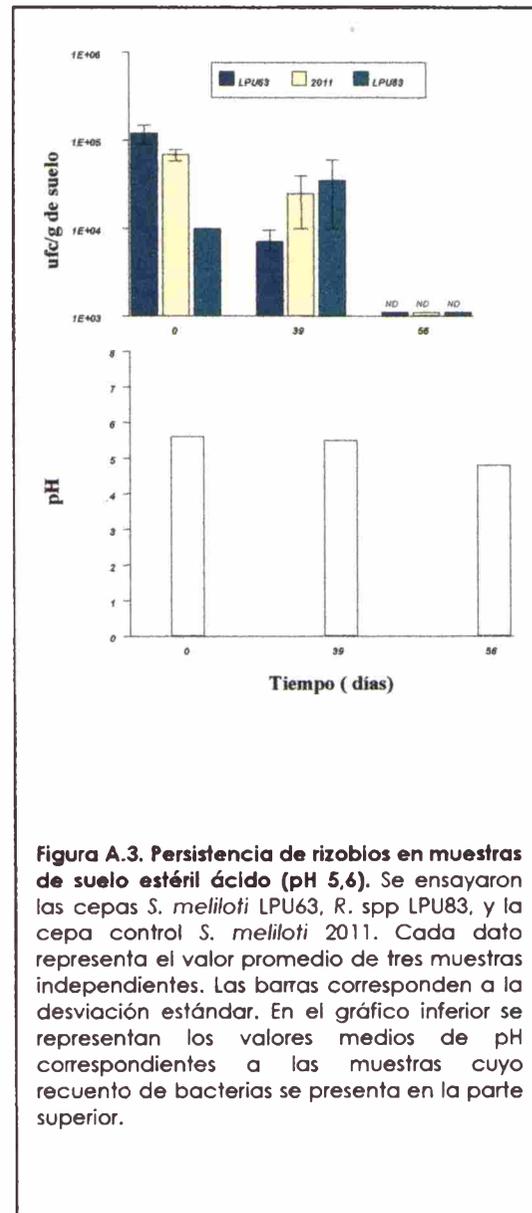
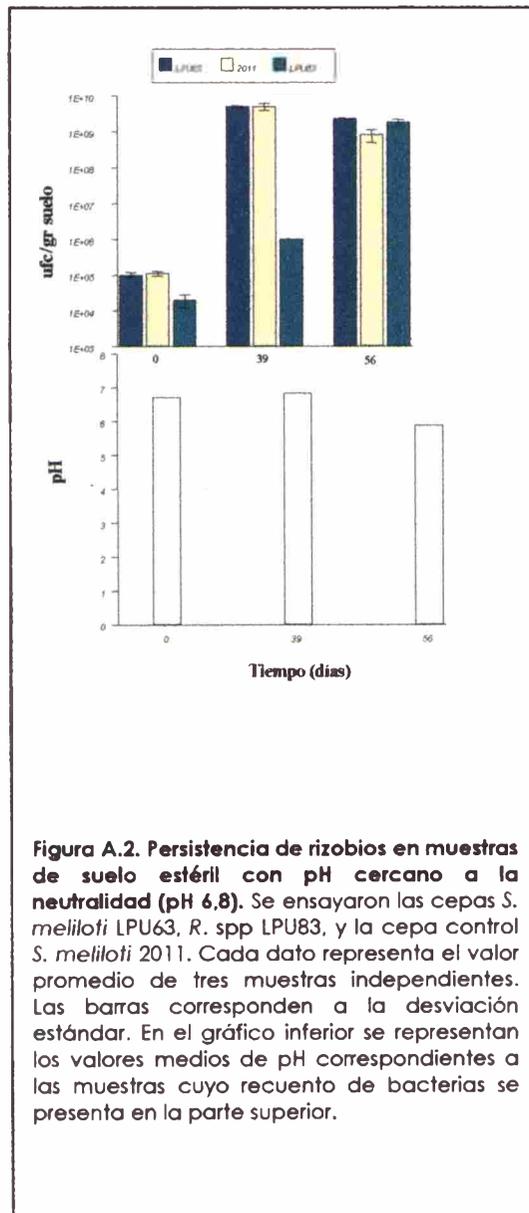


Figura A.1. Ensayo de supervivencia de rizobios en sistema de microcosmos. (A) Tubos con plantas en distintos estadios de crecimiento. (B) Disposición de la serie completa de tubos en la cámara de plantas.

cultivo al que se le adicionó el antibiótico correspondiente a la resistencia de cada una de las cepas. Durante el curso del ensayo se realizó además un seguimiento de pH de cada una de las muestras de suelo analizadas. Se procesaron aproximadamente 300 tubos de microcosmos en un período de 40-60 días considerando los tubos con y sin planta y los dos pHs analizados. En las Figuras A.1 y A.2. se muestran los datos de supervivencia de cada una de las cepas en tres momentos diferentes del ensayo (al inicio del experimento, y a las 6 y 8 semanas post-inoculación).



Los resultados muestran que a pH neutro todas las cepas aumentan su título hasta alcanzar valores que son comparables al final del ensayo. Sin embargo, las cepas de *S. meliloti* parecen alcanzar sus títulos más elevados más rápidamente que la cepa TA LPU83 que el día 39 aun no ha alcanzado su valor máximo. En el mismo tipo de ensayo pero con

suelo ácido se observan diferencias muy marcadas de comportamiento. A los 39 días post-inoculación las cepas disminuyen su título inicial (*S. meliloti*) o aumentan en muy poca proporción (LPU83), disminuyendo abruptamente el recuento de todos los rizobios por debajo de 10^3 a los 56 días post-inoculación. Claramente, en el suelo ácido utilizado a pH 5,6 los rizobios pierden viabilidad con una fase de muerte celular que es muy marcada luego de 40 días de la inoculación. Tal comportamiento no se observó a pH neutro. La pérdida de viabilidad ha sido observada tanto para las cepas de *S. meliloti* como para el rizobio TA LPU83.

Contrapuesto al efecto de la acidez que hemos presentado en la Figura A.3., cuando los ensayos se realizaron en presencia de la planta todos los rizobios aumentaron su recuento hasta alcanzar valores más o menos constantes que dependieron del tipo de cepa (Figura A.4.). Esta observación pone en evidencia un claro efecto protector de la raíz sobre los rizobios a pH ácido. De todos modos, el efecto perturbador de la acidez se manifiesta a través de una fase lag que retarda el inicio de la fase de crecimiento (las curvas en acidez presentan además un recuento menor que las correspondientes a la condición neutra). No hemos analizado si la tasa de crecimiento bacteriano es diferente en las zonas más cercanas a la raíz respecto de las más distantes. Es posible que así sea y que el aumento de la población en acidez luego de la fase lag refleje el establecimiento y crecimiento de los rizobios en la región rizosférica. El comportamiento de las bacterias en regiones ácidas que no estén bajo la influencia de la raíz debería ser similar al observado en la Figura A.3. donde se observa muerte celular.

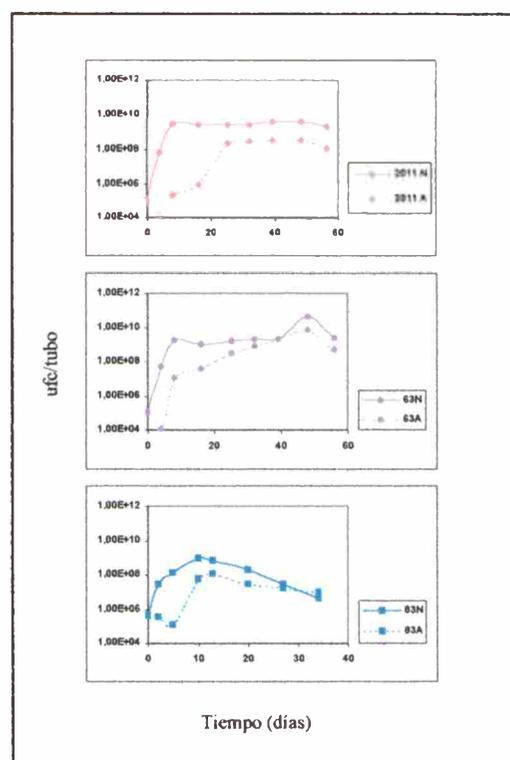
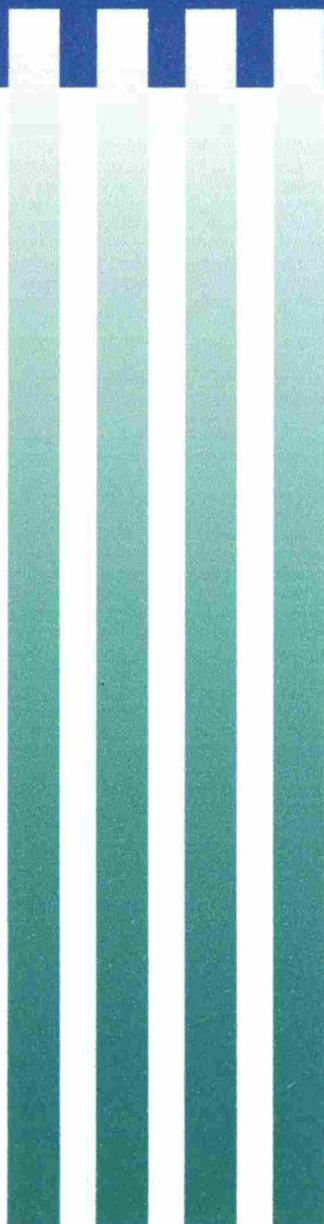


Figura A.4. Dinámica de la población bacteriana de distintas cepas de rizobios en presencia de plantas de alfalfa en suelo estéril ácido (pH 5,6) y en un suelo estéril con pH cercano a la neutralidad (6,8). Cada punto representa el promedio del recuento de tres muestras independientes. Como se indica en el texto el ensayo fue realizado con 2 plantas de alfalfa/tubo de microcosmos y mantenido durante 2 meses en cámara de plantas. Las desviaciones estándar fueron menores que 10 % de la media.

Los resultados que hemos obtenido muestran claramente el efecto perturbador de la acidez sobre la supervivencia de los rizobios en condiciones de suelo. Es importante remarcar que la acidez del suelo utilizado en los ensayos anteriores es muy moderada (5,6), con un valor cercano al observado en varios de los suelos que hemos muestreado. Resultó claro además que la presencia de la planta ejerce un marcado efecto protector sobre los rizobios que están presentes en el suelo ácido. El tipo de ensayos que hemos realizado no han permitido poner en evidencia diferencias, si es que existen, entre el comportamiento de las cepas de *S. meliloti* y el rizobio TA LPU83. La persistencia de las

bacterias inoculadas en un suelo depende de diversos factores ecológicos tanto de índole geológico-edáfico como de índole biológico que al emplear un suelo estéril no han sido considerados. Un nuevo estudio de supervivencia para evaluar el comportamiento relativo de las cepas (*S. meliloti* vs. TA) deberá realizarse sobre muestras de suelo ácido y neutro no estéril empleando marcadores que permitan reconocer las cepas en números más bajos que los que aquí hemos presentado, y por un período de tiempo más extendido. Un ensayo con esas características es esperable que refleje aún más cabalmente el comportamiento de las cepas en condiciones de suelo a campo.

REFERENCIAS



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, OM.** 1981. Fijación simbiótica de nitrógeno. la expresión de la capacidad fijadora por Rhizobios. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Aguilar, M., Kapp, D. y Puhler, A.** 1985. Characterization of a *Rhizobium meliloti* fixation Gene (fixF) located near the common nodulation Region. J. Bacteriol. **164**: 245-254.
- Amman, R.I., Krumholz, L. y Stahl, D.A.** 1990. Fluorescent oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic and environmental studies in microbiology. J. Bacteriol. **172**: 672-770.
- Anyango, B., Wilson, K.J., Beynon, J.L y Giller, K.E.** 1995. Diversity of Rhizobia nodulating *Phaseolus vulgaris* L. in two Kenyan soils with contrasting pHs. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 4016-4021.
- Appleby, C.A.** 1984. Leghemoglobin and Rhizobium respiration. Ann. Rev. Plant Physiol. **35**: 443-478.
- Badenoch Jones, J., R.E. Summons, M.A.Djordjevic, J. Shine, D.S. Letham y B.G. Rolfe.** 1982. Mass Spectrometric Quantification of Indole-3-Acetic Acid in Rhizobium Culture Supernatants: Relation to Root Curling Hair and Nodule Initiation. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 275-280.
- Bal, A.K., Shantharam, S. y Wong, P.P.** 1982. Nodulation of pole bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by *Rhizobium* species of two cross-inoculation groups. Appl. Environ. Microbiol. **44**: 965-971.
- Barber, L.E.** 1980. Enumeration, effectiveness, and pH resistance of *Rhizobium meliloti* populations in Oregon soils. Soil Sci. Soc. Am. J. **44**: 537-539.
- Beck, D.P. y Munns, D.N.** 1985. Effect of calcium on the phosphorus nutrition of *Rhizobium meliloti*. Soil Sci. Soc. Am. J. **49** : 334-337.
- Beckie, H.J. y Ukrainetz, H** 1995. Lime-amended acid soil has elevated pH 30 years later. Can. J. Soil. Sci.
- Berlinger, J.E.** 1974. R. factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. **84**: 188-198.
- Beynon, J.L. y D.P. Josey.** 1980. Demonstration of heterogeneity in a natural population of *Rhizobium phaseoli* using variation in intrinsic antibiotic resistance. J. Gen. Microbiol. **118**: 437-442.
- Bhagwat, A.A. y D.L. Keister.** 1992. Identification and cloning of *Bradirhizobium japonicum* genes expressed strain selectively in soil and Rhizosphere. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1490-1495.
- Bhuvaneshwari, T.V. y W.D. Bauer.** 1978. Role of lectins in plant microorganism interactions. III. Influence of Rhizosphere/Rhizoplane Culture Conditions on the soybean lectin-binding properties of Rhizobia. Plant Physiol. **62**: 71-74.
- Bhuvaneshwari, T.V., S.G. Pueppke y W.D. Bauer.** 1977. Role of lectins in plant-microorganism interactions. I. Binding of soybean lectin to Rhizobia. Plant Physiol. **60**: 486-491.
- Bhuvaneshwari, 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 Infectible root cells. Plant Physiol. **66**: 1027-1031.
- Bhuvaneshwari, T.V., A.A. Bhaqwat y W.D. Bauer.** 1981. Transient Susceptibility of Root cells in Four common legumes to nodulation by Rhizobia. Plant Physiol. **68**: 1144-1149.
- Bhuvaneshwari, T.V., K.K. Mills, D.K. Christ, M.R. Evans y W.D. Bauer.** 1983. Effects of culture age on symbiotic infectivity of *Rhizobium japonicum*. J. Bacteriol. **153**: 443-451.

- Bisseling, T., H. Franssen, R. Heidstra, B. Horvath, K. Panagiotis, M. Moerman, H. Spaink, T. van Brussel y I. Vijn.** 1992. Rhizobium Nod metabolites and early nodulin expression. pp 365-368. En: E.W. Nester y D.P.S. Verma (eds) *Advances in molecular genetics of Plant-Microbes Interactions*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bottomley, P.J. y Jenkins, M.B.** 1983. Some characteristics of *Rhizobium meliloti* isolates from alfalfa fields in Oregon. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**:1153-1157.
- Boyer, H.W. y Roulland-Dussolx, D.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-465.
- Brelles Mariño.** 1993. Interacción Planta-bacteria. Etapas tempranas de la Simbiosis *Rhizobium phaseoli-Phaseolus vulgaris L.* Tesis Doctoral, Universidad Nacional de La Plata.
- Brockwell, J y Bottomley, P.J.** 1995. Recent advances in inoculant technology and prospects for the future. *Soil Biol. Biochem.* **27** : 683-697.
- Brockwell, J., Pilka, A. y Holliday, R.A.** 1991. Soil pH is a major determinant of the numbers of naturally-occurring *Rhizobium meliloti* in non-cultivated soil of New South Wales. *Aust. J. Exp. Agric.* **31**: 211-219.
- Brockwell, J.** 1982. Plant-infection counts of Rhizobia in soils. En: *Nitrogen fixation in Legumes*. J.M. Vincent (ed.) Academic Press. Australia. pp 41-58.
- Broek, A.V. y Vanderleyden, J.** 1995. The role of bacterial motility, chemotaxis, and attachment in bacteria-plant interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 800-810.
- Bromfield, E.S.P. y Barran, L.R.** 1990. Promiscuous nodulation of *Phaseolus vulgaris*, *Macroptilium atropurpureum* and *Leucaena leucocephala* by indigenous *Rhizobium meliloti*. *Can. J. Microbiol.* **36**: 369-372.
- Bromfield, E.S.P. y Jones, D.G.** 1979. The competitive ability and symbiotic effectiveness of doubly labelled antibiotic resistant mutants of *Rhizobium trifolii*. *Ann. Appl. Biol.* **91**: 211-219.
- Bromfield, E.S.P. y Jones, D.G.** 1980. Studies on acid tolerance of *Rhizobium trifolii* in culture and soil. *J. Appl. Bacteriol.* **44**: 253-264.
- Bromfield, E.S.P., Lewis, D.M. y Barran, L.R.** 1985. Cryptic plasmid and rifampicin resistance in *Rhizobium meliloti* influencing nodulation competitiveness. *J. Bacteriol.* **164**: 410-413.
- Brunel, B., J.C. Cleyet-Marel, P. Normand y R. Bardin.** 1988. Stability of Bradyrhizobium japonicum inoculants after introduction into Soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2636-2642.
- Brunel, B., Rome, S., Ziani, R., Cleyet-Marel, J.C.** 1996. Comparison of nucleotide diversity and symbiotic properties of *Rhizobium meliloti* populations from annual *Medicago* species. *FEMS Microbiol. Ecol.* **19**: 71-82.
- Burn, J., L. Rossen y A.W.B. Johnston.** 1987. Four Classes of Mutation in the nodD gene of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* that affect its ability to autoregulate and/or activate other nod genes in the presence of flavonoid Inducers. *Genes Dev.* **1**: 456-464.
- Burton, J.C.** 1972. Nodulation and symbiotic nitrogen fixation. *Agronomy.* **15**: 229-246.
- Caetano-Anollés, G. y W.D. Bauer.** 1988. Feedback regulation of Nodule Formation in Alfalfa. *Planta* **175**: 546-557.

- 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. y G. Favelukes.** 1986b. Host-symbiont specificity expressed during early adsorption of *Rhizobium meliloti* to the Root Surface of alfalfa. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 377-382.
- Caetano-Anollés, G., Lagares, A. y Favelukes, G.** 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: Dependence on divalent cations and pH. *Plant and Soil.* **117**: 67-74.
- Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff.** 1990. Early Induction of feedback regulatory responses governing nodulation in soybean. *Plant Sci.* **71**: 69-81.
- 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, Bassam B.J. y P.M. Gresshoff.** 1991c. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology* **9** (6): 553-557.
- Carter, J.M., Tieman, J.S. y Gibson, A.H.** 1995. Competitiveness and persistence of the strains of the Rhizobia for faba bean in acid and alkaline soils. *Soil Biol. Biochem.* **27**:617-623.
- Cava, J.R., P.M. Elías, D.A. Turowski y D. Noel.** 1989. Rhizobium leguminosarum CFN42 Genetic Regions Encoding lipopolysaccharide structures essential for complete nodule development on Bean Plants. *J. Bacteriol.* **171**: 8-15.
- Chen, H., Richardson, A.E. y Rolfe, B.G.** 1993. Studies of the physiological and genetic basis of acid tolerance in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**:1798-1804.
- Chen, H., Richardson, A.E., Gartner, E., Djordjevic, M.A., Roughley, R.J. y Rolfe, B.G.** 1991a. Construction of an acid-tolerant *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii strain with enhanced capacity for nitrogen fixation. *Appl. Environ. Microbiol.* **27**: 2005-2011.
- Chen, W.X., Li, G.H. y Qi, Y.L.** 1991b. *Rhizobium huakuii* sp. nov. isolated from the root nodules of *Astragalus sinicus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 275-280.
- Clarke, L.M., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R.** 1993. Survival of *Rhizobium meliloti* wsm419 in laboratory culture effect of combined pH shock and carbon substrate stress. *Soil Biol. Biochem.* **25** : 1289-1291.
- Cloutier J., Laberge S, Castonguay Y, Antoun H.** 1996. Characterization and mutational analysis of nodHPQ genes of Rhizobium. *Mol. Plant Microbe Interact.*; **9** (8): 720-728.
- Cregan P.B., H.H. Keyser y M.J. Sadowsky.** 1989. Host Plant Effects on Nodulation and Competitiveness of the *Bradyrhizobium japonicum* serotype strains constituting serocluster 123. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2532-2536.
- Dazzo, F.B. y W.J. Brill.** 1979. Bacterial Polysaccharide wich binds *Rhizobium trifolii* to clover root hairs. *J. Bacteriol.* **137**: 1362-1373.
- Dazzo, F.B., C.A. Napoli y D.H. Hubell.** 1976. Adsorption of bacteria to roots as Related to host specificity in the Rhizobium-clover Symbiosis.
- Dazzo, F.B., G.L. Truchet, J.E. Sherwood, E.M. Hrabak, M.Abe y S.H. Pankratz.** 1984. Specific Phases of root

hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1140-1150.

Dazzo, F.B., G.L. Truchet, R.I. Hollingsworth, E.M. Hrabak, H. Stuart Pankratz, S. Phillip-Hollingsworth, J.L. Salwedel, K. Chapman, L. Appenzeller, A. Squarini, D. Gerhold y G. Orgambide. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.* **173**: 5371-5384.

De Bruijn, F.J. 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2180-2187.

De Lajudie, P., Willems, A., Pot, B., Dewettinck, K., Maestrojuan, G., Neyra, M., Collins, M.D., Dreyfus, Be., Kersters, K. y Gillis, M. 1994. Polybasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:715.

Del Papa, F., Balagué, L., Castro, S., Wegeneger, C., Segundo, E., Martinez-Abarca, F., Toro, N., Niehaus, K., Pühler, A., Aguilar, O.M., Martinez-Drets, G. y Lagares, A. 1999. Isolation and Characterization of alfalfa nodulating rhizobia present in acid soils of Central Argentina and Uruguay. *App. Environ. Microbiol.* **65**:

Demont, N., M. Ardourel, F. Mallet, D. Promé, M. Ferro, J.C. Promé y J. Dénarié. 1994. The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors N-acylated by (ω -1)-Hydroxylated Fatty Acids. *EMBO J.* **13**: 2139-2149.

Dénarié, J y J. Cullimore. 1993. Lipo-Oligosaccharide Nodulation factors: A new class of signaling Molecules mediating recognition and Morphogenesis. *Cell* **74**: 951-954.

Dénarié, J., F. Debelle y C. Rosenberg. 1992. Signalling and host range in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 497-525.

Diatloff, A. 1977. Ecological studies of root-nodule bacteria introduced into field environments. Antigenic and Symbiotic Stability in *Lotononis* Rhizobia over a 12-year Period. *Soil. Biol. Biochem.* **9**:35-88.

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 Pineda, F. 1993. *Ecología I: ambiente físico físico y organismos vivos.* Ed. Síntesis. 155p.

Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D. y Helinski, D.R. 1980. Broad host range DNA cloning system for Gram-negative bacteria. Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 7347-7351.

Dixon, R.A. y C.J. Lamb 1990. Molecular Communication in interactions between plants and microbial pathogens. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol Biol.* **41**: 339-367.

Djordjevic, M.A., D.W. Gabriel y B.G. Rolfe. 1987. *Rhizobium*-the refined parasite of legumes. *Ann. Rev. Phytopatol.* **25**: 145-168.

Dowdle, S.F. y Bohlool, B.B. 1985. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *App. Environ. Microbiol.* **50**: 1171-1176.

Eardly, B., Wang, F., Whittam, T.S. y Selander, R.K. 1995. Species limits in *Rhizobium* populations that nodulate

the common bean (*Phaseolus vulgaris*). Appl. Environ. Microbiol. **61**:507-512.

Eardly, B.D., Hannaway, D.B. y Bottomley, P.J. 1985. Characterization of Rhizobia from ineffective alfalfa nodules: Ability to nodulate bean plants (*Phaseolus vulgaris* (L.) Savi.). Appl. Environ. Microbiol. **50**: 1422-1427.

Eardly, B.D., Young, J.P.W. y Selander, R.K. 1992. Phylogenetic position of *Rhizobium* sp. strain or 191, a symbiont of both *Medicago sativa* and *Phaseolus vulgaris*, based on partial sequences of the 16S rRNA and *nifH* genes. Appl. Environ. Microbiol. **58**:1809-1815.

Ehrahardt, D.W., E.M. Atkinson y S.R. Long. 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potencial by *Rhizobium meliloti* Nod Factors. Science. **256**: 998-1000.

Fahraeus, G. 1957. The infection of clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. J. Gen. Microbiol. **16**: 374-381.

Faucher, C., F. Maillet, J. Vasse, C. Rosenberg, A.A.N. van Brussel, G. Truchet y J. Dénarié. 1988. *Rhizobium meliloti* host range nodH gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal. J. Bacteriol. **170**: 5489-5499.

Fisher, R.F. y S.R. Long. 1992. Rhizobium-plant Signal Exchange. Nature. **357**:655-660.

Fisher, H.M. 1994. Genetic regulation of Nitrogen Fixation in Rhizobia. Microbiol.Rev. **58**: 352-386.

Figurski, D.H. y Dellnski, D.R. 1979. Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. Proc. Natl. Acade. Sci. USA. **76**: 1648-1652.

Fils, S.E., Glenn, A.R. y Dilworth, M.J. 1993. The interaction between aluminium and root nodule bacteria. Soil Biol. Biochem. **25**: 403-417.

Fry, S.C., S. Aldington, P.R. Hetherington y J. Aitken. 1993. Oligosaccharides as signals and substrates in the plant Cell Wall. Plant Physiol. **103**: 1-5.

Fujihara, S. y Yoneyama, T. 1993. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 1104-1109.

Gaworzewska E.T. y M.J. Carille. 1982. Positive Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants. J. Gen. Microbiol. **128**: 1179-1188.

Gemell, L.G., Roughley, R.J., Reed, M.L. y Hartley, E.J. 1993. Screening of *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* for adaptation to acid and neutral soils using a selective agar medium. Soil Biol. Biochem. **25**: 1463-1464.

Gibson, A.H. 1967. Carbon dioxide limitations of plant growth in tube culture, with special reference to legume-nodulation studies. Aust. J. biol. Sci. **20**: 837-842.

Glenn, A.R. y Dilworth, M.J. 1994. The life of root nodule bacteria in the acidic underground. FEMS Microbiol. Lett. **123** : 1-10.

Goss, T.J., O'Hara, G.H., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R. 1990. Cloning, characterization, and complementation of lesions causing acid sensitivity in Tn5-induced mutants of *Rhizobium meliloti* WSM419. J. Bacteriol. **172**: 5173-5179.

Graham, P.H. 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil

condition. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475-484.

Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martínez, E., Aarons, S.R. y Quinto, C. 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* **40**: 198-207.

Graham, P.H., Sadowsky, M.J., Keyser, H.H., Barnett, Y.M., Bradley, R.S., Cooper, J.E., De Ley, D.J., Jarvis, B.D.W., Roslycky, E.B., Strijdom, B.W. y Young, J.P.W. 1991. Proposed minimal standards for the description of new genera and species of root- and stem nodulating bacteria. *Int. J. System. Bacteriol.* **41**:582-587.

Graham, P.H., Viteri, S.E., Mackie, F., 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* **5**: 121-128.

Greaves, M.P. y J.F. Darbyshire. 1972. The ultrastructure of the Mucilaginous layer on Plant roots. *Soil Biol. Biochem.* **4**: 443-449.

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.

Hanin M, JabbouriS, Quesada-Vincens D., Freiberg C, Peerret X, Prome JC, Broughton WJ y Fellay R.1997. Sulphation of *Rhizobium* sp.NGR234 Nod factors is dependent on noe specificity gene. *Mol Microbiol.* **24**(6):1119-29.

Hansen L:H., Sorensen S.y LB. Jensen. 1997. Chromosomal insertion of the entire *E. coli* lactose operon, into two strains of *Pseudomonas*, using a modified mini-Tn5 delivery system. *Gene*, **186**: 167-173.

Hartel, P.G. y Alexander, M. 1983. Growth and survival of cowpea Rhizobia in acid, aluminum-rich soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**: 502-506.

Hartel, P.G. y Bouton, J.H. 1989. *Rhizobium meliloti* inoculation of alfalfa selected for tolerance to acid, aluminium-rich soils. *Plant and Soil.* **116**:283-285.

Hartwig, U.A., C.A. Maxwell, C.M. Joseph y D.A. Phillips. 1990. Effects of alfalfa nod Gene-Inducing flavonoids on *nodABC* Transcription in *Rhizobium meliloti* strains containing different *nodD* genes.

Haynes, R.J. 1990. Active ion uptake and maintenance of cation-anion balance: A critical examination of their role in regulating rhizosphere pH. *Plant and Soil.* **126**: 247-264.

Haukka K., Lindstrom K., Young J.P.. 1998. Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *App. Env. Microbiol.* **64** (2): 419-426.

Henneke H, D. Anthamatten, M. Babst, M. Bobt, H.M. Ficscher, T. Kaspar, I. Kullik, H. Loferer, o. Preisig, D. Ritz, y M. Weidenhaupt. 1992. Genetic and Physiological requirements for optimal bacteroid function in the *Bradyrhizobium japonicum* soybean symbiosis. pp.199-207. En: E.W. Nester y D.P.S. Verma (eds.) *Advances in Molecular Genetics of Plant Microbe interactions.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Heldstra, R., R. geurts, H. Franssen, H.P. Spaink, 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.

Heldstra, R. y Bisseling, T. 1995. Nod factor-induced host responses and mechanisms of Nod factor

perception. En: Perception and Action of Nod Factors in *Rhizobium*-Legume Symbiosis. Renze Heidstra, pp. 13-31.

Hernandez-Lucas, I. Segovia, L., Martínez-Romero, E. y Pueppke, S.G. 1995. Phylogenetic relationships and host range of *Rhizobium* spp. that nodulate *Phaseolus vulgaris* L. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:2775-2779.

Hirsch, A. M. y Smith, C. A. 1987. Effects of *Rhizobium meliloti nif* and *fix* mutants on alfalfa root nodule Development. *J. Bacteriol.* **169**: 1137-1146.

Hirsch, A. M., Bang, M. y Ausubel, F. M. 1983. Ultrastructural Analysis of ineffective alfalfa nodules formed by *nif::Tn5* mutants of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **155**: 367-380.

Hirsch, A.M., T.V. Bhuvaneshwari, J.G. Torrey y T. Bisseling. 1989. Early Nodulin Genes are Induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. **86**: 1244-1248.

Hirsch, A.M. y Fang, Y. 1994. Plant hormones and nodulation: what's the connection? *Plant Molecular Biology.* **26**: 5-9.

Ho, S.C., W. Ye, M. Schindler y J.L.Wang. 1988. Quantitative assay for binding of *Bradyrhizobium japonicum* to cultured soybean cells. *J. Bacteriol.* **170**: 3882-3890.

Hooykaas, P.J.J., A.A.N. van Brussel, H. Den Dulk-Ras, G.H.S. van Slogteren y R.A. Schilperoord. 1981. Sym Plasmid of *Rhizobium trifolii* expressed in different rhizobial species and *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature.* **291**: 351-353.

Horvath, B., C.W.B. Bachem, J. Schell y A. Kondorosí. 1987. Host-Specific regulation of nodulation genes in *Rhizobium* is mediated by a Plant-Signal Interacting with the *nodD* gene product. *EMBO J.* **6**: 841-848.

Howieson, J.G. y Ewing, M.A. 1986. Acid tolerance in the *Rhizobium meliloti*- *Medicago* symbiosis. *Aust. J. Agric. Res.* **37**:55-64.

Howieson, J.G., Ewing, M.A., y D'Antuono, M.F. 1988. Selection for acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Plant Soil*, **105**: 179-188.

Howieson, J.G. 1995a. Characteristics of an ideotype acid tolerant pasture legume symbiosis in Mediterranean agriculture. *Plant and Soil* **171**: 71-76.

Howieson, J.G. 1995b. Rhizobial Persistence and its role in the development of the sustainable agricultural systems in the Mediterranean environments. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 603-610.

Howieson, J.G., Robson, A.D. y Abbott, L.K. 1992. Acid-tolerant species of *Medicago* produce root exudates at low pH which induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium meliloti*. *Aust. J. Plant Physiol.* **19**: 287-296.

Howieson, J.G., Robson, A.D. y Ewing, M.A. 1993. External phosphate and calcium concentrations, and pH, but not the products of rhizobial nodulation genes, affect the attachment of *Rhizobium meliloti* to roots of annual medics. *Soil. Biol. Biochem.* **25**: 567-573.

Howieson, J.G. 1985. Use of an organic buffer for the selection of acid tolerant *Rhizobium meliloti* strains. *Plant and Soil.* **88**: 367-376.

Hungría, M., C.M. Joseph y D.A. Phillips. 1991a. Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seeds of a Black-Seeded Common Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**: 751-758.

Iañez, E. 1994a. Fisiología Bacteriana. En: Curso de Microbiología General. Vol. II. Iañez, E (ed.). Granada

(España).

Iañez, E. 1994b. Taxonomía Bacteriana. En: Curso de Microbiología General. Vol. IV. Iañez, E (ed.). Granada (España).

Jarvis, B.D.W., L.J.H. Ward y E.A. Slade. 1989. Expression by soil bacteria of Nodulation genes from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. Appl. Environ. Microbiol. **55**: 1426-1434.

John, M., Röhrig, J. Schmidt, U.Wieneke y J. Schell. 1993. Rhizobium NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a Chitooligosaccharide Deacetylase. Proc.Natl.Acad.Sci. USA. **90**:625-629.

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.

Karem, K.L., Foster, J.W. y Bej, A.K. 1994. Adaptive acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas hydrophila*. Microbiology. **140**: 1731-1736.

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., 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.

Killham, K 1994. Soil Ecology. Cambridge University Press. (Great Britain).

Kinkle, B.K. y E.L. Schmidt. 1991. Transfer of the Pea Symbiotic Plasmid pJB5J1 in nonsterile soil. Appl. Environ. Microbiol.**57**: 3264-3269.

Kluepfel, D.A. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. Ann. Rev. Phytopatol. **31**: 441-472.

Koes, R.E., F. Quatrocchio y J.N.M. 1994. The flavonoid Biosynthetic Pathway in Plants: function and Evolution. Bioessays. **16**: 123-132.

Kondorosi, A. 1991. Overview on Genetics of Nodule induction: Factors controlling nodule induction by *Rhizobium meliloti*. pp.111-118. En: H. Henneke & D.P.S. verma (eds). Advances in Molecular Genetics of Plant -Microbe Interactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Kosler, B., Pühler, A. y Simon, R. 1993. Monitoring the diversity of *Rhizobium meliloti* field and microcosm isolates with a novel rapid genotyping method using insertion elements. Mol. Ecol. **2**: 35-46.

Kosslak, R.M., B.B. Bohlool, S. Dowdle y M.J. Sadowski. 1983. Competition of *Rhizobium japonicum* Strains in Early Stages of Soybean Nodulation. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 870-873.

Krom, M.D. 1980. Spectrophotometric determination of ammonia: a study of a modified Berthelot reaction using salicylate and dichloroisolyamurate. Analyst. **105**: 305-316.

Kuykendall, L.D., Swelim, D.M., Hashem, F.M., Abdel-Wahab, S.M. y Hegazi, N.I. 1996. Symbiotic competence, genetic diversity and plasmid profiles of Egyptian isolates of a *Rhizobium* species from *Leucaena leucocephala* (Lam.) Dewit. Lett. Appl. Microbiol. **22**: 347-352.

Laeremans T, Caluwaerts I, Verreth C, Rogel MA, Vanderleyden J, Martinez -Romero E. 1996. Isolation and characterization of *Rhizobium tropici* Nod factor sulfation. Mol Plant Microbe Interact, **9** (6): 492-500.

Lagares, A. 1989. La asociación Simbiótica Rizobio-Leguminosa: Componentes Superficiales bacterianos

Involucrados en las etapas tempranas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.

Lagares, A., G. Caetano Anollés, K. Niehaus, J. Lorenzen, H.D. Ljunggren, A. Püler y G. Favelukes. 1992. A *Rhizobium meliloti* Lipopolysaccharide Mutant altered in Competitiveness for Nodulation of alfalfa. *J. Bacteriol.* **174**: 5941-5952.

Laguerre, G., Mazurier, S.I. y Amarger, N. 1992. Plasmid profiles and restriction fragment length polymorphism of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* in field populations. *FEMS Microbiol. Ecol.* **107**: 17-26.

Laeremans, T., Caluwaers, I., Verreth, C., Rogel, M.A., Vanderleyden, J. y Martínez-Romero, E. 1996. Isolation and characterization of the *Rhizobium tropici* Nod factor sulfation genes. *Mol. Plant-Microb. Interact.* **9**: 492-500.

Lamb, C.J., M.A. Lawton, M. Dron y R.A. Dixon. 1989. Signals and transduction Mechanism for Activation of Plant Defences against Microbial Attack. *Cell* **56**: 215-224.

Leigh J y DL. Coplin. 1992. Exopolysaccharides in Plant-Microbe interactions. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 307-342.

Lerogue, P., P. Roche, C. Faucher, F. Mallet, 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.

Leonard, L.T. 1943. A simple assembly for use in testing of culture of rhizobia. *J. Bacteriol.* **45**: 523-527.

Lewis Henderson, W. y M.A. Djordjevic. 1991. A cultivar-specific interaction between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and Subterranean clover is controlled by *nodM*, Other bacterial cultivar specificity genes, and a single recessive Host gene. *J. bacteriol.* **173**: 2791-2799.

Lie, T. A., Nijland, G.J. y Waluyo, S.H. 1988. Competition between nodulating and non-nodulating *Rhizobium* strains: delay of nodulation. Physiological Limitations and the Genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation. F. O'Hara et al. (eds.) 127-136.

Lindemann, W.C., Schmidt, E.L. y Ham, G.E. 1974. Evidence for double infection within soybean nodules. *Soil Sci.* **118**: 274-279.

Lindström, K. 1989. *Rhizobium galegae* a new species of legume root nodule bacteria. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **39**: 365-367.

Lodeiro, A.R., Lagares, A., Martínez, E.N. y Favelukes, G. 1995. Early interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli* and bean roots: specificity in the process of adsorption and its requirement of Ca²⁺ and Mg²⁺ ions. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1571-1579.

Long, S.R. 1989. *Rhizobium*-Legume Nodulation: Life together in the underground. *Cell* **56**: 203-214.

Long, S.R y B.J. Staskawicz. 1993. Prokaryotic Plant Parasites. *Cell* **73**: 921-935.

Lowendorf, H.S. y Alexander, M. 1983. Selecting *Rhizobium meliloti* for inoculation of alfalfa planted in acid soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47**: 935-938.

Lowendorf, H.S., Baya, A.M. y Alexander, M. 1981. Survival of *Rhizobium* in acid soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 951-957.

Lugtenberg B y L. VanAlphen. 1983. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *E. coli* and other Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **737**: 51-115.

- Maier, R.J. y Triplett, E.W.** 1996. Toward more productive, efficient, and competitive nitrogen-fixing symbiotic bacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 191-234.
- Martínez-Romero, E.** 1994. Recent developments in *Rhizobium* taxonomy. *Plant and Soil.* **161**:11-20.
- Martínez-Romero, E. y Caballero -Mechado J.**(1996).*Rhizobium* phylogenies and bacterial genetic diversity. *Crit. Rev. Plaaaant Sci* **15**:113-140.
- Martínez-Romero, E., Segovia, L., Mercante, F.M., Franco, A.A., Graham, P. y Pardo, M.A.** 1991. *Rhizobium tropici* a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Ins. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 417-426.
- Martínez Toledo M.V.** 1992. Biología del nitrógeno. En *Interacción Planta-Microorganismo: Biología del Nitrógeno.* (eds. González López, J.G. y Lluch Pla C.). España. pp. 25-36.
- 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.
- Meganathan R.**1996. Biosynthesis of the Isoprenoid quinones menaquinone(Vitamin K₂) and ubiquinone(Coenzyme Q). Section B3. Biosynthesis of coenzymes and prosthetic groups.
- Mengel, K y Schubert, E.** 1988. Effect of soil pH on nitrogenase activity, crop yield and *Rhizobium* multiplication. En: *Physiological Limitations and the Genetic Improvement of Symbiotic Nitrogen Fixation.* F. O'Gard et al. (eds.) 137-146.
- Morris, R.O.** 1986. Genes Specifying auxin and Cytokinin Biosynthesis in Phytopathogens. *Ann rev. Plant Physiol.* **37**: 509-538
- Munns, D.N.** 1968. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. I. Acid-sensitive steps. *Plant and Soil.* **28**: 129-146.
- Munns, D.N.** 1970. Nodulation of *Medicago sativa* in solution culture. V. Calcium and pH requirements during infection. *Plant and Soil.* **32**: 90-102.
- Munns, DN and RL Fox.** 1977. Comparative lime requirements of tropical and temperate legumes. *Plant soil* **46**: 533-548.
- Muslera, E. y Ratera, C.** 1991. Praderas y forrajes: producción y aprovechamiento, 2ª edición. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (España).
- Niemann, S., Pühler, A., Tichy, H., Simon, R. y Selbitschka, W.** 1997. Evaluation of the resolving power of three different DNA fingerprinting methods to discriminate among isolates of a natural *Rhizobium meliloti* population. *Journal of Applied Microbiology.* **82**: 477-484.
- Noe, K.D., K.A. Vandembosch, y B. Kujawa.** 1986. Mutations in *Rhizobium phaseoli* that lead to arrested development of infection threads. *J. Bacteriol.* **168**: 1392-1401.
- Nour, S.M., Cleyet-Marcek H.C., Normand, P. y Fernández, M.P.** 1995. Genomic heterogeneity of strains nodulating chickpeas (*Cicer arietinum* L.) and description of *Rhizobium mediterraneum* sp. nov. *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **45**:640-648.

- Nour, S.M., Fernández, M.P., Normand, P. y Cleyet-Marcekm H.C.** 1994. *Rhizobium ciceri* sp. nov. consisting of strains that nodulate chickpeas (*Cicer arietinum* L.). *Inter. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 511-522.
- O'Hara, G.H. y Glenn, A.R.** 1994 The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* **161** : 286-292
- O'Hara, G.W., Goss, T.J., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R.** 1989 Maintenance of intracellular pH and acid tolerance in *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1870-1876.
- Olivares, J., Casadesús, J. y Bedmar, E.J.** 1980. Method for testing degree of infectivity of *Rhizobium meliloti* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**:967-970.
- Orive, R. y Temprano, F.** 1983. Simbiosis *Rhizobium* leguminosa. En: Leguminosas de Grano. Cubero, J.I. y Moreno, M.T. pp. 69-94. Ed. Mundi-Prensa, Madrid (España).
- Paau, A.S. W.T. Leps y W.J. Brill.** 1981. Agglutinin form alfalfa necessary for binding and nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Science* 1513-1515.
- Paau, A.S., M.L. Bennet, C.J. Kurtenbach y L.L. Graham.** 1990. Improvement of inoculant efficiency by strain improvement and formulations manipulations. Pp. 617-624. En: P.M. Gresshoff, L.E. Roth, G. Stacey y W.E. Newton (eds.). Nitrogen Fixation: Achievements and Objectives. Chapman and Hall, New York, USA.
- Park, Y., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S. y Foster, J.W.** 1996 Internal pH crisis, Lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology.* **20(3)** : 605-611.
- Pichon M., E.P. Journet, A. Dedieu, F. de Billy y G. Truchet.** 1992. *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene ENOD12 in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell* **4**: 1199-1211.
- Pijnenborg, J.W.M. y Lie, T.A.** 1990a. Effect of lime-pelleting on the nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil: A comparative study carried out in the field, in pots and in rhizotrons. *Plant and Soil.* **121**:225-234.
- Pijnenborg, J.W.M., Lie, T.A. y Zehnder, A.J.B.** 1990b. Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil: pH dynamics in the rhizosphere of the seedlings growing in rhizotrons. *Plant and Soil.* **126**:161-168.
- Pijnenborg, J.W.M., Lie, T.A. y Zehnder, A.J.B.** 1990c. Inhibition of the nodulation of the lucerne (*Medicago sativa* L.) by calcium depletion in an acid soil. *Plant and Soil.* **127**:31-39.
- Pijnenborg, J.W.M., Lie, T.A. y Zehnder, A.J.B.** 1991. Nodulation of lucerne (*Medicago sativa* L.) in an acid soil: Effects of inoculum size and lime-pelleting. *Plant and Soil.* **131**:1-10.
- Plazinski, J. Y B.G. Rolfe.** 1985. Sym plasmid genes of *Rhizobium trifolii* expressed in *Lignobacter* and *Pseudomonas* Strains. *J. Bacteriol.* **162**: 1261-1269.
- Price, N.P.J., B. Rlic, F. Talmont, A. Lewin, D. Promé, S.G. Pueppke, F. Maillet, J. Dénarié, J.C. Promé y W.J. Broughton.** 1992. Broad host range *Rhizobium* Species strain NGR234 secretes a family of carbamoylated, or fucosylated, nodulation signals that are O-Acetylated or Sulphated. *Mol. Microbiol.* **6**: 3575-3584.
- Prieto CI, Aguilar OM, Yantorno OM.** (1999). Analyses of lipopolysaccharides, outer membrane proteins DNA fingerprints reveal intraspecies diversity in *Moraxella* isolated in Argentina. *Vet. Microbiol.* **70** (3-4):213-223.
- Priefer, U.B.** 1989. genes involved in Lipopolysaccharide Production and Symbiosis are Clustered on the Chromosome of *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae VF39. *J. bacterial.* **171**: 6161-6168.

- Pueppke, S.G.** 1986. Nodule Distribution on legume roots: specificity and response to the presence of Soil. *Soil Biol. Biochem.* 18: 601-606.
- Rao, J.R., M. fenton, y B.D.W. Jarvis.** 1994. Symbiotic plasmid transfer in *R. leguminosarum* biovar *trifolii* and competition between the inoculant strain ICMP2163 and transconjugant Soil bacteria. *Soil Biol. Biochem.* 26:339-351.
- Redmond, J.W., M. Batley, M.A. Djordjevic, R.W. Innes, P.L. Kuempel y B.G. Rolfe.** 1986. Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* 323:632-634.
- Reeve, W.G., Tiwari, R.P., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R.** 1993 Calcium affects the growth and survival of *Rhizobium meliloti*. *Soil Biol. Biochem.* 25 : 581-586.
- Riccillo PM, Muglia C., de Bruijn F., Roe AJ., Booth IR y Aguilar MO.** 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. of Bacteriol.* Vol.182: 1748-1753.
- Rice, W.A. y Olsen, P.E.** 1983. Inoculation of alfalfa seed for increased yield on moderately acid soil. *Can. J. Soil Sci.* 63:541-545.
- Rice, W.A.** 1975. Effects of CaCO₃ and inoculum level on nodulation and growth of alfalfa in an acid soil. *Can. J. Soil Sci.* 55:245-250.
- Rice, W.A.** 1982. Performance of *Rhizobium meliloti* strains selected for low-pH tolerance. *Can. J. Plant Sci.* 62:941-948.
- Rice, W.A., Penney, D.C. y Nyborg, M.** 1977. Effects of soil acidity on rhizobia numbers, nodulation and nitrogen fixation by alfalfa and red clover. *Can. J. Soil Sci.* 57:197-203.
- Richardson, A.E., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. y Simpson, R.J.** 1988. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil.* 109: 37-47.
- Richardson, A.E., Simpson, R.J Djordjevic, M.A. y Rolfe, B.G..** 1988. Expression of nodulation genes in *Rhizobium leguminosarum* biovar. *Trifolii* is affected by low pH and by Ca and Al ions. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2541-2548.
- Rigaud, J. y Puppo, A.** 1975. Indole-3 acetic catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Microbiol.* 88: 223-228.
- Robertsen, B.K., Alman, P., Darvill, A.G., McNeil, M. y Alberstein, P.** 1981. The structure of acidic extracellular polysaccharides secreted by *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Plant Physiol.* 67: 389-400.
- Rome, S., Fernandez, M., P., Brunel, B., Normand, P. y Cleyet-Marel, J.** 1996. *Sinorhizobium medicae* sp. nov., isolated from annual *Medicago* spp. *Int. J. System. Bacteriol.* 46: 972-980.
- Rostas K., E. Kondorosi, B. Horvath, A. Simoncsits y A. Kondorosi.** 1986. Conservation of extended promoter regions of nodulations genes in *Rhizobium* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 1757-1761.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H. Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Harn, G.T., Mullis, K.B. y Erlich, H.A.** 1988. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.

San Juan J., R.W. carlson, H.P. Spalk, 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. Acad. Sci. USA 89:8789-8793.

Savouré, A , Magyar., M. Pierre, S. Brown, M. Schultze, D. Duditz, A. Kondorosi y E. Kondorosi. 1994. Activation of the cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active *Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in Medicago Microcallus suspensions. EMBO J., 13: 1093-1102.

Schwedock, J. y S.R. Long. 1990. ATP sulphurylase activity of the nodP and nodQ gene products of *Rhizobium meliloti* . Nature: 348:644-647.

Segovia, L., Young, J.P.W. y Martinez-Romero, E.1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. Int. J. System. Bacteriol. **43**: 374-377.

Segundo, E., Martínez-Abarca, F., van Dillewijn, P., Fernández-López, M., Lagares, A., Martínez-Drets, G., Niehaus, K., Pühler, A. y Toro, N. 1999. Characterization of symbiotically efficient alfalfa-nodulating rhizobia isolated from acid soils of Argentina nad Uruguay. FEMS Microb. Ecol. **28**:169-176,

Selbitschka, W., Arnold, W., Jording, D., Kosler, B., Toro, N. y Pühler, A. 1995. The insertion sequence element ISRm2011-2 belongs to the IS630-TcI family of transposable elements and is abundant in *Rhizobium meliloti*. Gene. **163**: 59-64.

Seward, R.J., Ehrenstein, B., Grundmann, H.J. y Towner, K.J. 1997. Direct comparison of two commercially available computer programs for analysing DNA fingerprinting gels. J. Med. Microbiol. **46**: 314-320.

Sharon, N y H. Lis. 1989. Lectins as cell recognition molecules. Science **246**: 227-234.

Sharon, N y H. Lis. 1990. Legume Lectins – a large family of homologous Proteins . FASEB J. **4**: 3198-3208.

Sharon, N y H. Lis. 1993. Carbohydrates in cell recognition. Sci. Amer. **268**:74-81.

Simon, R., Hötte, B., Klauke, B. y Kolser, B. 1991. Isolation and characterization of insertion sequence elements from gram-negative bacteria by using new broad-host-range, positive selection vectors. J. Bacteriol. **173**: 1502-1508.

Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E. y Slonczewski, J.L. 1994 Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. J. Bacteriol. **176** : 1729-1737.

Soballe B y RK. Poole. 1999. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. Microbiology : 1817-1830.

Spalk, 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.

Spalk, H.P. 1995 The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: The ins and out of symphatogenesis. Annu. Rev. Phytopathol. **33** : 345-368.

Spalk , H. 1994. The molecular basis of the host specificity of the *Rhizobium* Bacteria. A. Van Leeuwenhoek **65**: 81-98.

Stotzky, G 1989 Gene transfer among bacteria in soil. Gene Transfer in the Environment. S.B. Levy y R.V. Miller (eds) Mc Graw-Hill. N.Y., pp 165-222.

Thies, J.E., Singleton, P.W. y Bohlool, B.B. 1991. Influence of the size of indigenous Rhiozobal populations on

establishment and symbiotic performance of introduced Rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**:19-28.

Tichy, H.V. y Simon, R. 1994. Rapid species confirmation of bacterial strains isolated from the rhizosphere using restriction analysis of amplified ribosomal DNA.. En: *Aportaciones a la Biología de la Fijación del nitrógeno Atmosférico*. M. Megías, A.J. Palomares y F- Ruiz (eds.), pp. 371-223.

Tiwari, R.P., Reeve, W.G. y Glenn, A.R. 1992 Mutations conferring acid sensitivity in the acid-tolerant strains *Rhizobium meliloti* WSM419 and *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* WSM710. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 107-112.

Tiwari, R.P., Reeve, W.G., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R. 1996a. An essential role actA in acid tolerance of *Rhizobium meliloti*. *Microbiology.* **142**: 601-610.

Tiwari, R.P., Reeve, W.G., Dilworth, M.J. y Glenn, A.R. 1996b. Acid tolerance in *Rhizobium meliloti* strain WSM419 involves a two-component sensor-regulator system. *Microbiology.* **142**: 1693-1704.

Toro, N. 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World Journal of Microbiology y Biotechnology.* **12**: 157-162.

Toro, N. y Olivares, J. 1986. Characterization of a large plasmid of *Rhizobium meliloti* involved in enhancing nodulation. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 331-335.

Trinick, M.J. 1980. Relationships amongst the fast-growing Rhizobia of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala*, *Mimosa* spp., *Acacia farnesiana* and *Sesbania grandiflora* and their affinities with other Rhizobial groups. *J. Appl. Bacteriol.* **49**: 39-53.

Trinick, M.J. 1964. *Medicago sativa* nodulation with *Leucaena leucocephala* root-nodule bacteria. *Australian Journal Science.* **27**: 263-264.

Triplett, E.W. 1990. The molecular genetics of nodulation competitiveness in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* . *Mol. Plant-Microbe Int.* **4**:199-206.

Triplett, E.W. y M.J. Sadowsky. 1992. Genetics of competition for nodulation of legumes. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**:399-428.

Truchet, G., P. Roche, P. Lerogue, 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: 1100-1104.

Van Loosdrcht, M.C.M., J. Lyklema, W. Norde y A.J.B. Zehnder. 1990. Influence of interfaces on Microbial activity . *Microbiol. Rev.* **54**:75-87.

Van Berkum, P., Beyene, D. y Eardly, B.D. 1996. Phylogenetic relationships among *Rhizobium* species nodulating the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. System. Bacteriol.* **46**: 240-244

Van Rhijn, P. y Vanderleyden, J. 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological Reviews.* **59**: 124-142.

Vance, C. P. y Johnson, L. E. B. 1981. Nodulation: A plant disease perspective. *Plant Disease.* **65**: 118-124.

Vasse, J., Billy, F. De, Camut, S. y Truchet, G. 1990. Correlation between Ultrastructural Differentiation of Bacteroids and Nitrogen Fixation in Alfalfa Nodules. *J. Bacteriol.* **172**: 4295-4306.

Verma, D.P.S., G.H. Miao, C.I. Cheon y H. Suzuki. 1991. Genesis of root nodules and function of nodulins pp 291-299. En: H. henneke y D.P.S. Verma (eds.) *Advances in molecular genetics of plant microbe*

interactions. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (The Netherlands).

Versalovic, J., Koeuth, T. y Lupski, J.R. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application of fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6823-6831.

Vesper, S.J. N.S.A. Malik, y W.D. Bauer. 1987. Transposon mutant of *Bradyrhizobium japonicum* altered in attachment to host rotos. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1959-1961.

Wai Lin Tung y King-Chuen Chow. 1995. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends in Genetics* **11**: 128-129.

Villadas, P.J., Burgos, P., Jording, D., Selbitschka, W., Pühler, A. y Toro, N. 1996. Comparative analysis of the structure of a *Rhizobium meliloti* field population before and after environmental release of the highly competitive *R. meliloti* strain GR4. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**: 37-45.

Vlassak, K.M. y Vanderleyden, J. 1997. Factors influencing nodule occupancy by inoculant Rhizobia. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**:163-229.

Von Uexküll, H.R. y Mutert, E. 1995 Global extent, development and economic impact of acid soils. *Plant and Soil.* **171** : 1-15

Wall, L.G. y G. Favelukes. 1991. Early recognition in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: root exudates factor stimulates root adsorption of homologous Rhizobia. *J. bacteriol.* **173**: 3492-3499.

Wexler, M., Gordon, D. y Murphy, P.J. 1995. The distribution of inositol rhizopine genes in *Rhizobium* populations. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 531-537.

Wheatcroft, R. y Watson, R.J. 1988. A positive strain identification method for *Rhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 574-576.

Willems, A. y Collins M.D. 1993. Phylogenetic analysis of rhizobia and agrobacteria based on 16S rRNA gene sequences. *Int. J. Syst. Bact.* **43**: 305-313.

Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 6531-6535.

Wilson, J.K. 1944 Over five hundred reasons for abandoning the cross-inoculation groups of the legumes. *Soil Sci.* **58**: 61-69.

Wilson, J.K. 1939. Leguminous plants and their associated organisms. *Cornell Agric. Exp. Stn. Mem.* p. 221.

Wilson, K.J. 1995. Molecular techniques for the study of the Rhizobial ecology in the field. *Soil Biol. Biochem.* **27**:501-514.

Yanagi M. y K. Yamasoto. Phylogenetic análisis of the family Rhizobiaceae and related bacteria by sequencing of 16S rRNA gene using PCR and DNA sequencer. *FEMS Microbiol. Lett.* **107**: 115-120.

Yokota, S. y Ojima, K. 1995 Physiological response of root tip of alfalfa to low pH and aluminum stress in water culture. *Plant and Soil.* **171**: 163-165.

Young, J.P.W. 1993. Molecular phylogeny of Rhizobia and their relatives. En *New Horizons in Nitrogen Fixation*. R. Palacios et al. (eds.) pp. 587-592. Netherlands.

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.

Young, J.P.W., Downer, H.L. y Eardly, B.O. 1991. Phylogeny of the phototrophic Rhizobium strain BTAi1 by polymerase chain reaction based secuencing of the 16S rRNA gene segment. J. Bacteriol. **173**: 2271-2277.



Biblioteca Central
Fac. Cs. Exactas
U.N.L.P.

DEDICACION.....
A.....
Fecha 04.07.05.....
Inv. E..... Inv..... D. 57467.....