



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS  
Departamento de Ciencias Biológicas

Trabajo de Tesis Doctoral

“Optimización de Inoculantes para la  
Agricultura Sustentable en Soja: Rol de los  
flagelos de *Bradyrhizobium japonicum*  
en la competición para la nodulación”

*María Julia Althabegoiti*

*Director: Prof. Dr. Aníbal Lodeiro*

2010

Althabegoiti, María

Optimización de Inoculantes para la Agricultura Sustentable en Soja: Rol de los flagelos de *Bradyrhizobium japonicum* en la competición para la nodulación. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata, 2012.

E-Book.

ISBN 978-950-34-0798-1

1. Agricultura. 2. Soja. 3. Tesis de Doctorado. I. Título  
CDD 630

Fecha de catalogación: 11/11/2011

## INDICE GENERAL

Capítulo I	Introducción	Página	
	I.1	Los microorganismos	1
	I.2	El suelo como hábitat microbiano	2
	I.3	Importancia de la fijación de N <sub>2</sub>	6
	I.4	Rizobios	7
	I.4.1	<i>Clasificación</i>	7
	I.4.2	<i>Hábitat y estilos de vida</i>	9
	I.5	Simbiosis rizobio- leguminosa	11
	I.5.1	<i>Reconocimiento de los simbiosites</i>	11
	I.5.2	<i>Primer contacto físico: Colonización y adhesión de los rizobios a las raíces</i>	14
	I.5.3	<i>La infección</i>	17
	I.5.4	<i>Organogénesis del nódulo</i>	19
	I.5.5	<i>Diferenciación y fijación de nitrógeno</i>	21
	I.5.6	<i>Senescencia del nódulo</i>	23
	I.6	El problema de la competición para la nodulación	24
	I.7	Movilidad de las bacterias en el suelo	27
	I.8	Sistemas de movilidad	28
	I.8.1	<i>Quimiotaxis</i>	28
	I.8.2	<i>Flagelos</i>	30
	I.9	Objetivos de este Trabajo de Tesis	42
	I.9.1	<i>Objetivo general</i>	42
	I.9.2	<i>Objetivos específicos</i>	42
Capítulo II	Materiales y Métodos		
	II.1	Cepas y plásmidos	43
	II.2	Plantas	45
	II.3	Medios de cultivos para microorganismos y plantas.	45
	II.3.1	<i>Medios de cultivo de microorganismos</i>	45
	II.3.2	<i>Solución para el cultivo hidropónico de plantas</i>	46
	II.4	Procedimientos microbiológicos	46
	II.4.1	<i>Conservación de las bacterias</i>	46
	II.4.2	<i>Cultivos bacterianos y preparación de inóculos</i>	47
	II.4.3	<i>Estimación de la biomasa y recuento en placa</i>	47
	II.4.4	<i>Antibióticos</i>	48
	II.4.5	<i>Preparación de células electrocompetentes de E. coli</i>	48
	II.4.6	<i>Electrotransformación de células electrocompetentes de E. coli</i>	48
	II.4.7	<i>Conjugaciones triparentales</i>	49
	II.5	Técnicas de biología molecular	49
	II.5.1	<i>Preparación de ADN plasmídico</i>	49
	II.5.2	<i>Extracción de ADN total</i>	50
	II.5.3	<i>Extracción de ARN total</i>	50
	II.5.4	<i>Transcripción reversa</i>	51

## INDICE GENERAL (continuación)

II.5.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	51
II.5.6	Tratamientos enzimáticos del ADN	53
II.5.7	Electroforesis en geles de agarosa	53
II.5.8	Revelado de geles y fotografía	54
II.5.9	Secuenciación de los fragmentos de ADN	54
II.6	Manipulación de proteínas	54
II.6.1	Obtención de flagelina	54
II.6.2	Extracción de flagelina de cultivos crecidos en medio de Götz con diferentes fuentes de carbono	54
II.6.3	Obtención de proteínas extracelulares	55
II.6.4	Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	55
II.6.5	Tinción de las proteínas	55
II.6.6	Inmunodetección	56
II.6.7	Identificación de los polipéptidos mediante digestión trípica y MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometer)	56
II.7	Obtención de anticuerpos	56
II.8	Microscopía	57
II.8.1	Electrónica de Transmisión	57
II.8.2	Electrónica de barrido- Scanning electron microscope- (SEM)	57
II.8.3	Óptica	57
II.9	Ensayos Biológicos	57
II.9.1	Esterilización superficial y germinación de las semillas	57
II.9.2	Quimiotaxis	57
II.9.3	Adhesión	58
II.9.4	Infectividad	58
II.9.5	Determinación del potencial hídrico y movilidad en arena	60
II.9.6	Colonización en vermiculita a tiempos cortos	61
II.9.7	Colonizaciones a tiempos prolongados en jarra de Leonard (macetas Riviera)	61
II.9.8	Procesamiento de las muestras: aislamiento de bacterias de la rizósfera	62
II.9.9	Ensayos de competición para la nodulación	62
II.9.10	Extracción de nódulos y evaluación de experimentos de competición para la nodulación	63
II.10	Análisis bioinformático	63
Capítulo III	Caracterización de una cepa de <i>B. japonicum</i> con mayor movilidad	
III.1	Introducción	65

## INDICE GENERAL (continuación)

III.2	Caracterización fisiológica de la cepa más móvil <i>B. japonicum</i> LP 3008.	66
III.2.1	<i>Cinética de crecimiento</i>	66
III.2.2	<i>Quimiotaxis</i>	67
III.3	Estudio de los flagelos de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008	69
III.3.1	<i>Obtención de flagelina</i>	69
III.3.2	<i>Identificación de los polipéptidos por espectroscopía de masa.</i>	71
III.3.3	<i>Alineamientos de las secuencias amino y carboxilo terminales de Bll6865-6 y Bll5843-6.</i>	72
III.3.4	<i>Estructura de los flagelos de B. japonicum LP 3004 y LP 3008</i>	75
III.3.5	<i>Expresión diferencial de FliCI y FliCII en B. japonicum LP 3004 crecida con diferentes fuentes de carbono.</i>	76
III.4	Análisis molecular de los genes <i>fliCI-II</i> y <i>fliCI234</i>	79
III.4.1	<i>Análisis de las secuencias promotoras de fliCI (bll6866) y fliCII (bll6865) en B. japonicum LP 3004 y LP 3008.</i>	79
III.4.2	<i>Análisis de la expresión de fliCI-II y fliCI234</i>	80
III.5	Discusión	83
Capítulo IV	Estudios simbióticos y de la movilidad de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008 en medios con distintos contenidos de agua	
IV.1	Introducción	85
IV.2	Ensayos en medios líquidos- Interacciones tempranas con raíces de soja	86
IV.2.1	<i>Adhesión</i>	86
IV.2.2	<i>Infectividad</i>	87
IV.3	Ensayos en medios porosos	89
IV.3.1	<i>Colonización rizosférica a tiempos cortos</i>	90
IV.3.2	<i>Colonización a tiempos largos: distribución de B. japonicum en raíces de soja</i>	91
IV.3.3	<i>Movilidad en arena</i>	92
IV.3.4	<i>Competición para la nodulación en el campo</i>	95
IV.4	Discusión	96
Capítulo V	Construcción y caracterización de mutantes en las flagelinas de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008	
V.1	Introducción	99
V.2	Construcción de mutantes en los genes que codifican flagelinas en <i>B. japonicum</i>	100
V.3	Caracterización fenotípica de los mutantes.	109
V.3.1	<i>Purificación de flagelinas</i>	109
V.3.2	<i>Caracterización de las cepas mutantes mediante técnicas microscópicas</i>	109
V.3.3	<i>Movilidad en medio de Götz semisólido</i>	111

INDICE GENERAL (continuación)			
	V.4	Discusión	113
Capítulo VI		Competitividad de mutantes de <i>B. japonicum</i> defectivos en flagelos para la colonización rizosférica y la nodulación	
	VI.1	Introducción	116
	VI.2	Colonización radical	117
	VI.3	Competición para la nodulación	119
	VI.4	Discusión	123
Capítulo VII		Discusión General	
		Discusión	125
Capítulo VIII			
		Bibliografía	130

## INDICE DE FIGURAS

Figura I.1	Estructura del factor Nod de <i>B. japonicum</i>	12
Figura I.2	Microscopía electrónica de barrido de bacterias colonizando la rizósfera de soja	16
Figura I.3.	Hilo de infección de <i>Medicago sativa</i> cuando es infectado por una cepa de <i>S. meliloti</i> que expresa GFP	17
Figura I.4	Esquemas de cortes longitudinales de un nódulo indeterminado y un nódulo determinado	20
Figura I.5	Esquema general del desarrollo de un nódulo determinado	22
Figura I.6	Producción anual de granos de soja en Argentina desde las campañas 1980/81 a 2008/9	25
Figura I.7	Modelo de señalización de la quimiotaxis	29
Figura I.8	Esquema del <i>swimming</i> en <i>E. coli</i>	30
Figura I.9	Esquema del flagelo bacteriano de una bacteria	34
Figura I.10	Estructura y biosíntesis del flagelo bacteriano	37
Figura I.11	Esquemas del Sistema de Secreción de Tipo III y del flagelo bacteriano	39
Figura I.12	Microscopía electrónica de transmisión de un flagelo simple y uno complejo.	40
Figura I.13	Microscopía electrónica de transmisión del flagelo de <i>B. japonicum</i> 110 <i>spc4</i>	41
Figura II.1	Esquema del ensayo de adhesión	59
Figura II.2	Determinación de la infectividad en bolsas plásticas de crecimiento	60
Figura II.3	Esquema del ensayo de colonización	62
Figura II.4	Esquema general de los ensayos de competición en macetas y el procesamiento de los nódulos	64
Figura III.1	Movilidad de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008	66
Figura III.2	Cinética de crecimiento de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008	68
Figura III.3	Separación de las proteínas extracelulares de <i>B. japonicum</i> por SDS-PAGE	70
Figura III.4	Alineamiento y cladogramas de las flagelinas Bll6866 y Bll6865 con las proteínas Bll5843 a Bll5846 de <i>B. japonicum</i> USDA 110	73
Figura III.5	Morfología del flagelo de <i>B. japonicum</i>	76
Figura III.6	Separación de las flagelinas de <i>B. japonicum</i> por SDS-PAGE	77

## INDICE DE FIGURAS (continuación)

Figura III.7	Western blot de las flagelinas de <i>B. japonicum</i> LP 3004 crecidos con diferentes fuentes de carbono	78
Figura III.8	Cajas de movilidad de <i>B. japonicum</i> en agar semisólido suplementado con diferentes fuentes de carbono	79
Figura III.9	Organización genómica de las flagelinas de <i>B. japonicum</i> USDA 110	81
Figura III.10	RT-PCR de los posibles operones de genes de flagelina de <i>B. japonicum</i>	82
Figura IV.1	Adhesión a raíces de soja de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008	86
Figura IV.2	Infectividad de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008 en plantas de soja	89
Figura IV.3	Colonización de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y LP 3008 sobre raíces de soja	91
Figura IV.4	Microscopía electrónica de barrido de <i>B. japonicum</i> LP 3004, LP 3008 colonizando la rizósfera de soja	93
Figura IV.5	Desplazamiento de <i>B. japonicum</i> en medio poroso	94
Figura IV.6	Western blot de los flagelos de bacterias recuperadas del medio poroso	95
Figura IV.7	Ensayo a campo realizado con las cepas LP 3004 y LP 3008	96
Figura V.1	Estrategia de clonado empleada para realizar la delección de <i>fliCI</i> y <i>fliCII</i> en <i>B. japonicum</i>	102
Figura V.2	Estrategia de clonado empleada para realizar la delección de <i>fliCI23 y 4</i> en <i>B. japonicum</i>	106
Figura V.3	SDS-PAGE de las flagelinas de <i>B. japonicum</i> LP 3004, LP 3008 y sus mutantes derivadas	109
Figura V.4	Microscopía electrónica de transmisión de <i>B. japonicum</i> LP 3004, LP 3008 y sus mutantes derivadas	111
Figura V.5	Díametros de los halos de movilidad de <i>B. japonicum</i> LP 3004, LP 3008 y sus mutantes derivadas	113
Figura VI.1	Gráfico de la cantidad de agua retenida en las macetas a lo largo del tiempo	122



## INDICE DE TABLAS

Tabla I.1	Géneros de organismos procariotas fijadores de N <sub>2</sub>	5
Tabla I.2	Principales grupos de inoculación cruzada para algunos de los géneros de rizobios	8
Tabla II.1	Cepas bacterianas utilizadas en este estudio	42
Tabla II.2	Plásmidos utilizados en este estudio	43
Tabla II.3	Cebadores utilizados en este estudio	52
Tabla III.1	Quimiotaxis de <i>B. japonicum</i> hacia diferentes compuestos	68
Tabla VI.1	Colonización de <i>B. japonicum</i> LP 3004 y sus mutantes derivadas sobre raíces de soja a tiempos largos	118
Tabla VI.2	Competición para la nodulación en macetas con <i>B. japonicum</i> LP 3004, LP 3008 y sus mutantes derivadas	121
Tabla VI.3	Competición para la nodulación entre <i>B. japonicum</i> LP 3004 y su mutante sin flagelos en macetas con diferentes condiciones de potencial hídrico	123

## Abreviaturas

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
Ap	Ampicilina
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
bv	biovar
C	carbono
Cm	cloranfenicol
CPS	polisacárido capsular
DEPC	dietilpirocarbonato
dNTPs	desoxirribonucleótidos
DO	Densidad óptica
EPS	exopolisacárido bacteriano
FMS	solución mineral de Fåhraeus modificada
Gm	Gentamicina sulfato
Km	kanamicina sulfato
LPS	lipopolisacárido
MCP	<i>Methyl Accepting Chemotaxis Proteins</i> Receptores de quimiotaxis
ORF	<i>Open Reading Frame</i> Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PM	Peso molecular
PR	Punta de la raíz
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> especies reactivas del oxígeno
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
Sm	estreptomina
Sp	espectinomicina
TBE	Tris-borato-EDTA
TCA	ácido tricloroacético
TE	Tris-EDTA

*“Por microbios se entiende los seres vivos que tienen una estructura elemental y dimensiones tan mínimas que sólo pueden verse al microscopio. Se trata de un grupo de organismos llamados invisibles, cuya naturaleza microbiana sólo puede demostrarse por diversos procedimientos de laboratorio” (...)*

*“Los movimientos que presentan los microbios son muy distintos del browniano y de los debidos a las corrientes de la masa líquida en que se hallan sumergidos. Son de varias clases. Pueden ser extremadamente rápidos, hasta el punto de que el microbio atraviesa como una flecha el campo de la preparación. En otros casos, el movimiento es lento y consiste, a la vez, en un movimiento de oscilación y traslación. En otros casos se trata de una simple reptación, o bien un movimiento espiroideo, frecuentemente observado en los espiroquetos”.*

Dopter & Sacquépée (1927).  
En Bacteriología. 3<sup>rd</sup> ed.  
Salvat editores. S.A.  
Barcelona, España.

# Capítulo I

## Introducción

## I.1 Los microorganismos

La microbiología surgió como ciencia tras el descubrimiento de los microorganismos gracias al perfeccionamiento del microscopio. El naturalista holandés Antonie van Leeuwenhoek, en 1683, fue el primero en describir con la ayuda de lentes construidas por él mismo unos organismos a los que bautizó como "*animálculos*". Dos siglos después, entre 1857 y 1860, Pasteur revolucionó el conocimiento con sus investigaciones acerca de las fermentaciones llevadas a cabo por diferentes microorganismos. En el año 1876, Koch descubrió la bacteria responsable de la enfermedad del carbunco en animales domésticos (*Bacillus anthracis*). Este trabajo sobre el carbunco condujo rápidamente a la edad de oro de la bacteriología: en 25 años la mayoría de los agentes bacterianos de las principales enfermedades humanas habían sido descubiertos y descritos. En la segunda mitad del siglo XX, la microbiología ha estado profundamente involucrada en estudios sobre el código genético y los mecanismos de síntesis de proteínas, ADN y ARN. Asimismo, los microorganismos se utilizaron en muchos de los primeros estudios sobre la regulación de la expresión genética y el control de la actividad enzimática. Ya en la década de 1970, en base a los conocimientos y la manipulación de la microbiología, se comenzó a vislumbrar el advenimiento de la biología molecular, con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y de la ingeniería genética.

Los microorganismos son morfológicamente poco diferenciados, se reducen a formas como esferas o cilindros rectos o curvados, pero a esta "uniformidad" se oponen grandes versatilidades fisiológicas. Muchos grupos pueden vivir en ausencia de oxígeno (en condiciones anaeróbicas), y extraer la energía necesaria para el crecimiento a través de fermentaciones o respiraciones anaeróbicas. Otros grupos pueden utilizar la energía luminosa y obtener el material celular a partir de compuestos orgánicos o de anhídrido carbónico. Además, otras bacterias son capaces de obtener energía por oxidación de compuestos o elementos inorgánicos. También está ampliamente extendida la capacidad de fijar el nitrógeno molecular. Esta variabilidad se logra aún cuando los procariotas carecen de un núcleo rodeado por una membrana y de organelas que compartimentalicen la célula. En ellos, el ADN se presenta en forma de una hebra circular cerrada ubicada en el citoplasma y anclada a la membrana. Este cromosoma bacteriano lleva toda la información necesaria para la reproducción de la célula. Junto a este cromosoma pueden presentarse pequeñas moléculas circulares cerradas de ADN, los plásmidos; que poseen información adicional, en algunas ocasiones imprescindible

para la bacteria. Estos elementos pueden incluso ser transferidos horizontalmente y aportan a la variabilidad genética de las poblaciones que conviven en el mismo hábitat.

## I.2 El suelo como hábitat microbiano

El suelo es uno de los ambientes en el cual coexisten diversas comunidades microbianas, un hábitat en el cual la composición nutritiva, el pH, la disponibilidad de oxígeno y el contenido de agua varían permanentemente en el tiempo y en el espacio. En consecuencia, el crecimiento bacteriano es también variable. Entre los componentes de origen biológico del suelo, la mayor parte son raíces (tanto vivas como muertas), en segundo lugar se encuentran hongos y bacterias, y la fracción minoritaria está constituida por microfauna como protozoos, nematodos e insectos. La ubicación espacial de esta comunidad biótica se encuentra limitada por el tamaño de los poros del suelo. Por ejemplo, las bacterias pueden alojarse en poros de tan sólo 1  $\mu\text{m}$  de diámetro, las hifas de hongos necesitan de 2 a 5  $\mu\text{m}$  y organismos como los nematodos quedan excluidos de los poros. Estos últimos solamente pueden ubicarse y desplazarse por túneles abiertos por raíces, hormigas o termitas. En paralelo, el diámetro de los poros determina la capacidad de retención de agua del suelo y su desplazamiento por los canales, transportando iones y bacterias, antes que resulten adsorbidos a alguna superficie. Así, únicamente los poros de entre 0,2 y 30  $\mu\text{m}$  de diámetro podrán retener agua una vez que el suelo haya drenado luego del riego o la lluvia. En esta condición el suelo se encuentra a “capacidad de campo” y el agua retenida puede ser utilizada por raíces y microorganismos (Watt *et al.*, 2006). Acorde a sus propiedades fisicoquímicas, el agua también es capaz de adsorberse a partículas minerales y orgánicas por medio de interacciones dipolo-dipolo y puentes de hidrógeno, formando una película delgada que permanece líquida a  $-6^{\circ}\text{C}$  y se evapora a más de  $105^{\circ}\text{C}$ , y por ende no es utilizable por organismos vivos. Estas interacciones dan origen a las fuerzas mátricas que retienen agua en matrices sólidas o coloidales. Las fuerzas mátricas junto a la fuerza gravitacional, al potencial osmótico que generan los solutos disueltos en el agua y a la presión hidrostática a la cual el suelo está sometido, dan origen al potencial hídrico ( $\psi_h$ ) del suelo. Estos factores generan un  $\psi_h$  negativo y sus valores reflejan la disponibilidad de agua de un suelo. El  $\psi_h$  del agua pura es 0 megapascals (MPa), y por ello cuanto más cercano a este valor sea el  $\psi_h$  del suelo, mayor será la disponibilidad de agua. La

actividad microbiana es óptima a valores de  $\psi_h$  de - 0,01 MPa, y decrece a medida que se hacen más negativos (Paul & Clark, 1996).

Las raíces constituyen la mayor parte de la materia orgánica del suelo; las raíces que mueren reponen gran parte de la materia orgánica y las que se encuentran en crecimiento influyen fuertemente sobre la estructura y la aireación del suelo. La zona del suelo adyacente a las raíces y altamente influenciada por su actividad se denomina rizósfera, y se la puede describir como una zona de gradientes longitudinales y radiales de nutrientes. La extensión espacial de la rizósfera es variable, dependiendo de la estructura del suelo, del tamaño de las partículas, del contenido de agua y de las características de la planta. A su vez, la velocidad de difusión de los compuestos que se hallen presentes en el medio dependerá de sus características. Por ejemplo, compuestos solubles como el nitrato o compuestos volátiles, pueden difundir unos cuantos milímetros, mientras que otros nutrientes como los fosfatos son inmóviles y no difunden a más de un mm de la raíz (Watt *et al.*, 2006). Haciendo una distinción física de la rizósfera se pueden diferenciar tres zonas: 1) la endorizósfera, que es la parte interna de la raíz, 2) el rizoplano, superficie de la raíz, sobre la cual se genera una matriz llamada mucigel y 3) la ectorizósfera, que es la porción de suelo circundante y adherida a las raíces.

Diversas especies de plantas suelen exudar perfiles diferentes de metabolitos en sus rizósferas e incluso una misma planta puede variar el patrón de expresión de exudados a lo largo de su raíz. Además, esta expresión cambia de acuerdo a la edad y a factores de estrés. Los exudados radicales contienen entre un 5 y un 30 % del carbono fijado por la planta en la fotosíntesis y sus componentes se pueden clasificar en dos tipos, de bajo y alto peso molecular. Entre los primeros encontramos azúcares (como maltosa, arabinosa, glucosa, manosa, etc), aminoácidos (como arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamina, etc), ácidos orgánicos (ascórbico, acético, málico, benzoico, etc) y compuestos fenólicos (Ramos, 2004). Entre los de alto peso molecular se encuentran polisacáridos liberados por las células epidérmicas de la punta de la raíz, mayoritariamente el mucigel. Esta sustancia está altamente hidratada y se asocia a partículas de suelo. Su función estaría asociada a la lubricación y protección de las raíces (Bertin *et al.*, 2003). Otros compuestos liberados pueden ser enzimas, flavonoides, esteroides, alcaloides, nucleótidos, vitaminas, poliacetilenos, muchos de los cuales son productos del metabolismo de la planta, mediadores de respuestas de defensa, o señales de reconocimiento con un microorganismo. Debido a la alta heterogeneidad en las

rizodeposiciones, la composición de las poblaciones microbianas asociadas a las rizósferas varía entre especies de plantas.

Se puede considerar entonces que la influencia de las raíces es decisiva para la multiplicación y dispersión de los microorganismos, e incluso algunos autores consideran a la rizósfera como “un oasis en un desierto” (Bertin *et al.*, 2003). Por ello, no es extraño que las poblaciones bacterianas de esta zona sean de uno a tres órdenes de magnitud más grandes que las del suelo no rizosférico (Morgan *et al.*, 2005).

Los microorganismos que habitan el suelo (también los que pertenecen a hábitats acuáticos) cumplen roles muy importantes en la transformación de los nutrientes. Durante su crecimiento y como consecuencia de sus diversos metabolismos, son capaces de intervenir en los ciclos biogeoquímicos de compuestos como carbono, azufre, nitrógeno, fósforo, hierro y manganeso. Así, los procariotas resultan irremplazables en el ciclado de estos nutrientes, donde transforman los compuestos por medio de reacciones de oxido-reducción. El N es un compuesto muy importante para la vida, siendo uno de los principales componentes de macromoléculas como los ácidos nucleicos y las proteínas. Paradójicamente, siendo el N<sub>2</sub> el gas más abundante en la atmósfera terrestre (aproximadamente 80%), no es utilizable como fuente de N por parte de las plantas, los animales y la mayoría de los microorganismos. Estos organismos son capaces de asimilarlo sólo como nitrógeno combinado, principalmente aminoácidos, amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) o nitratos (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en un proceso denominado asimilación. El ciclo biogeoquímico del N está compuesto por varias etapas en las que intervienen diferentes grupos de microorganismos. La amonificación (a cargo de hongos y bacterias) genera NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a partir de la descomposición de materia orgánica. La nitrificación ocurre en condiciones aeróbicas y es la oxidación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> a nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) y este a su vez a NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La desnitrificación es una respiración anaeróbica que cataliza la transformación de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> a N<sub>2</sub> y N<sub>2</sub>O, aunque se puede acumular también NO<sub>2</sub><sup>-</sup>. Sin embargo, el N de la biósfera se perdería irremediablemente como N<sub>2</sub> gaseosos si no fuera por la reacción que cierra el ciclo: la fijación de N<sub>2</sub> por medio de la cual esta molécula se reduce a NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. La fijación del N<sub>2</sub> está a cargo de diferentes grupos denominados diazotrofos, los cuales pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a la forma de vida en la cual fijan N<sub>2</sub>: vida libre, rizocenosis diazotróficas (asociaciones inespecíficas a las raíces) y asociaciones de tipo simbiótico. Cada uno de estos grupos presenta diferentes metabolismos energéticos y fijan el N<sub>2</sub> en diferentes condiciones (Tabla I.1). Las asociaciones simbióticas conducen a la formación de estructuras especializadas en las



Tabla I.1 Géneros que incluyen organismos procariotas fijadores de N<sub>2</sub>.

Forma en la que fijan N <sub>2</sub>	Géneros que incluyen especies fijadoras de N <sub>2</sub>	Características principales	
Vida libre	<i>Chromatium, Chlorobium, Thiopedia, Ectothiospira</i>	Fotótrofos, anaerobios obligados	
	<i>Clostridium, Desulfovibrio, Desulfomaculum, Methanococcus, Methanosarcina</i>	Heterótrofos, anaerobios obligados	
	<i>Rhodospirillum, Rhodopseudomonas</i>	Fotótrofos, anaerobios facultativos	
	<i>Klebsiella, Bacillus, Enterobacter, Citrobacter, Escherichia, Propionibacterium</i>	Heterótrofos, anaerobios facultativos	
	<i>Spirulina, Oscillatoria, Pseudoanabaena, Lyngbia, Plectonema, Phormidium, Synechococcus, Dermocarpa, Xenococcus, Myxosarcina, Chroococcidioopsis, Pleurocapsa</i>	Fotótrofos, microaerobios	
	<i>Xanthobacter, Thiobacillus, Aquaspirillum, Campylobacter, Arthrobacter, Methylocistus, Methylococcus, Methilomonas, Methylobacter, Azospirillum</i>	Heterótrofos, microaerobios	
	<i>Cylindrosperma, Chlorogloeopsis, Fischerella, Gloeotheca</i>	Cianobacterias (fotótrofos), aerobios	
	<i>Azotobacter, Azotococcus, Azomonas, Beijerinckia, Derxia</i>	Heterótrofos, aerobios	
	Rizocenosis diazotróficas	<i>Azospirillum, Azotobacter, Gluconacetobacter</i>	Heterótrofos
	Simbióticas	<i>Anabaena, Nostoc, Scytonema, Stigonema, Calothrix, Dicothrix</i>	Fotótrofos
<i>Rhizobium, Azorhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium, Allorhizobium</i>			
<i>Frankia</i>		Heterótrofos	
<i>Burkholeiria</i>			
<i>Wautersia</i>			

raíces llamadas nódulos, donde ocurre la fijación biológica del  $N_2$  y más raramente también en los tallos, por ejemplo en *Sesbania spp.* Las plantas superiores forman este tipo de simbiosis fijadora de nitrógeno: las dicotiledóneas leñosas (árboles y arbustos leñosos) lo hacen con bacterias filamentosas del género *Frankia* y las leguminosas lo hacen con bacterias Gram negativas conocidas colectivamente como rizobios. La simbiosis rizobio-leguminosa ha sido ampliamente estudiada debido su interés agronómico.

### I.3 Importancia de la fijación de $N_2$

En climas templados, la fracción de materia orgánica de los suelos denominada humus, constituye una abundante reserva de nitrógeno relativamente estable. El nitrógeno del humus llega a estar disponible para ser incorporado por los organismos vivos sólo tras una lenta mineralización (transformación que no es mediada por microorganismos), proceso que suele demandar décadas o siglos. En las regiones de clima tropical, en cambio, la temperatura y humedad favorecen el proceso de mineralización. Entretanto, las bacterias fijadoras de  $N_2$  en vida libre reducen el  $N_2$  a  $NH_4^+$  por medio de una reacción enzimática muy costosa energéticamente y de esta forma incorporan N inorgánico. El  $NH_4^+$  incorporado es asequible para otros grupos bacterianos, que pueden oxidarlo a nitritos ( $NO_2^-$ ) y nitratos ( $NO_3^-$ ). Los iones  $NH_4^+$ ,  $NO_2^-$ , y  $NO_3^-$ , se combinan para formar sales muy solubles en agua y consecuentemente se distribuyen en la ecósfera en soluciones acuosas, formando pequeños reservorios de reciclado activo. Pero al ser estos compuestos muy importantes para el crecimiento vegetal se agotan rápidamente. Las bacterias fijadoras en simbiosis transforman por medio de la misma reacción el  $N_2$  en  $NH_4^+$  que es incorporado a aminoácidos y ureídos, que en este caso son cedidos a la planta, de la cual obtienen a cambio carbono (C) como nutriente. Esta capacidad de reducir el  $N_2$  se ha explotado en la agricultura realizando biofertilizaciones del cultivo de leguminosas con su par simbiótico.

Existen tres formas de incorporación de  $N_2$  a la biósfera: el proceso industrial de Haber-Bosch, en el cual se utilizan altas presiones y temperaturas para transformar el  $N_2$  a  $NH_4^+$  (proceso principalmente empleado para producir fertilizantes), la fijación natural que ocurre como consecuencia de las descargas eléctricas y la fijación biológica de  $N_2$ .

Se ha estimado que la fijación anual de  $N_2$  es de 300 millones de toneladas métricas por año, de las cuales 45 son aportadas por la fijación biológica de  $N_2$  relacionada al uso de biofertilizantes, principalmente al conjunto rizobios y leguminosas (Socolow, 1999). Sin embargo, como consecuencia del crecimiento de la población y la demanda mundial de alimentos, el N antropogénico incorporado al ciclo ha aumentado. El uso de fertilizantes químicos, por ejemplo urea, genera lixiviación, eutrofización de ambientes terrestres y acuáticos, pérdida del ozono estratosférico (Gruber & Galloway, 2008) y consume recursos no renovables. Por ello, es deseable que la incorporación del N ocurra por medio de biofertilizantes, que resultan más económicos y no contaminan el medio ambiente. Entre los biofertilizantes más importantes encontramos a los rizobios.

## I.4 Rizobios

### I.4.1 Clasificación

La primera clasificación de los rizobios se instauró de acuerdo a la leguminosa con la cual establecían simbiosis, empleándola como epíteto luego del género *Rhizobium*. Por ejemplo, *R. trifoli* para aquél capaz de infectar trébol, *R. phaseoli* para el que infecta poroto, *R. leguminosarum* para aquellos que infectan arveja y *Vicia*, *R. meliloti* para los que nodulan alfalfa y *Melilotus*, y finalmente *R. japonicum* a los que nodulan soja. Sin embargo, a medida que se fue incrementando el número y la diversidad de aislamientos caracterizados, surgieron cada vez más excepciones ante este criterio. En 1984 en el Manual Bergey de sistemática se propusieron cuatro géneros para la familia *Rhizobiaceae*: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Agrobacterium* y *Phyllobacterium*. Luego, la clasificación ha ido sufriendo modificaciones y en la actualidad se ha sumado la caracterización molecular basada en la secuencia del ADN ribosomal 16S. Hoy, los rizobios están distribuidos entre  $\alpha$  y  $\beta$ -proteobacterias, ubicándose en nueve grupos monofiléticos, interpuestos con bacterias que no son simbiosis de leguminosas; y se han confirmado 44 especies de bacterias que fijan  $N_2$  en simbiosis con leguminosas, distribuidas en 12 géneros (Sawada *et al.*, 2003). No profundizaremos en la filogenia de este grupo, pero sí presentaremos los grupos de inoculación cruzada para los géneros más conocidos (Tabla I.2). Cuando empleemos el término rizobio, estaremos haciendo referencia a todos los representantes bacterianos que pueden nodular y fijar  $N_2$  en

Tabla I.2 Principales grupos de inoculación cruzada para algunos de los géneros de rizobios.

Rizobio nodulante y fijador de N <sub>2</sub>	Leguminosa Huésped
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Acacia</i> spp., <i>Lotus arabicus</i> , <i>Faidherbia albida</i> .
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>Glycine soja</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i>
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	<i>Lotus uliginosus</i> , <i>L. pedunculatus</i> , <i>Vigna</i> spp., <i>Lupinus</i> spp., <i>Leucaena</i> spp., <i>Sesbania rostrata</i> , <i>Lablab</i> spp., <i>Arachis hypogea</i> y otras leguminosas tropicales
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>Acacia albida</i> , <i>Lupinus densiflorus</i> , <i>Cicer arietinum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Mimosa</i> spp., <i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>Mesorhizobium huakuii</i>	<i>Astragalus sinicus</i>
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	<i>Cicer</i> spp
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	<i>Cicer</i> spp
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	<i>Glycyrrhiza</i> spp, <i>Glycine max</i> , <i>Sophora alopecuroides</i> , <i>Swainsonia salsula</i> , <i>Caragana polourensis</i> , <i>Halimodendron holodendron</i>
<i>Mesorhizobium plurifarium</i>	<i>Acacia</i> spp, <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Neptunia oleracea</i>
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	<i>Amorpha fruticosa</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia hirsuta</i> , <i>V. sativa</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens</i> spp.
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium repens</i> , <i>T. subterraneum</i> , <i>T. pratense</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>P. angustifolius</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>P. angustifolius</i>
<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>P. angustifolius</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>L. esculenta</i> , <i>Dalaea leporina</i> , <i>Vigna vexillata</i> , <i>Crotalaria pumila</i> y otras leguminosas tropicales

Tabla I.2 (continuación)

Rizobio nodulante y fijador de N <sub>2</sub>	Leguminosa Huésped
<i>Rhizobium gallicum</i>	<i>Phaseolus spp</i>
<i>Rhizobium giardinii</i>	<i>Phaseolus spp</i>
<i>Rhizobium hainanense</i>	Acacia, Arachis, Centrocema
<i>Rhizobium huautlense</i>	Sesbania rostrata
<i>Rhizobium mongolense</i>	Phaseolus, Leucaena
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	Medicago sativa, M. truncatula, Melilotus alba, Trigonella spp.
<i>Sinorhizobium fredii</i>	Glycine max, G. soja, Macroptilium, atropurpureum, M. lathyroides, Vigna radiata, V. unguiculata, Cajanus cajan, Phaseolus vulgaris, Sesbania cannabina
<i>Sinorhizobium medicae</i>	Medicago spp
<i>Sinorhizobium teranga</i>	Acacia spp.
<i>Sinorhizobium kostiense</i>	Acacia senegal, Prosopis chilensis
<i>Sinorhizobium xinjiangense</i>	Glycine max

asociación con plantas leguminosas, representando un grupo polifilético (Turner & Young, 2000).

#### 1.4.2 Hábitat y estilos de vida

Los rizobios son bacilos Gram negativos capaces de vivir de dos o incluso podrían considerarse tres formas diferentes. En primer lugar, pueden hacerlo como bacterias saprófitas del suelo, donde no son capaces de fijar N<sub>2</sub>, pero sí de consumir diversas fuentes de C y persistir durante largos períodos. Sin embargo, la vida saprofítica puede incluir dos estados. En uno de ellos los rizobios pueden moverse por medio de flagelos, que de acuerdo a la especie, varían en número, composición y localización en la superficie celular. Los flagelos bacterianos son activados por los sistemas quimiotácticos capaces de sensar nutrientes y peligros del medio ambiente. Este estilo de vida también se define como estado planctónico. Alternativamente a este estado pueden formar biopelículas (en inglés, *biofilms*), donde los rizobios tampoco son capaces de fijar N<sub>2</sub>, y adquieren una organización que les ofrece protección ante sustancias tóxicas, radiaciones ultravioletas, desecación y otros peligros. Estas biopelículas se

establecen sobre superficies bióticas o abióticas. Su formación comienza con la adhesión reversible de las bacterias a la superficie, momento en el cual aún son capaces de retornar al estado planctónico. Luego, las células pierden el flagelo y comienzan a secretar sustancias poliméricas que ayudarán a la adhesión firme de las bacterias, y a la formación de la estructura típica de las biopelículas. En su arquitectura se observan canales por los que circulan agua y nutrientes. Una vez que estas estructuras maduran, y de acuerdo a señales como por ejemplo la escasez de nutrientes, las células pueden retornar al estado planctónico, desprendiéndose de la matriz y expresando nuevamente el flagelo. En algunas especies se pudo correlacionar el desprendimiento con la producción de enzimas que degradan los polisacáridos (Stoodley *et al.*, 2002). Este desprendimiento permite a los rizobios colonizar nuevos hábitats, ya sea la rizósfera de una raíz en crecimiento u otra superficie en la que se encuentren nutrientes disponibles. Este estilo de vida comunitario puede establecerse incluso entre diferentes especies bacterianas, y se encuentra estrechamente relacionado a la densidad celular (*Quorum Sensing* o abreviado *QS*). Estos conocimientos han revolucionado la microbiología, pues demostraron que los procariotas también pueden vivir en colectividades y comunicarse, estructurando funcionalmente distintos grupos celulares. La formación de biopelículas en la familia *Rhizobiaceae* se ha descrito para especies como *S. meliloti*, *R. leguminosarum* y *B. japonicum* en ensayos *in vitro* (Fujishige *et al.*, 2006; 2008; Perez-Gimenez *et al.*, 2009). Realizando un análisis de mutantes en EPS y en flagelos, se encontró que si bien ambos son defectivos para formar biopelículas (Fujishige *et al.*, 2006; Perez-Gimenez *et al.*, 2009; Vanderlinde *et al.*, 2010), el requerimiento del EPS depende de su composición (Quelas *et al.*, 2010). Asimismo, se ha reportado que mutantes en glicanasas de *R. leguminosarum* *vb. viciae* encargadas de clivar el propio exopolisacárido bacteriano, se ven afectados en la formación de biopelículas; probablemente como consecuencia de la alteración en el tamaño de estas macromoléculas (Russo *et al.*, 2006). También se ha sugerido que los géneros *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* podrían establecer este tipo de estructuras sobre el micelio de diferentes hongos (Seneviratne & Jayasinghearachchi, 2003).

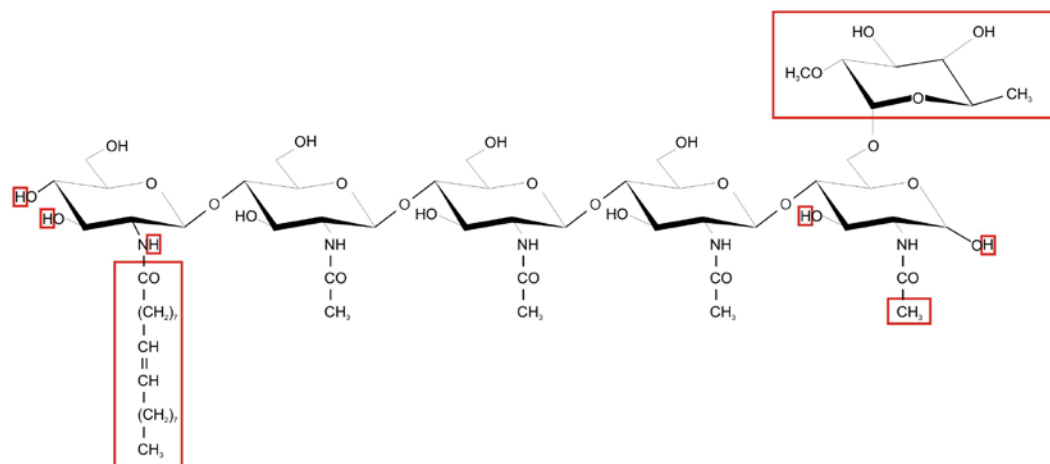
Finalmente, la otra forma de vida posible para los rizobios es como simbioses dentro de su hospedador vegetal, la leguminosa. Esta simbiosis es altamente específica en algunos casos y para establecerse requiere de un intercambio de señales moleculares entre ambos simbioses. En este estilo de vida, los rizobios sufren una importante diferenciación a un nuevo estadio denominado bacteroide. Adquieren formas

irregulares, inmóviles, fijan  $N_2$  y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como fuentes de C. Se produce una transferencia del C desde la planta al rizobio diferenciado, donde es oxidado para producir la energía requerida para la fijación del  $N_2$ . El N reducido es translocado a la planta que entonces puede crecer aún en suelos desprovistos de N combinado (Lodwig & Poole, 2003), y es en este punto en el cual reside el interés agroeconómico de la interacción. A continuación, realizaremos una breve reseña de los procesos que ocurren en la simbiosis rizobio-leguminosa.

## I.5 Simbiosis rizobio- leguminosa

### I.5.1 Reconocimiento de los simbiosis

Antes del contacto físico de los simbiosis existe un intercambio de señales moleculares entre ellos. La primera señal es liberada por las raíces de la planta en la rizósfera ante la escasez de nitrógeno en el suelo (Coronado *et al.*, 1995). Estas señales son flavonoides que también intervienen en otros procesos como las respuestas de defensa ante patógenos o la protección ante la luz ultravioleta. Cada leguminosa exuda un conjunto característico de flavonoides que activan específicamente a los genes de nodulación (genes *nod*) del rizobio simbiótico (Brill *et al.*, 2001; Perret *et al.*, 2000). En primera instancia, los flavonoides interactúan con las proteínas citoplasmáticas NodD, factores de transcripción que estimulan la expresión de genes que codifican proteínas necesarias para la síntesis de una molécula rizobiana que actuará como señal sobre la planta. Dicha molécula se denomina factor Nod. El factor Nod, o lípoquitooligosacárido, tiene un esqueleto de  $\beta$ -1,4-N-acetil-D-glucosamina, y presenta de tres a cinco monómeros. En el grupo amino correspondiente al azúcar del extremo no reductor se une una marcada variedad de ácidos grasos formando uniones amida, los cuales, dependiendo de cada factor Nod, tendrán diferente grado de saturación. Sobre esa estructura básica, y dependiendo de la especie de rizobio, se encuentran modificaciones o sustituciones muy variadas tanto en el extremo reductor como en el no reductor (Figura I.1) (Perret *et al.*, 2000). Los genes esenciales para formar el esqueleto del factor Nod se encuentran en el operón *nodABC*, mientras que otros genes como *noe* y *nol* se encuentran en distintos operones y codifican para las enzimas que sintetizan las sustituciones que conferirán la especificidad con el hospedador. Estos sustituyentes pueden ser fucosas, sulfatos, acetilos, metilos, carbamoilos, y otros. En paralelo, se



**Figura I.1** La estructura básica de los factores de nodulación consiste en un oligómero de N-acetil-β-D-glucosamina sustituido en sus extremos. En la figura se observa uno de los tres factores de nodulación producidos por *B. japonicum*. Señaladas en rojo se encuentran las modificaciones correspondientes. En su extremo no reductor, los factores nod de *B. japonicum* pueden encontrarse sustituidos por ácidos grasos 18:1 (ejemplo de la figura), 16:0 o 16:1.

introducen diferencias en las cadenas de ácidos grasos del extremo no reductor (Perret *et al.*, 2000). Muchas especies bacterianas expresan más de un factor Nod, y por ello es difícil predecir el huésped únicamente con este dato. Un estudio reciente demostró que *Rhizobium tropici* CIAT899 expresa 52 tipos de factor Nod en condiciones ácidas, comparados con 29 en condiciones neutras, habiendo únicamente 15 estructuras comunes entre ambas (Moron *et al.*, 2005). Asimismo, existen especies como *R. etli* y *M. loti* que expresan el mismo factor Nod y, sin embargo, nodulan distintos hospedadores, *Phaseolus* spp. y *Lotus* spp., respectivamente. Del mismo modo, se ha observado que dos especies que expresan diferentes lipoquitoligosacáridos pueden nodular la misma planta hospedadora. Por ejemplo, *R. tropici* (sustituído con un grupo sulfato) y *R. etli* (sustituído con una acetilfucosa), ambos nodulan *Phaseolus vulgaris* (Perret *et al.*, 2000).

Más recientemente se ha demostrado que en dos cepas de *Bradyrhizobium* sp. capaces de realizar fotosíntesis (BTAi1 y ORS278) los genes centrales *nodABC* y por ende los factores Nod, no son necesarios para establecer la simbiosis (Giraud *et al.*, 2007). Como se puede apreciar, la especificidad de este diálogo molecular no es tan estrecha como se creyó en un principio (Bauer *et al.*, 1994; Dénarié *et al.*, 1996).

Se conocen otros conjuntos de moléculas que también ayudan a esta interacción y son expresadas tanto por la planta como por la bacteria. Entre las expresadas por la planta se encuentran: betaínas, xantonas, ácidos aldónicos, compuestos fenólicos, lectinas y jasmonatos. Entre las expresadas por el rizobio pueden encontrarse proteínas



secretadas por los sistemas de transporte tipo I y tipo III, polisacáridos de superficie implicados en el reconocimiento con lectinas vegetales y moléculas relacionadas al QS (Cooper, 2007).

Este intercambio de señales ocurre en la rizósfera, donde las concentraciones de los metabolitos (del orden de nano o picomolar) y el transporte de los mismos dependen de factores ambientales. La distancia que deban recorrer los flavonoides hasta ser percibidos por los rizobios cumplirá un rol determinante en el establecimiento de la simbiosis. Por ejemplo, el tiempo (t) que emplea un soluto para recorrer una distancia “a” está dado por:

$$t = a^2 / D$$

donde D es la difusividad del soluto en el medio. De acuerdo con esta ecuación un microorganismo que se encuentra dentro de la rizósfera, a unos 30  $\mu\text{m}$ , puede recibir una señal mil veces más rápido que uno que se encuentra a 1000  $\mu\text{m}$  en el suelo circundante (Watt *et al.*, 2006). Por otro lado, ¿podrá una bacteria detectar los metabolitos y dirigirse hacia donde se encuentran? ¿Cuán significativas serán estas distancias para los microorganismos? En principio, los sistemas de quimiotaxis y movilidad serán los encargados de mediar este tipo de respuestas, siempre subordinados a las condiciones del ambiente. En el caso de rizobios de crecimiento rápido, como *S. meliloti*, *R. leguminosarum bv phaseoli* y *R. leguminosarum bv viciae* se ha observado, *in vitro*, una correlación entre la quimiotaxis hacia flavonoides y la expresión de los genes *nod* (Aguilar *et al.*, 1988; Armitage *et al.*, 1988). No obstante, en *B. japonicum*, rizobio de crecimiento lento, no se ha observado quimiotaxis positiva hacia genisteína y diadzeína, dos isoflavonas que son capaces de estimular la expresión de los genes de nodulación secretadas por las raíces y semillas de soja (Barbour *et al.*, 1991). Por el contrario, sí se ha observado un efecto positivo de la quimiotaxis hacia ácidos orgánicos, ácidos hidroxiaromáticos y aminoácidos como aspartato y glutamato, compuestos presentes en los exudados radicales (Barbour *et al.*, 1991; Cooper, 2007; Kape *et al.*, 1991). Si bien en la década de 1980 se realizaron muchos trabajos relacionando la quimiotaxis de los rizobios con su capacidad de infectar leguminosas, los experimentos no se llevaron a cabo en el medio natural donde ocurre esta interacción, sino en soluciones acuosas. Por ello no se puede hacer una interpretación lineal de los resultados para dilucidar el verdadero rol de la quimiotaxis y la movilidad en la infección.

Finalmente, las leguminosas expresan receptores de transmembrana específicos de factores Nod, o *NFPs* (del inglés, *Nod Factor Perception*) y de esta manera son capaces de reconocerlos aún a concentraciones del orden de picomolar. Estos receptores presentan dominios extracelulares capaces de reconocer glucanos como la N-acetilglucosamina, un dominio transmembrana y un dominio quinasa citosólico (Mulder *et al.*, 2006). Se han caracterizado algunas de estas proteínas, por ejemplo en *Medicago truncatula* *NFP* y *LYK3* (Amor *et al.*, 2003; Smit *et al.*, 2007), en *Lotus japonicus* *NFR1* y *NFR5* (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003), y en *Pisum sativum* *SYM10* y *SYM2* (Limpens *et al.*, 2003; Walker *et al.*, 2000). Sin embargo, aún resta conocer con precisión las bases moleculares de este reconocimiento. Sí se ha descrito que en la planta se genera una cascada de señalización que induce múltiples respuestas necesarias para la infección como: la deformación del pelo radical, la despolarización de la membrana, las oscilaciones de calcio intracelular, la reactivación de la división celular en las células corticales, y la activación de la transcripción de genes necesarios para la infección (Jones *et al.*, 2007).

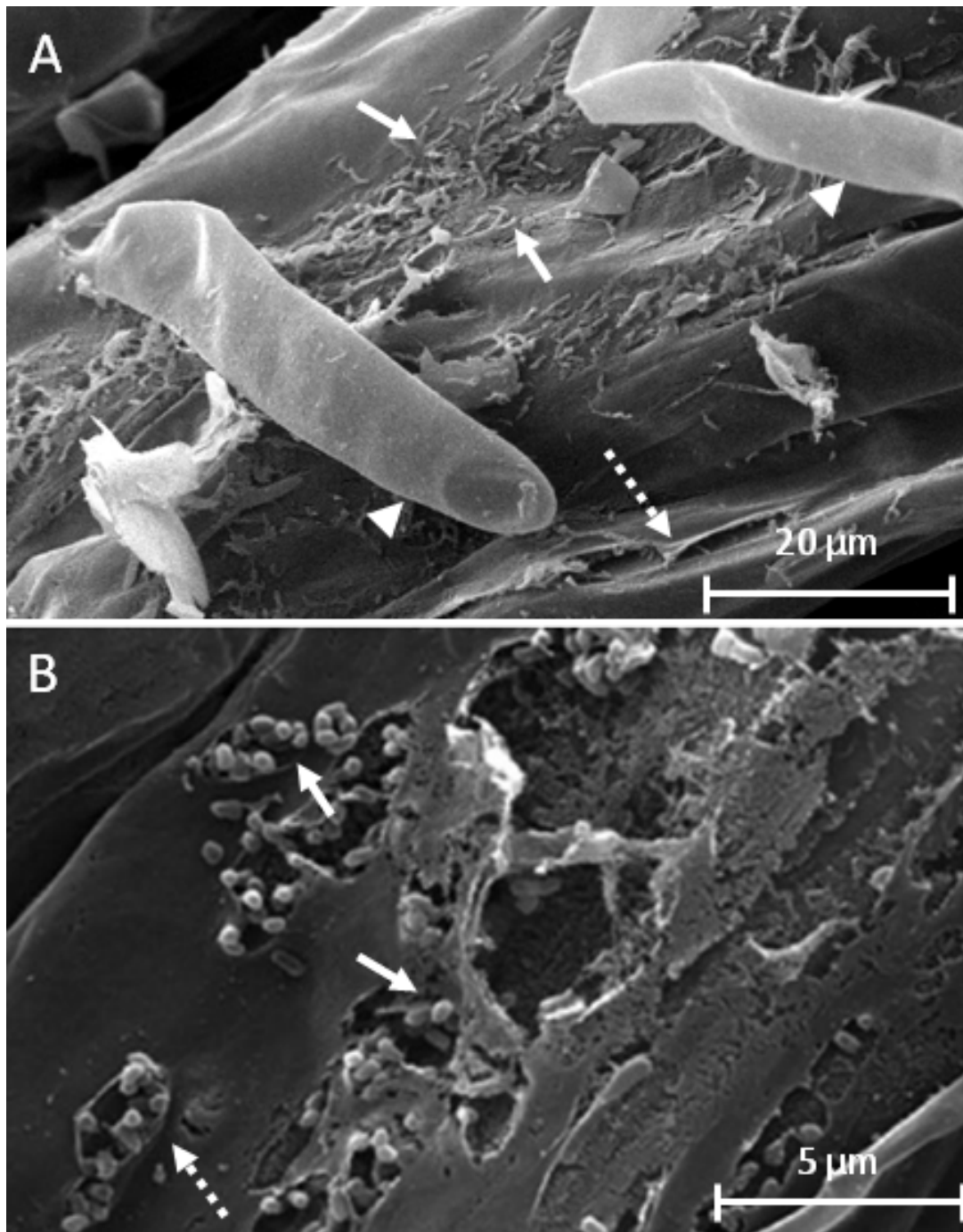
#### *I.5.2 Primer contacto físico: Colonización y adhesión de los rizobios a las raíces*

En la simbiosis rizobio-leguminosa se ha estudiado poco el fenómeno de colonización radical, pues la mayoría de los intereses se han focalizado en la adhesión y la infección, que si bien son eventos vitales para la nodulación, son posteriores y se encuentran subordinados a una colonización eficiente. La colonización de las raíces puede considerarse una mera ocupación de la superficie radical, como así también puede pensarse como el establecimiento de una biopelícula sobre la misma. En ambos casos, las bacterias deben ser capaces de desplazarse activamente sobre la raíz o desde el medio circundante hacia la raíz y posteriormente adherirse (Figura I.2). En el caso de formarse una biopelícula, debe existir alguna señal, por ejemplo *QS*, que induzca su formación. La colonización radical ha sido estudiada en bacterias como *Pseudomonas fluorescens* u otras *Pseudomonas* de la rizósfera, siendo esta especie una de las mejores colonizadoras. Entre los factores estudiados, se encontró que la quimiotaxis y la movilidad son fundamentales para una colonización exitosa (de Weert *et al.*, 2002; De Weger *et al.*, 1987; Lugtenberg *et al.*, 2001).

En la rizósfera existe una alta población microbiana asociada a las raíces e incluso la adhesión de los rizobios a las raíces de leguminosas puede establecerse aún sin haber ocurrido el reconocimiento simbiótico. En este proceso se encuentran implicadas

moléculas bacterianas como pueden ser proteínas de superficie, polisacáridos extracelulares, fimbrias o flagelos, y también participan proteínas y pequeñas moléculas exudadas por las raíces. Algunos estudios sugirieron que existe cierta especificidad simbiótica durante la adhesión (Caetano-Anolles & Favelukes, 1986a; Lodeiro *et al.*, 1995), pero estudios más recientes indican que, si bien existen modos específicos de adhesión (mediados por ciertas adhesinas bacterianas), los mismos no estarían relacionados con la simbiosis, sino con el reconocimiento de patrones moleculares sobre raíces de diversas plantas (Mongiardini *et al.*, 2008).

Las lectinas vegetales son proteínas que tienen al menos un dominio no catalítico de unión a un mono u oligosacárido y se encuentran en altas cantidades en las semillas y en otros sitios de la planta como hojas, tallos y raíces. Estas pueden servir como receptores de polisacáridos de superficie del rizobio. Además las lectinas están implicadas en parte en la especificidad simbiótica, por ejemplo, la expresión de la lectina de soja en *Lotus corniculatus* transgénico, permitió que la planta sea nodulada por *B. japonicum* (van Rhijn *et al.*, 1998). Entre las proteínas de la bacteria que median la interacción han sido estudiadas la ricadesina de *R. leguminosarum* *bv. viciae* (Smit *et al.*, 1989b), la RapAI de *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Ausmees *et al.*, 2001; Mongiardini *et al.*, 2008) y la BJ38 de *B. japonicum* (Loh *et al.*, 1993; Mongiardini, 2008). En términos generales, se ha descrito al proceso de adhesión de los rizobios a las leguminosas en dos etapas. En una primera etapa ocurre una adhesión débil y reversible, donde las lectinas de leguminosas pueden reconocer un carbohidrato de superficie del rizobio, y también proteínas como la ricadesina y la RapAI estarían implicadas en la unión. En una segunda etapa intervienen fibras de celulosa bacteriana, ya sea producida antes o después de la adhesión de las bacterias. Estas fibrillas causarían una unión irreversible y la formación de agregados bacterianos en la superficie del hospedador (Ausmees *et al.*, 1999; Dazzo *et al.*, 1984; Laus *et al.*, 2005). De forma análoga a lo que sucede en la adhesión de los rizobios, las bacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Azospirillum brasilense* también presentan una adhesión a raíces de trigo en dos pasos (Michiels *et al.*, 1991). Un primer paso de unión débil y reversible, donde actúan estructuras de superficie de la bacteria como cápsula y flagelos; y un segundo paso de unión irreversible mediado por el exopolisacárido bacteriano. *A. brasilense* posee dos tipos de flagelos, siendo el flagelo polar el mediador de la adhesión en el primer paso a raíces de trigo (Croess *et al.*, 1993). En los rizobios, particularmente en *S. meliloti*, existe un trabajo del año 1988 donde se



**Figura 1.2** Microscopía electrónica de barrido mostrando colonizaciones radicales. **A)** *B. japonicum* colonizando la rizósfera de soja (Este trabajo). **B)** *P. fluorescens* 113 colonizando la raíz de alfalfa (Barahona *et al.*, 2010). Con flechas continuas se indican las bacterias; con flechas discontinuas el mucigel en las regiones que se ha agrietado y con punta de flecha se indican los pelos radicales en **(A)**.

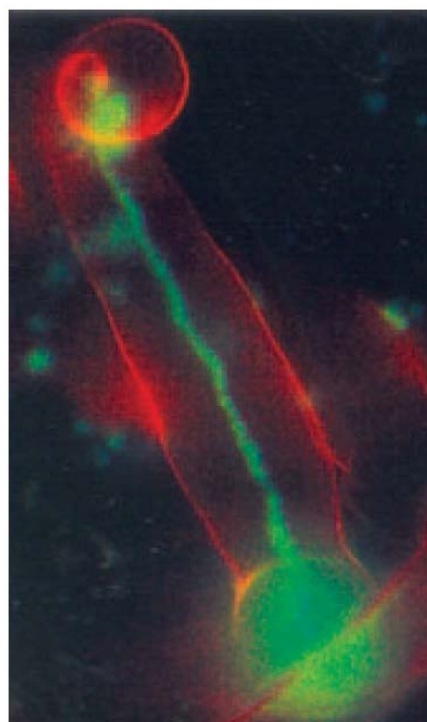
alude al flagelo como necesario para la adhesión (Caetano-Anolles *et al.*, 1988). Más recientemente, se demostró que estos filamentos son necesarios para iniciar la formación de las biopelículas de *S. meliloti* (Fujishige *et al.*, 2006).

Por otra parte, sumado a las características intrínsecas de cada individuo, los procesos de adhesión bacteriana a las raíces dependen también de variables como la densidad del inóculo, el pH, las condiciones de la incubación, y la fase de crecimiento de

la bacteria (Albareda *et al.*, 2006). Como consecuencia, es difícil realizar la comparación de distintos trabajos, que aún habiendo empleado los mismos sistemas vivos, presentarán variaciones inherentes a la técnica. Adicionalmente, si se quiere analizar la función de los flagelos como adhesinas, es sabido que varían su expresión durante las fases del crecimiento (Amsler *et al.*, 1993).

### 1.5.3 La infección

En una raíz se pueden distinguir tres zonas con diferente grado de maduración de los pelos radicales. Desde la base hacia la parte apical se distinguen la zona I, donde se encuentran los pelos maduros, la zona II, donde se encuentran los pelos en crecimiento y la zona III, donde no hay pelos radicales. Únicamente los pelos en crecimiento pertenecientes a la zona II pueden ser infectados por los rizobios ya que para ello se requiere una deformación característica del pelo radical, que acontece como consecuencia de la elongación desigual de uno y otro lado del pelo en crecimiento apical (Esseling *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2000). Esta deformación se conoce como enrulado (en inglés, “*curling*”) del pelo y es generada por rizobios adheridos en la punta. Se cree que los factores Nod, al ser reguladores del crecimiento (Oldroyd, 2007), retrasan la elongación en uno de los lados del pelo y las bacterias quedan atrapadas en una especie de bolsillo. Allí, por medio de una actividad celulásica son capaces de degradar la pared celular e ingresar generando luego una invaginación de la membrana (Robledo *et al.*, 2008). Esta invaginación crece en dirección opuesta a la dirección de crecimiento que presentaba el pelo al momento de la infección. El interior de este canal se denomina hilo de infección (Figura I.3) y es ocupado por un solo clon de bacterias o, a lo sumo, dos. Este espacio es equivalente al medio extracelular, ya que se ha demostrado que posee proteínas pertenecientes a la matriz extracelular



**Figura I.3** Hilo de infección de *Medicago sativa* cuando es infectado por una cepa de *S. meliloti* que expresa GFP. Se puede observar el enrulado del pelo y la formación de un hilo completo (Jones *et al.*, 2007).

(Rathbun *et al.*, 2002). En la punta del hilo de infección los rizobios se dividen activamente y el mismo progresa hacia el interior de la raíz hasta alcanzar la zona subcortical, donde se está desarrollando el primordio del nódulo. El pasaje del hilo de infección de una célula a otra implica degradación local de la pared celular, fusión de ésta con el hilo de infección e iniciación de una nueva invaginación que permite el crecimiento del mismo (Gage, 2004).

Otra forma de invasión del huésped es la generada por *Azorhizobium caulinodans* en *Sesbania rostrata* y por *Bradyrhizobium sp.* en *Arachis hypogea* (maní). En este proceso no se desarrolla un hilo de infección sino que los rizobios penetran por roturas (en inglés, *crack entry*) que generalmente ocurren en las axilas de raíces secundarias emergentes y se dispersan luego por los espacios intercelulares hasta llegar al primordio de nódulo (Goormachtig *et al.*, 2004).

El factor Nod sería necesario durante todo el proceso de infección e incluso para una correcta invasión del nódulo (Gage, 2004; Jones *et al.*, 2007). Al inicio de la infección causará oscilaciones de calcio en todas las células, las epidérmicas y las de la corteza, y consecuentemente activará la expresión de genes de nodulación tempranos. Asimismo, los exopolisacáridos bacterianos o EPS son elementales para una infección exitosa, ya que además de estar implicados en el reconocimiento rizobio-leguminosa, son responsables de inhibir en parte las respuestas de defensa de la planta (Mathis *et al.*, 2005; Niehaus *et al.*, 1993; Parniske *et al.*, 1994). También podrían conferir protección, por ejemplo ante las especies reactivas del oxígeno (en inglés, *Reactive Oxygen Species*, ROS) liberadas por la planta durante la infección, y finalmente podrían estar implicados en la señalización celular (Skorupska *et al.*, 2006).

La población clonal del hilo de infección se descarga en las células corticales, donde ya se ha inducido la formación del primordio de nódulo (Oldroyd & Downie, 2008). Para el caso particular de la simbiosis *B. japonicum*-soja, el enrollado del pelo radical toma aproximadamente 12 horas, la formación del hilo de infección se completa en unas 24 horas y la división de las células corticales por debajo del hilo dura entre 24 y 96 horas. Entre los 4 y 19 días ya pueden observarse nódulos maduros. El número de hilos de infección que se inician es mucho mayor a la cantidad de nódulos que finalmente se formarán. Este hecho vislumbra la existencia de un mecanismo de defensa de la planta para evitar una infección ilimitada. Las plantas tienen una primera línea de defensa que consiste en un sistema de reconocimiento de elicitores de patógenos. Se han encontrado

semejanzas interesantes entre estas respuestas ante patógenos y en la percepción del factor Nod. Los factores Nod son capaces de controlar la concentración de ROS, se cree que con el fin de permitir la formación del hilo de infección (Santos *et al.*, 2001). Estas especies ayudarían a la remodelación de la pared celular. Si hay un desbalance en los niveles de ROS, particularmente un exceso, se abortará la infección de ese hilo, aunque la vía de señalización por medio de la cual esto ocurre se desconoce (Jones *et al.*, 2007). Se sabe que mutantes de *S. meliloti* en algunas de las tres catalasas que tiene la bacteria o en una de las dos superóxido dismutasas, son sensibles a ROS pero no son defectivas en simbiosis (Jones *et al.*, 2007). Por otro lado, se ha observado que el ácido jasmónico y el etileno, implicados en las respuestas de defensa de las plantas ante patógenos, también estarían involucrados en la nodulación. Ambos modulan las oscilaciones de calcio en las células de la raíz generadas en respuesta al factor Nod. Las vías de señalización de ambos compuestos estarían relacionadas aunque no se conoce a qué nivel (Sun *et al.*, 2006). Un ejemplo llamativo de estas regulaciones se observa en el caso del par simbiótico *S. rostrata* y *A. caulinodans*. En este sistema, la infección puede ocurrir vía *crack entry* en condiciones de inundación, donde el gas etileno se disuelve en el agua y es necesario para la infección; mientras que también puede suceder la infección vía hilo de infección en condiciones de capacidad de campo y, en este caso, el etileno es inhibidor de la nodulación (Oldroyd & Downie, 2008).

Al describir el proceso de infección se puede apreciar que existe una delgada línea que separa el mutualismo de la patogénesis. Como hemos mencionado, las leguminosas expresan una respuesta de defensa local, lo cual sugiere que en su entrada el rizobio es percibido como un patógeno. No obstante, el factor Nod logra controlar respuestas más avanzadas de la planta, de modo tal que durante el desarrollo del nódulo, los genes asociados a la inmunidad se encuentran reprimidos (Brechenmacher *et al.*, 2008; Soto *et al.*, 2008).

#### 1.5.4 Organogénesis del nódulo

El primordio del nódulo se induce por la acción del factor Nod que en un principio se pone en contacto con la epidermis de la raíz (Oldroyd & Downie, 2008). Este evento ocurre en paralelo a la formación del hilo de infección. Una vez inducido, en el primordio continúan las divisiones mitóticas de las células corticales, que sufren un proceso de desdiferenciación, conduciendo a la formación de un meristema cuya

función será generar el tejido en crecimiento del nódulo. De acuerdo al programa genético de la leguminosa, se pueden formar dos tipos de nódulos con distinta morfología. Los nódulos determinados tienen forma redondeada debido a que presentan un meristema apical periférico que no es permanente (Figura I.4). En estos nódulos las células infectadas más jóvenes están inmediatamente por debajo del tejido periférico, los simbiosomas (bacteroides rodeados por membrana vegetal) funcionales se encuentran en una capa intermedia, mientras que los simbiosomas senescentes se hallan en la zona central. Los nódulos indeterminados son alargados debido a que las células del cortex interno generan un meristema apical persistente (Figura I.4). En estos nódulos se distinguen cuatro zonas transversales, llamadas zona I o del meristema libre de bacterias, zona II o zona donde penetran los hilos de infección y los bacteroides se dividen y diferencian, zona III o zona de simbiosomas fijadores de  $N_2$  y zona IV donde se encuentran bacteroides en senescencia. Estas zonas se suceden desde el ápice del nódulo hacia la base. En ambos tipos nodulares, los rizobios que provienen del hilo de infección son endocitados endocitan en el citoplasma de las células del primordio, quedando envueltos en la membrana de origen vegetal denominada Membrana Peribacteroidal (MPB) y dando origen al simbiosoma. En la infección de los nódulos indeterminados los rizobios se dividen algunas veces después de ser rodeados por la MPB, con lo cual la presencia de más de un bacteroide por simbiosoma es común. En las

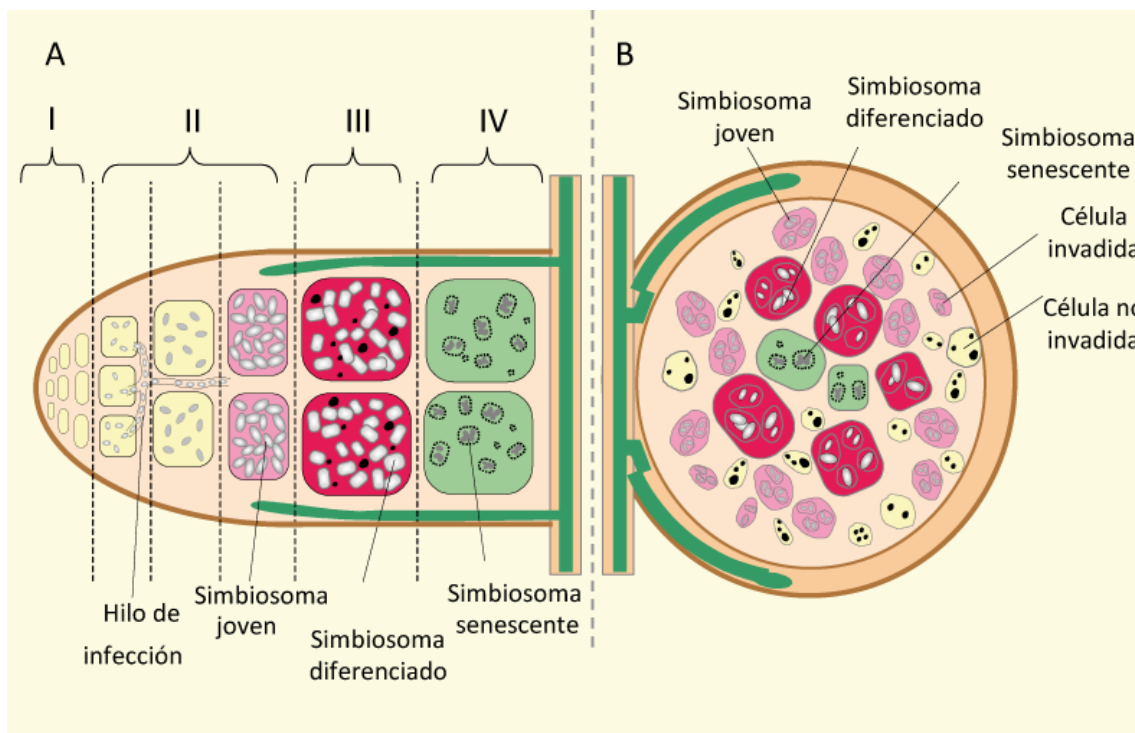


Figura I.4 Esquemas de cortes longitudinales de un nódulo indeterminado (A) y un nódulo determinado (B). Para una descripción detallada, véase el texto.



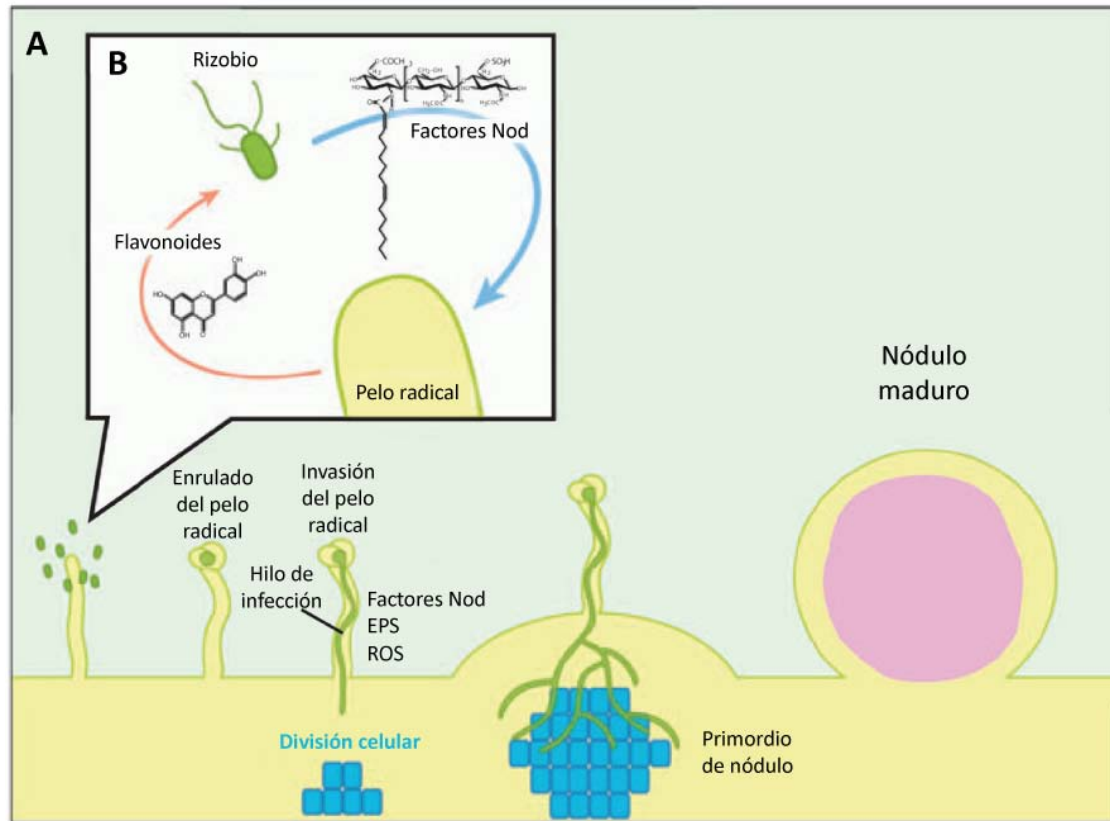
infecciones que resultan en nódulos determinados, no parece que haya división de las bacterias una vez envueltas por la MPB; sin embargo, se observan simbiosomas con más de un bacteroide, que pueden provenir de fusiones de simbiosomas. La MPB tiene proteínas tanto vegetales como bacterianas, que le confieren características particulares y permite delimitar un espacio donde ocurrirá la diferenciación a bacteroide y la fijación del  $N_2$  (Gage, 2004).

En cuanto a los exopolisacáridos (EPS) de rizobios y su relación con el tipo nodular, se ha establecido que son estrictamente necesarios para la nodulación en aquellas leguminosas que forman nódulos indeterminados (Frayse *et al.*, 2003), mientras que en los nódulos determinados sería necesario el lipopolisacárido. Sin embargo un trabajo reciente de nuestro laboratorio demuestra que el EPS de *B. japonicum* sería necesario para una nodulación eficiente en soja, cuyos nódulos son determinados (Quelas *et al.*, 2010).

Las especies que forman nódulos determinados son en general de climas tropicales, siendo las más conocidas *Glycine max* (soja) y *Phaseolus vulgaris* (poroto) o subtropicales como *Lotus japonicus*. Dentro de las especies que forman nódulos indeterminados, las más conocidas son *Trifolium* (trébol), *M. truncatula* (alfalfa) y *Pisum sativum* (arveja). En la Figura I.5 se muestra, a modo de resumen, un esquema general del establecimiento de la simbiosis.

### I.5.5 Diferenciación y fijación de nitrógeno

Una vez que se encuentran en el simbiosoma, los rizobios sufren una diferenciación hacia un nuevo estadio denominado bacteroide. Esto se logra gracias a un cambio substancial en su metabolismo y cuyas características más sobresalientes son: el aumento de tamaño de la célula (hasta 10 veces), la ausencia de flagelos, la incapacidad de duplicarse, el cambio en el metabolismo de fuentes de C y la expresión de la enzima nitrogenasa. Para alcanzar este nuevo fenotipo debe haber un importante cambio en la expresión de los genes bacterianos. Estudios de transcriptómica mostraron un aumento en la expresión de genes relacionados tanto al intercambio de compuestos carbonados y de amonio, como a su metabolismo; de genes implicados en las vías de síntesis de vitaminas y en procesos relacionados al estrés, tales como proteínas del shock térmico, chaperoninas, y otras (Djordjevic, 2004). Contrariamente, se observó la represión de genes relacionados al metabolismo del ADN, del ARN, y de la traducción, así como

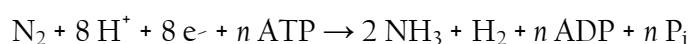


**Figura 1.5** Esquema general del desarrollo de un nódulo determinado (A) con las principales moléculas que intervienen en el reconocimiento (B). Los flavonoides secretados por la leguminosa en el suelo son percibidos por el rizobio que dispara la producción del factor Nod. Entre las respuestas generadas en el hospedador se produce el enrollado del pelo radical y su invasión. La invasión del pelo radical requiere la presencia de los EPS bacterianos y dispara la producción de ROS del hospedador. En forma paralela, el factor Nod induce la división celular en las células del cortex de la raíz (representadas en celeste) conduciendo la formación del primordio nódular. Modificado de Gibson *et al.* (2008)

genes de la biosíntesis de purinas, genes involucrados en la progresión del ciclo celular y genes de movilidad y quimiotaxis (Becker *et al.*, 2004; Pessi *et al.*, 2007).

Los bacteroides utilizan como única fuente de C los ácidos malato y succinato cedidos por la planta. A cambio de ello, ofrecen a la leguminosa el amonio que son capaces de obtener por medio de la enzima nitrogenasa. Este metabolismo constituye el eje central de la simbiosis rizobio-leguminosa. La nitrogenasa confiere a los diazótrofos la capacidad de reducir el  $N_2$  a  $NH_4^+$ . Esta enzima es en realidad un complejo multienzimático, compuesto por dos metaloproteínas, una con un centro hierro-azufre y molibdeno (Mo), y la otra, con un centro de hierro (Fe). El oxígeno es capaz de inhibir la enzima, al desnaturalizar irreversiblemente a su cofactor Mo-Fe (Shah & Brill, 1977). Sin embargo, por medio de un sistema de dos componentes, los rizobios son capaces de sentir los niveles de este gas y responder a ellos. Este sistema está compuesto por las proteínas FixLJ, donde FixL es un sensor ubicado en la membrana del bacteroide que se activa cuando el nivel de oxígeno disminuye lo suficiente y entonces transfiere la señal a

FixJ. FixJ activa a su vez la expresión de *nifA* y *nifK*, encargadas de regular positivamente la expresión de los genes de la nitrogenasa y de las enzimas encargadas de la biosíntesis de nuevos citocromos, respectivamente. En algunos casos, *nifA* es capaz de sensar directamente al oxígeno (Fischer, 1994). Una vez sintetizados todos los componentes del complejo de la nitrogenasa, esta enzima cataliza la transformación de una molécula de  $N_2$  a  $NH_4^+$  por medio de reacciones de óxido-reducción y gracias a la energía aportada por el ATP. La ecuación completa de la reacción es:



El  $H_2$  se genera como subproducto de la reacción en la reducción del  $N_2$ . El ATP consumido por cada  $N_2$  transformado es de 16 moléculas o más dependiendo del flujo de protones (Halbleib & Ludden, 2000). Debido a la baja tensión de oxígeno necesaria para que dicha reacción sea viable, no es casual que el nódulo sea un ambiente reductor, generado gracias a la protección de una capa celular exterior que lo envuelve, formando una barrera de protección a la difusión del oxígeno desde la atmósfera del suelo. Además, la planta suministra al nódulo una proteína muy similar a la hemoglobina de nuestra sangre, llamada leghemoglobina. Esta proteína es capaz de unir y transportar oxígeno con gran afinidad, lo que resulta en concentraciones de oxígeno extremadamente bajas en el nódulo. Sus niveles y regulación en el nódulo son muy estrictos, pues se establece un compromiso entre la baja concentración de  $O_2$ , imperiosa para el funcionamiento de la nitrogenasa, y la necesidad de aquél como aceptor final de electrones en la fosforilación oxidativa, la cual proveerá el ATP necesario para la fijación de  $N_2$ . (Jones *et al.*, 2007) El problema de la difusión de  $O_2$  también ha requerido la evolución de una citocromo oxidasa de alta afinidad por el oxígeno, la que se expresa exclusivamente en el bacteroide (Preisig *et al.*, 1996).

### 1.5.6 Senescencia del nódulo

Luego de la floración y durante el llenado de los granos, sobreviene la senescencia de los nódulos. El tiempo que lleva este proceso es variable, dependiendo de la planta, de la cepa de rizobio y de las condiciones del medio ambiente. La senescencia del nódulo está marcada por la expresión de proteasas en este tejido, por el incremento de ROS y por la presencia de proteínas oxidadas y/o deterioradas. Durante este proceso las MPBs se fusionan y los simbiosomas se van agrupando en una vacuola, que conduce a la lisis de

los bacteroides (Denison, 2000; Matamoros *et al.*, 1999; Muller *et al.*, 2001; Pladys *et al.*, 1991). Las bacterias que no llegaron a diferenciarse se liberan e incrementan substancialmente las poblaciones de suelo. Por ejemplo, *B. japonicum* constituye menos del 1% de las bacterias totales de la rizósfera durante el período de nodulación, mientras que pasa a representar más del 20 % luego de la senescencia (Moawad *et al.*, 1984). Los rizobios entonces restablecen su metabolismo adaptado al estado planctónico, luego de lo cual se supone que se establecen en el suelo formando biopelículas hasta el próximo ciclo de nodulación (Perez-Gimenez *et al.*, 2009).

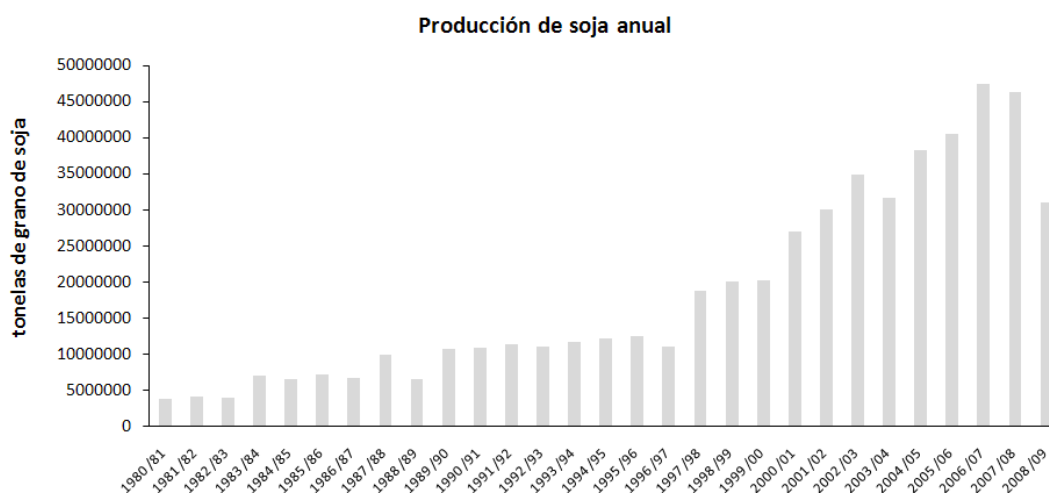
## I.6 El problema de la competición para la nodulación

Una vez finalizado el ciclo infectivo y transcurrida la senescencia del nódulo, los rizobios pueden permanecer en el suelo durante largos períodos de tiempo (Sadowski & Graham, 1998). De hecho, *B. japonicum* es capaz de sobrevivir en agua destilada durante más de un año a temperatura ambiente y aún crecer si se lo vuelve a diluir en agua destilada (Crist *et al.*, 1984). También es capaz de duplicarse en macetas con vermiculita y solución mineral, permaneciendo viable e infectivo por al menos tres meses (López-García *et al.*, 2002). Es esperable entonces que en los suelos, aún cuando los nutrientes sean escasos, los rizobios puedan sobrevivir un tiempo prolongado. La biomasa bacteriana puede ser de alrededor de  $10^8$  a  $10^9$  células por gramo de suelo. Los rizobios son sólo una pequeña fracción, de alrededor de  $10^2$  a  $10^6$  células por gramo de suelo, dependiendo de si hay o no leguminosas, en cuyo caso la población estará cerca del límite superior. La mayoría de los campos empleados para la agricultura en Argentina ya han sido inoculados y por lo tanto, se ha desarrollado una población residente de rizobios noduladores de soja, en general del orden de  $10^4$  a  $10^5$  rizobios por gramo de suelo. Esta población autóctona proviene de nódulos que senescieron en inoculaciones previas y han liberado rizobios, los cuales se han mantenido a lo largo del tiempo o han transferido horizontalmente genes simbióticos a la población local. Estos procesos dieron origen a una población residente que puede estar compuesta por cepas de diversos géneros (Barcellos *et al.*, 2007; López-García *et al.*, 2009). Si bien la población residente proviene de cepas que fueron alguna vez seleccionadas en el laboratorio para realizar una eficiente fijación de  $N_2$  al asociarse con la planta, la deriva genética y la transferencia horizontal de genes puede haber diluido el potencial de las cepas

originales. En particular, debe tenerse en cuenta que la alta eficiencia en la fijación de  $N_2$  no es un carácter seleccionado en condiciones naturales, al contrario de la eficiencia para nodular, por lo cual la deriva genética acaecida las hace más competitivas para nodular, pero variables en cuanto a la fijación de  $N_2$ . Cuando un nuevo inoculante se introduce en las semillas, se encuentra en desventaja con respecto a la población del suelo; así, la mayoría de los nódulos son ocupados por las cepas residentes. En este punto debe recordarse que la planta regula la cantidad de nódulos que se forman, a fin de obtener un balance positivo entre las sustancias carbonadas destinadas a los nódulos y la cantidad de ureídos o aminoácidos que recibe a cambio.

Las leguminosas pueden crecer obteniendo el N de dos fuentes: la fijación de  $N_2$  (discutida más arriba) o el N combinado del suelo. Estudios en cultivos hidropónicos mostraron que con cualquiera de estas fuentes de N pueden completar todo su ciclo vital. Así, cuanto mayor sea la proporción de nódulos ocupados por cepas que no sean buenas fijadoras del  $N_2$ , menor será la respuesta del rendimiento a la inoculación y una mayor proporción del N asimilado por la planta será tomado del suelo. Esta limitación se ha denominado problema de la competición para la nodulación (Triplett & Sadowsky, 1992).

Entre las leguminosas cultivadas en la Argentina, la soja posee la mayor superficie cultivada y es una de las principales fuentes de ingreso de dinero en los últimos años, produciendo 31 millones de toneladas de grano en la campaña 2008/9 en la cual se notó una baja debido a la crisis internacional (Figura I.6). Dado que la soja tiene una gran demanda de N con un 2,5 % p/p en el grano y que casi su totalidad se exporta, las



**Figura I.6** Producción anual de grano de soja en Argentina desde las campañas 1980/81 a 2008/9. Valores tomados del Sistema Integrado de Información Agropecuaria (<http://www.sii.gov.ar>).

consideraciones anteriores indican que si la fijación de N<sub>2</sub> no es eficiente, junto con ese grano estamos exportando una parte sustancial de la fertilidad nitrogenada de nuestros suelos. Aún teniendo en cuenta que la campaña 2008/9, fue mala comparada con las anteriores, en la misma se exportaron 775.000 toneladas de N. Si consideramos la exportación agregada de los últimos 10 años, la cifra asciende a 8,5 millones de toneladas de N exportadas dentro de los granos de soja a los mercados asiáticos. Al contrario de los cultivos, que se reponen año a año, la fertilidad perdida por el suelo puede llevar décadas para recuperarse.

Mucho se ha estudiado acerca de los factores que condicionan la competitividad para nodular (Sadowski & Graham, 1998; Toro, 1996; Triplett & Sadowsky, 1992). La competitividad está relacionada a factores tales como la tolerancia al estrés, la producción de bacteriocinas, la susceptibilidad a los protozoos predadores, las capacidades para utilizar ciertos metabolitos en la rizósfera, las características de los polisacáridos superficiales bacterianos, la producción de flagelos y fimbrias, la sensibilidad de respuesta a los flavonoides, entre otros. Además, la movilidad de los rizobios en el sustrato de enraizamiento es muy escasa lo cual puede afectar la colonización rizosférica por parte del inoculante (Horiuchi *et al.*, 2005; López-García *et al.*, 2002; Madsen & Alexander, 1982; McDermott & Graham, 1989). Estudios de nuestro laboratorio indicaron además, que la posición de los rizobios respecto de la raíz puede ser determinante del grado de ocupación de nódulos por cada cepa (López-García *et al.*, 2002). Por lo tanto, se ha propuesto que una mejora en el método de inoculación y/o en la movilidad de los rizobios inoculados podría permitir mejoras en la ocupación de los nódulos por parte de la cepa inoculada. Se sabe muy poco acerca de la movilidad de *B. japonicum* en general y de la movilidad en medios porosos no saturados de agua en particular. Es por ello que para obtener mejoras en la competitividad de los inoculantes a través de mejoras en la movilidad de los rizobios, también es necesario generar nuevo conocimiento acerca de este aspecto.

Por tanto, este trabajo de Tesis se ha enfocado hacia el análisis de la movilidad de los rizobios y en cómo ésta puede influenciar la infección y la competición para la nodulación en diferentes condiciones. En lo que sigue haremos una breve descripción del estado actual del conocimiento de la movilidad de las bacterias con énfasis en los rizobios.

## I.7 Movilidad de las bacterias en el suelo

A pesar de haberse definido a los rizobios como bacilos móviles, en el suelo su movilidad es muy escasa y la colonización efectiva de las raíces parece depender de factores que promuevan su desplazamiento pasivo en el suelo (Madsen & Alexander, 1982; McDermott & Graham, 1989). Estos factores pueden ser la labranza realizada por el hombre, la actividad de lombrices que abran canales o que transporten las bacterias sobre sí mismas, las raíces que los puedan desplazar a medida que crecen, y el agua de percolación. Aparentemente, cuando el contenido de agua del suelo es alto, los poros se saturan y los rizobios pueden nadar en ellos (Horiuchi *et al.*, 2005; Madsen & Alexander, 1982). En contrapartida a los datos de la baja movilidad observada en suelos, algunos trabajos asignan a la quimiotaxis y la movilidad roles indispensables en eventos tempranos de la infección (Ames & Bergman, 1981; Barbour *et al.*, 1991; Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Gonzalez & Marketon, 2003; Mellor *et al.*, 1987; Miller *et al.*, 2007; Pandya *et al.*, 1999; Yost *et al.*, 2003). Sin embargo, la mayoría de estos trabajos se ha realizado en soluciones acuosas o en medios saturados de agua, lo cual no refleja las condiciones del hábitat natural. Para analizar la movilidad en el suelo, deben tenerse en cuenta factores como el agua disponible o  $\Psi_h$ , la velocidad de difusión de solutos y/o de quimioattractantes, la presencia de raíces en crecimiento y de otros organismos, la posibilidad de adsorción/desorción de las bacterias a las partículas del suelo, y el estado fisiológico en el que se encuentran las bacterias (Barton & Ford, 1995; Watt *et al.*, 2006).

Esta discusión acerca de la movilidad y la quimiotaxis en el suelo se ha planteado pensando que las células se encuentren en estado planctónico. No obstante, no se debe perder de vista que algunos de los resultados obtenidos podrían deberse a que una parte considerable del tiempo en el que los rizobios viven en el suelo lo hacen bajo la forma de biopelículas y no como células planctónicas, lo cual explicaría la falta de movilidad observada en los suelos.

Más allá de los roles que puedan desempeñar la quimiotaxis y la movilidad en la colonización, se ha comprobado que los rizobios son capaces de colonizar la rizósfera, el rizoplano y la endorrizósfera (zonas subcorticales de la raíz) de las leguminosas y de otras especies como trigo (López García, 2004). Asimismo, las raíces de las leguminosas son eficientemente colonizadas no sólo por los rizobios sino también por una gran variedad de otras especies de microorganismos que compiten por los metabolitos

presentes en ese nicho. Por ejemplo micorrizas, *P. fluorescens* y *Azospirillum*, benefician y/o mejoran la interacción de los rizobios con las leguminosas. Siendo estos procesos habituales en la rizósfera, resulta interesante analizar qué sucede con la movilidad (e implícitamente con la quimotaxis) de los rizobios en el suelo y cuál es su aporte en la competición para la nodulación. Para ello es necesario conocer tanto el suelo como los sistemas que median estos procesos en las bacterias. Del suelo hemos realizado una breve descripción y a continuación abordaremos la descripción de los sistemas de movilidad y quimiotaxis.

## I.8 Sistemas de movilidad

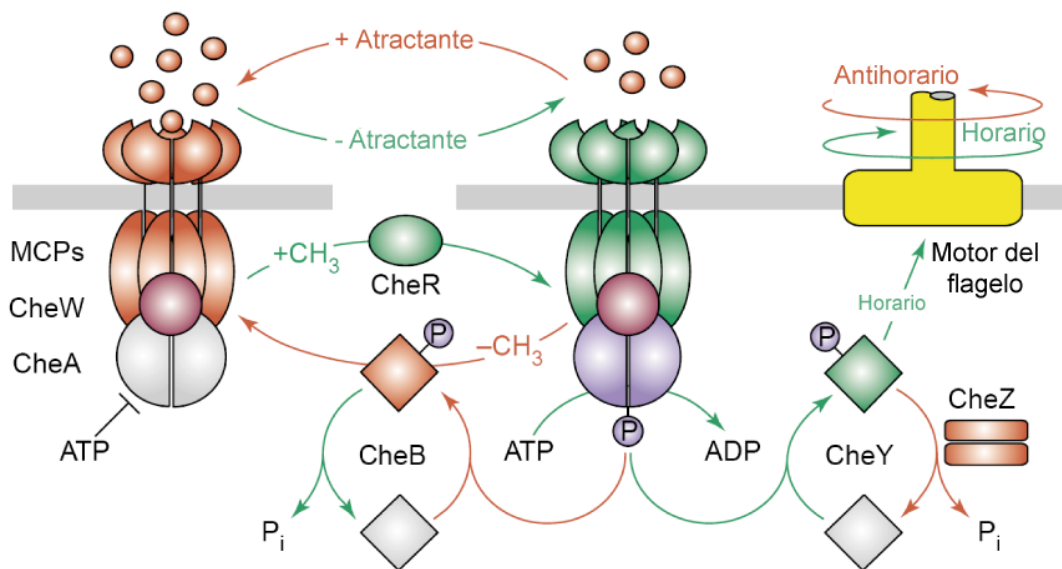
Los beneficios de la movilidad incluyen la eficiencia en la adquisición de nutrientes, el escape ante sustancias tóxicas, la capacidad de colonizar los hospedantes o superficies y de dispersarse por el medio ambiente. Así, los microorganismos son capaces de percibir el medio ambiente con su aparato quimiotáctico y transmitir el estímulo al aparato de movilidad (Alexandre *et al.*, 2004).

### I.8.1 Quimiotaxis

Es interesante entender cómo un ser vivo de tan sólo 1  $\mu\text{m}$  de largo tiene la capacidad de orientarse y definir la dirección de su desplazamiento. Este comportamiento depende de una compleja cascada de señalización, finamente regulada y con sistemas de memoria temporal. Esta regulación ocurre por medio de un sistema de dos componentes, donde existe un complejo multiproteico asociado a la membrana plasmática y un regulador de respuesta en el citosol. El complejo anclado a la membrana se encuentra formado por un quimiorreceptor, o MCP (en inglés, *Methyl-Accepting Chemotaxis Proteins*), por una proteína llamada CheA con capacidad de autofosforilarse en una histidina, y por otra proteína que ayuda a la transducción de la señal entre ambas, llamada CheW (Figura I.7). El regulador de la respuesta es una proteína denominada CheY que cataliza su propia fosforilación tomando el grupo fosfato de CheA y transfiriéndolo a un aspartato conservado de su secuencia. Una vez fosforilada, CheY-P difunde hacia el motor del flagelo. Allí actúa como un regulador alostérico promoviendo el cambio de dirección de la rotación o alterando la velocidad del motor, de manera que se genera un rearrreglo en los flagelos y se cambia la dirección del



desplazamiento. A su vez, existen tres enzimas solubles que son reguladores periféricos de la quimiotaxis: CheZ, CheR y CheB. CheZ es una fosfatasa que se une al complejo CheY-P para aumentar su velocidad de desfosforilación. CheR y CheB son enzimas que metilan y desmetilan residuos de glutamato de la porción citoplásmica del MCP, respectivamente. Su función es regular la actividad de este complejo receptor generando una adaptación y proporcionando a cada célula una “memoria temporal” (Baker *et al.*, 2006; Berry, 2001). Esta memoria le permitirá moverse detectando si se dirige a lugares de más o menos concentración de atractante. Cuando la bacteria se encuentra nadando en direcciones hacia donde existen atractantes, el MCP no se activa, de modo que CheA y CheY no se fosforilan y la célula continúa desplazándose en esa dirección. Por el contrario, cuando la presencia de algún nutriente en un lugar diferente al lugar hacia donde se dirige la bacteria es percibida por los MCPs (esto es, la concentración del nutriente no aumenta en la dirección del movimiento), se activa la cascada de fosforilación y la señal termina en el motor del flagelo, generando un tumbo en la bacteria ocasionado por un cambio en el movimiento de los flagelos (Figura I.8). Este modelo simplificado corresponde a *E. coli* y *Salmonella thyphimurium*, sin embargo las  $\alpha$ -proteobacterias carecen de CheZ y tienen una isoforma alternativa de CheY (Schmitt,

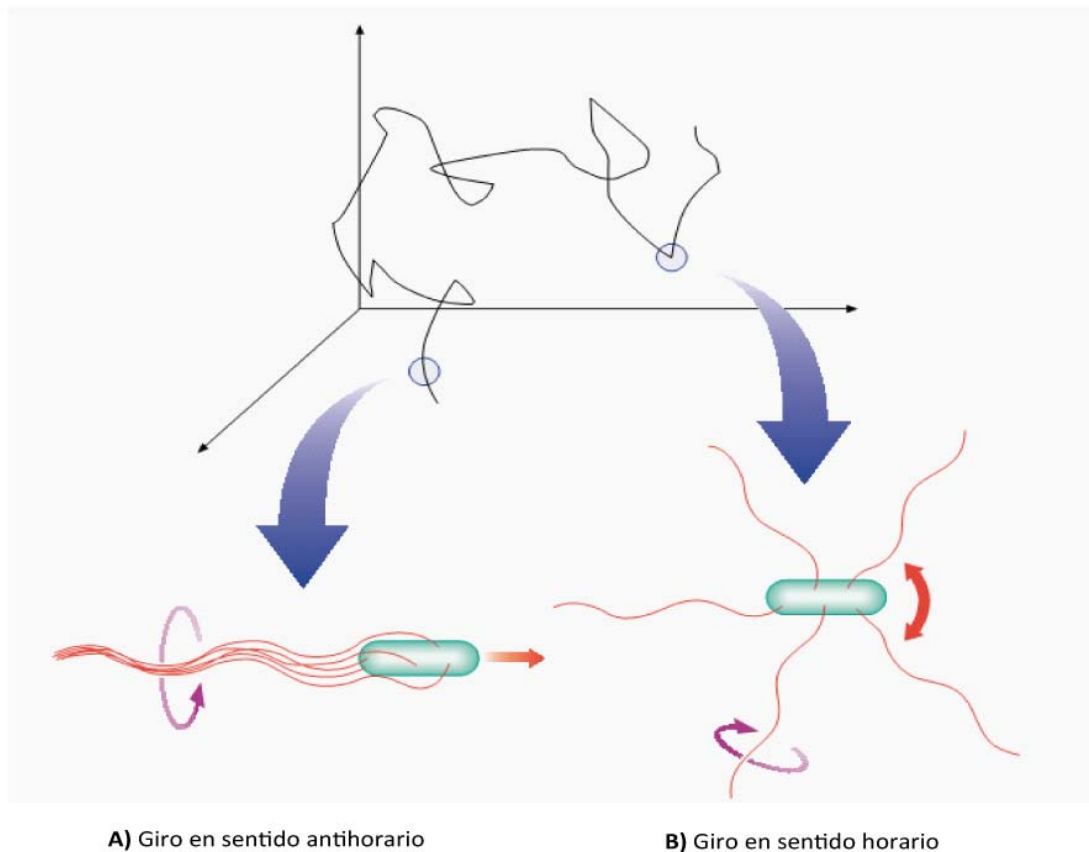


**Figura I.7** Modelo de señalización de la quimiotaxis. Esquemáticamente se representan sobre la membrana plasmática los quimiorreceptores (MCPs) y el motor del flagelo. En el citosol se ubican las proteínas de señalización: cheA, cheW, cheY, cheZ, cheB y cheR. Se representan dos estados de sistema, en color el estado activo y en gris el inactivo. Los quimiorreceptores (MCPs) se encuentran como dímeros y en su estado activo forman trímeros. En verde se muestra la vía que activa el sentido horario de rotación del flagelo y en rojo la que activa el sentido antihorario (condición establecida por defecto). La unión de un atractante o la remoción de un grupo metilo llevan del estado fosforilado activo (verde) al estado desfosforilado inactivo. Tanto la falta o la liberación de un atractante como la metilación del quimiorreceptor llevan al estado fosforilado activo de cheA (violeta). Modificado de Parkinson *et al.* (2005).

2002; Szurmant & Ordal, 2004). También evidencias recientes muestran la presencia de quimioselectores citoplasmáticos en *S. meliloti* (Meier & Scharf, 2009).

### 1.8.2 Flagelos

Los flagelos bacterianos son filamentos de unos 20 nm de diámetro y de 10 a 20  $\mu\text{m}$  de largo (unas 10 veces el largo de la bacteria), que permiten el desplazamiento de las Bacterias tanto en medios líquidos como en medios sólidos. El movimiento en el seno de un líquido se ha definido como natación (o *swimming*) y se genera por rotación del o los flagelos cuando la célula está en estado planctónico. El movimiento sobre una superficie (o *swarming*) es un tipo de traslación en masa, donde las bacterias se hiperflagelan, se alargan y secretan un surfactante al medio que les facilita el desplazamiento (Harshey, 1994; 2003; Kaiser, 2007). Los arreglos de flagelos pueden ser muy variables, pueden encontrarse entre uno y ocho filamentos por célula, con disposición peritrica, polar u



**Figura 1.8** Esquema del *swimming* en *E. coli*. Las bacterias nadan cuando los flagelos giran coordinados en sentido antihorario (A). Cuando uno de ellos se descoordina como consecuencia de un cambio en el sentido de la rotación del motor, el manojito se desorganiza y genera un tumbo que reorienta la bacteria (B). Modificado de Berry (2001).

subpolar (Macnab, 1996). Se han descrito seis tipos de movimiento, siendo el *swimming* y el *swarming* dependientes de flagelos, junto con el *twitching* (dependiente de los pili tipo IV) los más estudiados (Harshey, 2003; Henrichsen, 1972).

Los flagelos de bacterias entéricas como *E. coli* y *S. typhimurium* han sido muy bien estudiados, están constituidos por un solo tipo de flagelina y sin vaina que los recubra (desnudos). La interacción de las flagelinas, que se asocian por sus dominios N y C terminal, es la que determina la estructura que adquiere el filamento. Este tipo de filamentos se denominan simples, pues al microscopio electrónico de transmisión se observa una superficie lisa. Las estructuras helicoidales que adquieren pueden alternar entre un sentido levógiro o dextrógiro de acuerdo a la conformación de las flagelinas, y esto permite que roten en sentido antihorario o sentido horario respectivamente.

En el caso que la distribución sea de varios flagelos peritricos, durante la natación de la bacteria se forma un manojo de filamentos que giran todos coordinados en sentido antihorario; ante la señal de CheY-P, al menos uno de los flagelos cambia al sentido de giro horario, el filamento adquiere conformación dextrógira y descoordina el movimiento de modo que la célula da un tumbo (Figura I.8).

En cambio, bacterias del suelo como *S. meliloti* y *R. lupini* presentan flagelos constituidos por más de un tipo de flagelina y también sin vaina. En este caso, se forman dímeros de dos flagelinas diferentes que parecen bloquear el filamento en una conformación y sólo se pueden formar hélices dextrógiras fijas, capaces de girar en sentido horario. La superficie de estos flagelos se ve al microscopio electrónico como un patrón helicoidal de crestas y surcos (Trachtenberg *et al.*, 1986). Ante la llegada de una señal al motor del flagelo, éste no cambia el sentido de rotación, sino que modifica su velocidad, generando un cambio de dirección en la natación. Se hipotetiza que este filamento es más rígido, lo cual le permite a la bacteria desplazarse en un medio más viscoso como es el suelo y el mucílago de la superficie de la raíz.

Si bien muchas especies son capaces de realizar tanto *swimming* como *swarming* con una sobreexpresión del mismo flagelo, otras especies presentan dos sistemas de flagelos distintos, un flagelo polar y otro lateral. Entre ellas se encuentran *Aeromonas*, *Azospirillum*, *Rhodospirillum*, *Rhodobacter* y *Vibrio*. En general, los flagelos polares son expresados constitutivamente en medios líquidos y son empleados para el *swimming*. Pueden ser envainados, como es el caso de *Vibrio* o desnudos, como es el caso de *Aeromonas* y *Rhodospirillum*. La vaina es una prolongación de la membrana plasmática, si

bien se ha visto que presenta algunas proteínas diferentes (Furuno *et al.*, 2000). Su motor funciona con la energía proporcionada por la disipación de un gradiente de iones de  $\text{Na}^+$  acoplado al sistema. En cambio, los flagelos laterales son varios y se expresan cuando la viscosidad del medio aumenta. Las señales que disparan esta expresión no se encuentran bien estudiadas, aunque el flagelo polar podría actuar como un mecanosensor que al hallarse inhibido provoca la expresión de los genes de este nuevo tipo flagelar (Atsumi *et al.*, 1996). Además son simples, sin vaina y funcionan con un gradiente de protones acoplado (Merino *et al.*, 2006), al menos, en las bacterias estudiadas hasta el momento.

### 1.8.2.1 Estructura y función

De los aproximadamente 50 genes que son necesarios para la biosíntesis del flagelo, la mitad codifica proteínas estructurales (Aizawa, 2001). El flagelo se divide en tres subestructuras bien caracterizadas: el *cuerpo basal*, el *gancho* y el *filamento* (Figura I.9). Haremos la descripción desde la base hacia el extremo distal.

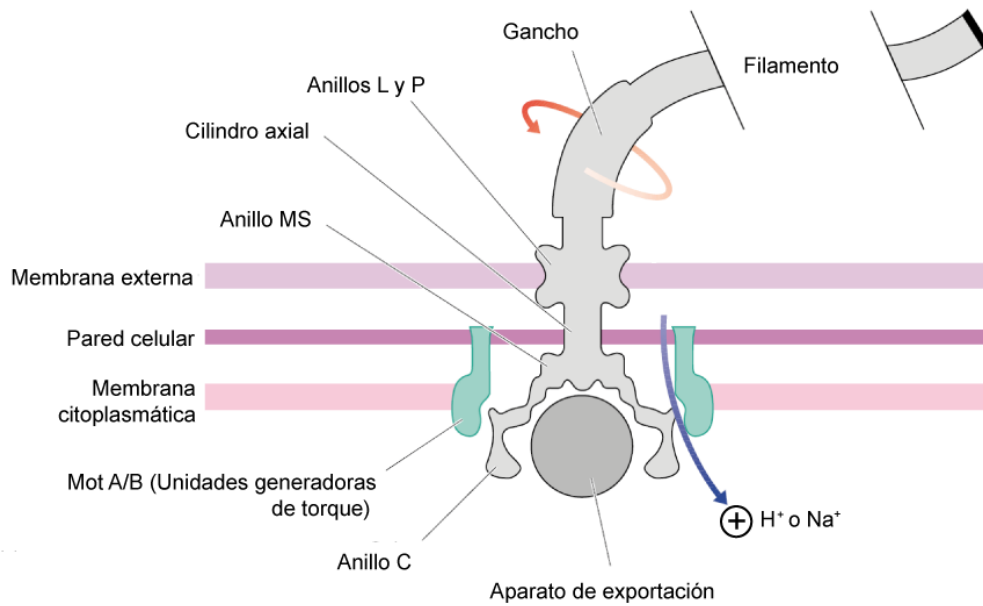
El *cuerpo basal* es la subestructura flagelar más compleja, ya que posee el motor que moviliza el filamento. Como cualquier otro motor, el motor flagelar consta de dos unidades básicas, el rotor, que engloba toda la parte que rota, y el estator, componente fijo sobre el cual gira el rotor. El rotor está embebido en la célula y constituido por un cilindro axial (*rod*), formado a su vez por 5 proteínas: FliE, FlgB, FlgC, FlgF y FlgG y 4 anillos (en bacterias Gram negativas) (Samatey, 2009). Los dos anillos externos, L y P, reciben su nombre por la asociación al lipopolisacárido y al peptidoglicano, y cada uno de ellos está formado por las proteínas, FlgH y FlgI, respectivamente. El anillo interno, MS, está en contacto con la membrana plasmática interna. Se trata de dos anillos juntos y formados por la misma proteína, FliF. El estator del motor está constituido por las proteínas MotA y MotB ubicadas alrededor del anillo interno y ancladas en la membrana interna. En motores que funcionan con iones  $\text{Na}^+$ , las proteínas análogas se denominan PomA y PomB. Otras proteínas del complejo del motor, FliG, FliM y FliN, son las encargadas de realizar el cambio en la dirección de rotación del flagelo en respuesta a las señales intracelulares, y constituyen el anillo citoplasmático (anillo C) (Blair, 2009). El cilindro axial actúa como eje conductor del impulso rotativo transmitiéndolo desde los anillos MS y C al filamento a través del gancho y los anillos L y P. El anillo MS actúa de plataforma para el complejo conmutador o anillo C al cual se

conecta a través de la proteína FliG, y el propio anillo C controla la dirección de rotación flagelar. En el estator (que rodea el anillo MS) MotB se encuentra anclada por su gran dominio carboxilo terminal extracitoplasmático al peptidoglicano de la pared celular y por un pequeño dominio amino terminal a la proteína MotA, la cual posee cuatro dominios citoplasmáticos. Se ha observado que una unidad de estator está conformada por 4 proteínas MotA y dos MotB, y a su vez, que existen hasta 11 unidades de estos complejos por flagelo (Blair 2009; Brown *et al.*, 2009; Reid *et al.*, 2006). Cada unidad forma el conducto para el flujo de iones al interior celular, que provocan la generación del impulso rotativo mediante la interacción entre el estator y algún componente de los anillos MS-C (Figura I.9).

El gradiente electroquímico que se genera como consecuencia de procesos metabólicos celulares da origen a la fuerza protón motriz que será empleada, entre otras cosas, para activar la rotación del flagelo. Esta fuerza se convierte en fuerza de torque gracias al flujo de protones (o iones  $\text{Na}^+$ ) que atraviesa la membrana plasmática a través de MotB (anclada al peptidoglicano y a la membrana plasmática) y MotA (anclada a la membrana plasmática y a FliG). El mecanismo molecular por el cual se genera el paso de los iones no se conoce con exactitud. La hipótesis más aceptada sostiene que existen ciclos de protonación y desprotonación del aspartato 32 de MotB, el cual generará un cambio conformacional en el dominio citoplasmático de MotA, repercutiendo en FliG y éste a su vez en el anillo C (Berry, 2001; Blair, 2009; Brown *et al.*, 2009).

El *gancho* está formado por múltiples copias de una única proteína, FlgE, que polimeriza de forma helicoidal dando lugar a una estructura corta, hueca y curvada, que pone en contacto al filamento con el cuerpo basal. Dos proteínas asociadas al gancho (en inglés, *Hook-Associated Proteins*, HAPs), HAP1 y HAP3, o FlgK y FlgL, ayudan a la unión entre el gancho y el filamento adaptándolos, dado que tienen propiedades mecánicas diferentes (cap 9: Samatey en Jarrel). Las secuencias amino terminal y carboxilo terminal de FlgE poseen, al igual que las flagelinas, una alta similitud entre especies (Morgan *et al.*, 1993).

El *filamento*, la parte más larga, se extiende desde el gancho hasta el extremo distal, donde se encuentra una proteína que actúa de capuchón (FliD) también llamada HAP2 (Samatey, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, la superficie del filamento es lisa o con crestas y surcos, según sea un flagelo simple o complejo, respectivamente. Este constituye un cilindro rígido y hueco formado por la polimerización de una proteína denominada flagelina. HAP2 se ubica al inicio de la polimerización del



**Figura I.9** Esquema del flagelo bacteriano de una bacteria. Se indica la ubicación en la envoltura celular de los componentes: el aparato de exportación, el cuerpo basal (con sus anillos y su cilindro axial), el gancho y el filamento. Modificado de Berry (2001).

filamento y resulta indispensable para que se mantengan las flagelinas unidas (Maki-Yonekura *et al.*, 2003).

En los modelos *E. coli* y *S. typhimurium*, se han encontrado hasta 20.000 unidades de la flagelina FliC formando el filamento (Samatey, 2009). Cuando las especies bacterianas tienen más de un tipo de flagelina, generalmente se trata de polipéptidos de alta identidad entre sí, como es el caso del flagelo polar de *V. parahaemolyticus* que cuenta con 6 flagelinas diferentes (McCarter, 2001), o *S. meliloti* con 4 (Sourjik *et al.*, 1998), *A. tumefaciens* con 4 (Deakin *et al.*, 1999) y *R. leguminosarum* con 7 flagelinas, 5 de las cuales son muy similares (Tambalo *et al.*, 2010a). Además, pueden ocurrir modificaciones postraduccionales en estas proteínas, tales como glicosilación, por ejemplo, en *Campylobacter* o incluso *R. leguminosarum* o fosforilación de tirosinas, por ejemplo en *P. aeruginosa*. (Verma *et al.*, 2006). Las flagelinas tienen entre 300 y 600 aminoácidos, siendo las regiones amino y carboxilo terminal las más conservadas entre especies y a lo largo de la evolución (Brown *et al.*, 2009). La región central es más variable en cuanto a secuencia y tamaño (Wilson & Beveridge, 1993) y es la que confiere antigenicidad debido a que se halla expuesta luego de la formación del filamento. Las porciones amino y carboxilo terminales son las que interactúan y dan la estructura al filamento. Así, Newton *et al.* (1989), clonaron el epítipo de la toxina del cólera en la región central de la

flagelina de *S. typhimurium* y aún así, los flagelos seguían ensamblándose y confiriendo movilidad a la bacteria.

Algunas bacterias tienen el filamento rodeado por una vaina de diferente estructura química. Es el caso de algunos *Vibrio sp.* o *Helicobacter sp.*, cuya vaina membranosa es contigua a la membrana externa y similar en composición (McCarter, 2001). En el caso de *V. alginolyticus* se han detectado proteínas diferentes en esta vaina del flagelo polar (Furuno *et al.*, 2000). Se desconoce cómo el flagelo rota con relación a esta estructura, así como su función, aunque generalmente incrementa la firmeza estructural y probablemente permite interacciones específicas adicionales entre bacteria y superficie.

Los flagelos son los nanomotores más eficientes que existen. Entre la membrana interna y el espacio periplásmico el gradiente electroquímico que se genera es capaz de transformarse en trabajo mecánico dirigiendo la rotación del flagelo y generando trabajo con una alta eficiencia (Berry, 2001). Los protones atraviesan la membrana plasmática a través de varios canales constituidos por las proteínas MotA y MotB, estator del motor, generando la fuerza de torque y el consecuente el giro de los anillos, el cilindro axial, el gancho y el filamento. El flujo de protones es de 120 protones por unidad de MotA/MotB, y al ser al menos 11 de las mismas, más de 1.200 protones atravesando la membrana por revolución (Mora *et al.*, 2009). Esto permite a las bacterias nadar a una velocidad muy alta, del orden 15 a 100  $\mu\text{m}$  por segundo. Estos valores representan un desplazamiento de hasta cien veces la longitud de las bacterias por segundo.

### 1.8.2.2 Exportación y ensamblado

La estructura del flagelo comienza a ensamblarse desde el motor, donde la primera estructura que se ha podido aislar es el anillo MS (Kubori *et al.*, 1992). FliG y el anillo C se añaden posteriormente al anillo MS, sin necesitar ninguna otra proteína (Kubori *et al.*, 1997). Recién alcanzada esa instancia, se ensambla el aparato de exportación, compuesto por las proteínas FlhA, FlhB, FliH, FliI, FliO, FliP, FliQ, y FliR, cuyas funciones no son estructurales pero tampoco se encuentran definidas. Este aparato se empleará para el transporte de componentes del resto de las estructuras axiales (Chilcott & Hughes, 2000; Macnab, 2003). Entonces se formará el cilindro axial, con su parte más próxima (FlgB, FlgC y FlgF) y la más distante (FlgG). FliE es necesario para este ensamblado pero se desconoce su ubicación. Luego comienza la formación del gancho, aunque ésta no continúa hasta que no se ensamblan los anillos P y L (Brown *et*

al., 2009). Las proteínas de estas estructuras, FlgI y FlgH, son exportadas al espacio periplásmico por medio del péptido señal de la vía Sec dependiente (Jones *et al.*, 1989). El ensamblado del anillo P factiblemente necesite de la asistencia de una chaperona. El gancho es ensamblado y permanece intacto gracias a la presencia del capuchón (FlgD) en el extremo distal. El mismo es eliminado una vez que se agregan las HAPs. Estas proteínas adaptadoras se adicionan en orden: HAP1 (FlgK), HAP3 (FlgL) y HAP2 (FliD). Finalmente las flagelinas requeridas para el crecimiento del filamento se agregan en el extremo distal (Berg, 2000).

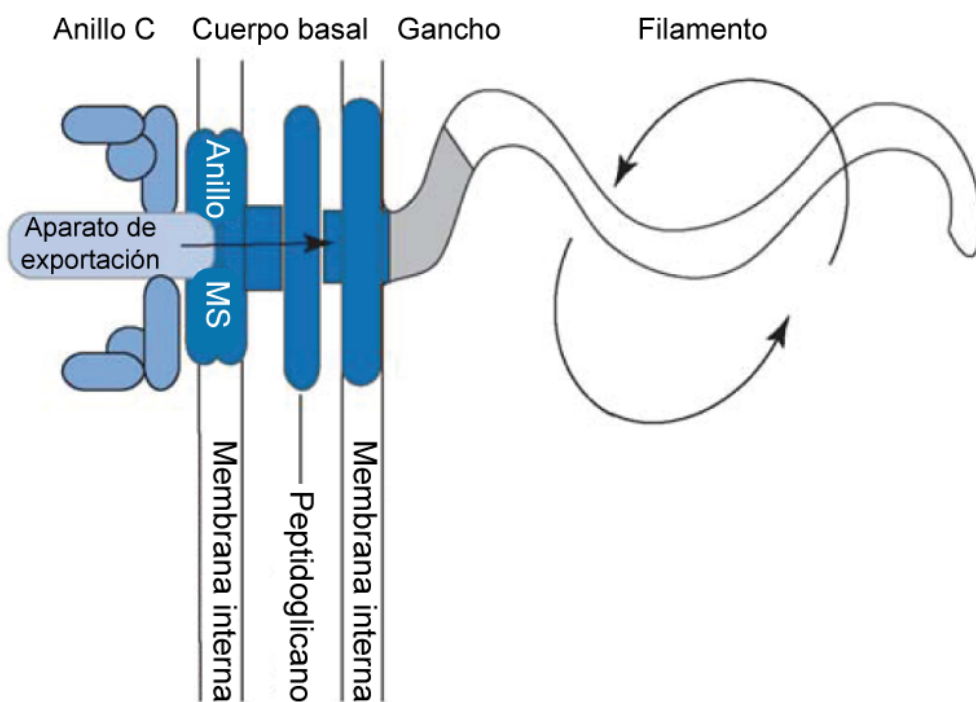
El orden en que este ensamblado funciona está regido, principalmente, por el orden en que ocurre la transcripción de los genes tempranos, medios y tardíos. Por otra parte, también existen modelos alternativos que explican cómo se acopla la traducción de las proteínas a la exportación de las mismas y cómo esto se ve regulado por la presencia de chaperonas (Aldridge & Hughes, 2001). Todos los componentes pertenecientes a la parte axial del flagelo son transportados por el sistema de exportación, cuyo canal central es de tan sólo 2,5–3,0 nm. Consecuentemente, las proteínas se exportan desplegadas o parcialmente plegadas, siendo las chaperonas las que impiden el plegamiento e incluso, en algunos casos, evitan su degradación en el citoplasma. Entre las chaperonas descritas se encuentran FlgN y FliT cuyos sustratos son FlgK-FlgL y FliD, respectivamente (Bennett *et al.*, 2001; Fraser *et al.*, 1999).

### 1.8.2.3 Regulación de la expresión de los flagelos

Expresar y mantener activos los sistemas de flagelos implica un alto costo energético para cualquier bacteria, habiéndose descrito unos 50 genes encargados de la síntesis del flagelo polar, y otros 40 en la síntesis del flagelo lateral. Sin embargo, el 80% de las especies bacterianas conocidas tienen flagelo (Soutourina & Bertin, 2003), lo cual nos indica su importancia adaptativa en los más diversos ambientes terrestres y acuáticos. Debido a la complejidad y la cantidad de genes estructurales y de regulación que se ven implicados en la biosíntesis del flagelo, existe una marcada organización en la expresión del sistema, donde los genes se expresan por jerarquías, de modo de controlar el gasto de energía celular, adecuándolo a las necesidades fisiológicas. Los modelos básicos de estudio son las  $\gamma$ -proteobacterias como *Salmonella* o *E. coli*. En ellos se han descrito tres clases de genes. Los de Clase I o tempranos corresponden al operón *FlhDC*, que es activado por señales del medio y codifica para dos activadores transcripcionales, FlhD y FlhC, cuya función es inducir la expresión de los genes Clase II o intermedios. Los genes



de Clase II codifican, en su mayoría, proteínas pertenecientes al aparato de exportación del flagelo, al cuerpo basal y a reguladores de la expresión como el factor sigma 28 ( $\sigma^{28}$ ) y el factor anti-sigma 28, denominado también FlgM. Los genes de Clase III o tardíos están regulados de forma positiva y negativa por  $\sigma^{28}$  y FlgM, respectivamente. FlgM se mantiene en el interior celular donde compite con  $\sigma^{28}$  por la ARN polimerasa hasta que el cuerpo basal y el gancho se terminan de sintetizar. Posteriormente se exporta y  $\sigma^{28}$  puede activar la síntesis de los genes correspondientes a quimiotaxis, al motor y al filamento (Chilcott & Hughes, 2000) (Figura I.10).



Orden de expresión de genes y ensamblado

Tempranos	→		Tardíos
Reguladores maestros	Exportación y ensamblado	Cuerpo basal	Flagelinas
	Anillo C	Gancho	Motor
	Anillo MS		Quimiotaxis
	Otros reguladores		

**Figura I.10** Estructura y biosíntesis del flagelo bacteriano. La estructura se nuclea a partir de la inserción del anillo MS. Por debajo de este se encuentra el anillo C que participa en la exportación y el ensamblado. Las proteínas exportadas (celestes) pasan a través del canal central y se ensamblan en el extremo distal de la estructura en formación. En la parte inferior se detalla el orden de la expresión de los genes, generalmente conservado en bacterias. Modificado de Mc Carter (2006).

#### I.8.2.4 Analogía de los flagelos con los Sistemas de Secreción Tipo III

El Sistema de Secreción Tipo III (TTSS) permite la liberación de proteínas efectoras de origen bacteriano dentro de células eucariotas, alterando así distintas funciones de la célula del hospedador. Está compuesto aproximadamente de 20 proteínas ensambladas formando una estructura tipo “aguja” compleja, constituida por una estructura extracelular hueca y un cuerpo basal cilíndrico que funciona como un canal que se extiende a través de las membranas bacterianas interna y externa y sale por fuera de la célula bacteriana (Troisfontaines & Cornelis, 2005) (Figura I.11). El descubrimiento de homologías entre las secuencias de proteínas implicadas en la secreción de factores de virulencia de varios patógenos y de las proteínas implicadas en el sistema de exportación del flagelo, evidencia que existe un origen común en ambos sistemas (Blocker *et al.*, 2003). Además existen similitudes como las estructuras de anillos en las membranas y un cilindro axial que las atraviesa, la falta de un péptido señal en las proteínas exportadas y la presencia de chaperonas que acompañan dichas proteínas. En este último punto hay una pequeña diferencia y es que en las proteínas del TTSS las chaperonas se unen al extremo amino terminal, mientras que en las del flagelo se unen en el extremo carboxilo terminal (Aldridge & Hughes, 2001). Se ha comprobado que en algunas bacterias el sistema de exportación flagelar también puede exportar en forma paralela otras proteínas. Por ejemplo *Campylobacter jejuni* es capaz de secretar por medio de este sistema proteínas antigénicas para el hospedador; y mutantes en *flaA*, una de las dos flagelinas que componen el filamento complejo, son inmóviles pero capaces de secretar dichos polipéptidos (Konkel *et al.*, 2004).

En los rizobios los TTSS han sido encontrados en *B. japonicum* USDA 110, *S. fredii* HH103 y USDA257, *M. loti* MAFF303099 y *R. etli* CNPAF512 (Fauvart & Michiels, 2008). En cada caso, se ha observado que mutantes en estos sistemas generan diferentes respuestas en la simbiosis, de acuerdo a las características del hospedador. Su expresión es inducida por flavonoides y depende de NodD y de una proteína, TTSI, que actuaría como regulador de respuesta de un sistema de dos componentes. Se cree que TTSI se une a las cajas *tts* de las secuencias promotoras de genes relacionados al TTSS activando la transcripción (Marie *et al.*, 2004).

Las proteínas exportadas por los TTSS se denominan “proteínas externas de nodulación” (o en inglés, *Nodulation Outer Proteins*, abreviado NOPS). Hasta el momento se conocen diez posibles Nops: NopA, NopB, NopC, NopD, NopL, NopM, NopP, NopX

y NopT, aunque no se ha demostrado experimentalmente su translocación al hospedador (Ausmees *et al.*, 2004; Bartsev *et al.*, 2004; Deakin *et al.*, 2005; Rodrigues *et al.*, 2007; Saad *et al.*, 2005; Skorpil *et al.*, 2005)

I.8.2.5 Flagelos de rizobios

Los rizobios han sido ampliamente estudiados en su relación con las leguminosas debido a su interés agronómico. Sin embargo, quizás por ser el flagelo una de las estructuras que se pierde durante la diferenciación a bacteroides, no se ha estudiado en profundidad su regulación, su composición y su función. Los primeros trabajos fueron realizados en los flagelos de *S. meliloti* y *R. lupini*. En ellos se pudo observar una estructura típica de flagelos complejos, en la cual existe sobre la superficie del filamento un patrón de crestas y surcos helicoidales, en contrapartida al aspecto liso de los flagelos simples (Cohen-Krausz & Trachtenberg, 1998; Krupski *et al.*, 1985; Schmitt *et al.*, 1974; Trachtenberg *et al.*, 1986) (Figura I.12). Esta estructura confiere más rigidez, adquiere un sentido dextrógiro, y consecuentemente, no permite la rotación en sentido antihorario. Así, *S. meliloti* y *A. tumefaciens* tienen cuatro genes de flagelina en sus genomas, *flaA* a *flaD*, ubicados en tándem en *S. meliloti*, mientras que en *A. tumefaciens* tres de estos se

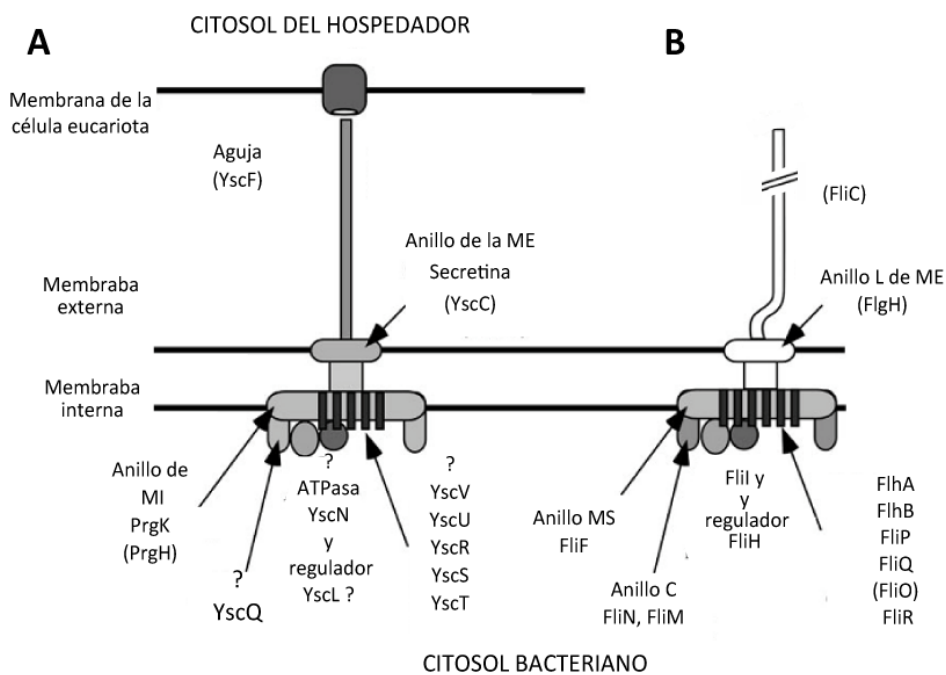
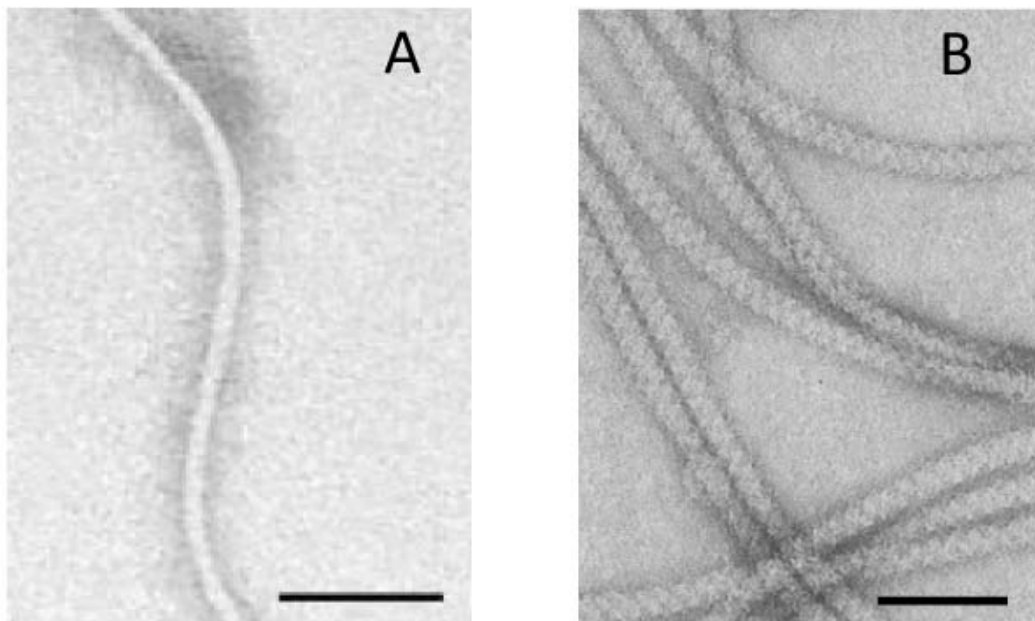


Figura I.11 Esquemas del Sistema de Secreción Tipo III (A) y del flagelo bacteriano (B). Ambos muestran una gran similitud en sus componentes estructurales y su biosíntesis. Modificado de Ghosh (2004).

encuentran contiguos y *flaD* está alejado en el mismo cluster. En ambas especies se ha propuesto que los dímeros se forman con un patrón FlaA-FlaX, siendo FlaA indispensable para que el flagelo sea funcional. *R. lupini* H13-3 tiene tres flagelinas: FlaA, FlaB y FlaC, también ubicadas contiguas. Los tamaños de todas las flagelinas varían entre 306 y 430 aminoácidos, correspondiéndose a masas moleculares de 31,6 kDa y 42 kDa, respectivamente. Comparando los genes de flagelinas en el genoma de cada una de estas especies, resultan muy similares entre sí. Por ejemplo, *S. meliloti* presenta identidades de entre 53 % y 81% en sus flagelinas. Sin embargo, si se hace la comparación entre especies, este porcentaje se reduce y se debe únicamente a la conservación de los extremos amino y carboxilo terminal. Esta conservación es característica de todas las flagelinas (Deakin *et al.*, 1999; Scharf *et al.*, 2001).

Recientemente se ha publicado un trabajo acerca de las 7 flagelinas que posee *R. leguminosarum*, 5 de ellas se encuentran ubicadas en el cluster principal del flagelo y tienen una alta homología. El tamaño de éstas es de entre 31 a 36 kDa. Se observó que FlaA es indispensable para la formación del flagelo, pues los mutantes de *R. leguminosarum*  $\Delta flaA$  carecen de flagelos (Tambalo *et al.*, 2010a). Mientras tanto, en *S. meliloti* y *R. lupini* H13-3 su delección genera la formación de un flagelo trunco y conduce a un fenotipo no móvil. FlaB y FlaC de *R. leguminosarum* también formarían parte del filamento, ya que mutantes en cualquiera de estos genes producen filamentos más

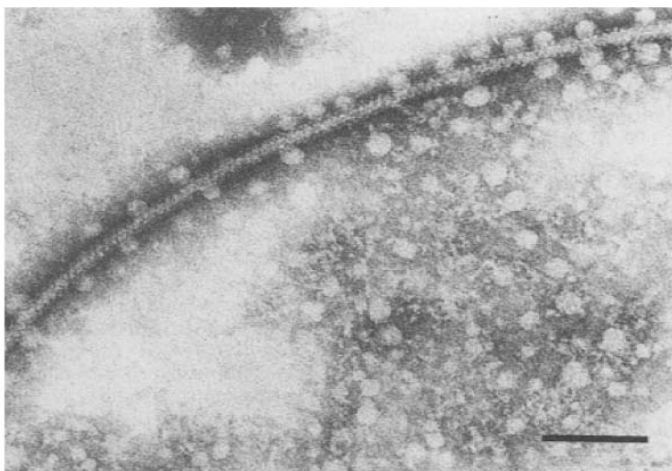


**Figura 1.12** Microscopía electrónica de transmisión. **A)** Flagelo simple (Kanbe *et al.*, 2007). **B)** Flagelo complejo (Krupski *et al.*, 1985). Las barras indican 100nm.

cortos. Por otro lado, mutantes en *flaD*, generan un flagelo funcional pero más fino. La hipótesis planteada por los autores es que la parte del flagelo más cercana al gancho estaría formada por FlaA, mientras que FlaB y FlaC se encontrarían en la región distal, y FlaD modificaría de alguna manera el diámetro del filamento en toda su longitud. El resto de las flagelinas, FlaH, FlaE y FlaG muestran un menor nivel de expresión y no parecen formar parte importante de la estructura. Por otro lado, contrariamente al aspecto de los flagelos de *S. meliloti* y *R. lupini*, las microscopías electrónicas muestran la superficie de los filamentos de *R. leguminosarum* lisa, como la de los flagelos simples. (Tambalo *et al.*, 2010a). Finalmente la distribución de los flagelos en *S. meliloti* (entre 5 y 10) y *R. leguminosarum* (entre 4 y 7) es peritrica.

Hasta el momento en que se inició este trabajo de Tesis había muy poca información sobre los flagelos de *B. japonicum*. La única publicación databa del año 1991, y es un trabajo enfocado principalmente en la quimiotaxis de *B. japonicum* 110spc104, donde además realizan una microscopía electrónica y encuentran un flagelo subpolar con estructura compleja (Kape *et al.*, 1991) (Figura I.13).

Por lo tanto, en el caso particular de *B. japonicum* resulta interesante el estudio de la movilidad en general y de los flagelos en particular, debido a la falta de conocimiento existente y al hecho de que los trabajos anteriores de nuestro laboratorio señalan a la movilidad como un factor crucial en la competitividad para nodular soja. Así, esperamos contribuir al conocimiento básico de la movilidad mediada por flagelos en esta especie, y al desarrollo de aplicaciones en la producción de inoculantes más competitivos para nodular soja en campos con población residente de rizobios noduladores de dicha leguminosa. Con ello esperamos lograr una ampliación del conocimiento generado que promueva aumentos de rendimiento del cultivo de soja en forma sustentable.



**Figura I.13** Microscopía electrónica de transmisión del flagelo de *B. japonicum* 110spc4 (Kape *et al.*, 1991). Sobre la superficie pueden apreciarse irregularidades típicas de los flagelos complejos similares a las mostradas en la Figura I.12.B. La barra indica 100nm.

## I.9 Objetivos de este Trabajo de Tesis

### I.9.1 Objetivo general

Generar nuevo conocimiento acerca de la movilidad de *B. japonicum*. A partir de ello procurar una mejora en la competición para la nodulación de las cepas de *B. japonicum* empleadas como inoculantes.

### I.9.2 Objetivos específicos:

- Analizar el comportamiento de una cepa de mayor movilidad en la competición para la nodulación, seleccionada de forma natural (sin manipulación genética) y mediante una técnica reproducible.
- Analizar la estructura de los flagelos de *B. japonicum*, su expresión y su contribución a la simbiosis con soja en medios porosos a capacidad de campo.

# Capítulo II

## Materiales y Métodos

## II.1 Cepas y plásmidos

Las cepas bacterianas, plásmidos y cebadores utilizados durante esta Tesis se detallan en las Tablas II.1 y II.2 respectivamente junto con sus principales características.

Tabla II.1 Cepas bacterianas

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>recA</i> , $\Delta lacU169$ , $\Phi 80dlacZ\Delta M15$ .	Bathesda Res. Lab
<i>E. coli</i> S17-1	<i>E. coli</i> 294 RP4-2-Tc::Mu-Km::Tn7 integrado en su cromosoma	Simon et al., 1983
USDA 110	Cepa salvaje Nod <sup>+</sup> Fix <sup>+</sup> Cm <sup>f</sup>	Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA)
<i>B. japonicum</i> LP 3004	Cepa derivada de <i>B. japonicum</i> USDA 110. Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> .	Lodeiro et al., 2000
<i>B. japonicum</i> LP 3008	Cepa derivada de <i>B. japonicum</i> 3004 más móvil	Althabegoiti et al., 2008
<i>B. japonicum</i> LP 6865	Derivado de LP 3004 $\Delta bll6865$ - <i>bll6866</i> . Sp <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	Esta Tesis
<i>B. japonicum</i> LP 6866	Derivado de LP 3008 $\Delta bll6865$ , <i>bll6866</i> . Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup>	Esta Tesis
<i>B. japonicum</i> LP 5843	Derivado de LP 3004 $\Delta bll5843$ - <i>bll5846</i> . Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
<i>B. japonicum</i> LP 5844	Derivado de LP 3008 $\Delta bll5843$ - <i>bll5846</i> . Cm <sup>R</sup> , Sm <sup>f</sup> , Km <sup>f</sup>	Esta Tesis
<i>B. japonicum</i> LP 6543	Derivado de LP 3004 $\Delta bll6865$ - <i>bll6866</i> $\Delta bll5843$ - <i>bll5846</i> . Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis
<i>B. japonicum</i> LP 6644	Derivado de LP 3008 $\Delta bll6865$ - <i>bll6866</i> $\Delta bll5843$ - <i>bll5846</i> . Cm <sup>R</sup> , Spc <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Esta Tesis



Tabla II.2 Plásmidos

Plásmidos	Características relevantes	Referencia
pRK2013	ColEI replicon, tra <sup>+</sup> de RK2, Km <sup>R</sup>	Figurski <i>et al.</i> 1979
pGemT-easy <sup>f</sup>	Vector multicopia, Ap <sup>R</sup>	Promega®
pK18mob	Mob <sup>+</sup> Km <sup>R</sup> , suicida en rizobios	Schafer <i>et al.</i> , 1994
pG18mob2	Mob <sup>+</sup> Gm <sup>R</sup> , suicida en rizobios	Kirchner <i>et al.</i> , 2003
pBBR1MCS4	Ap <sup>f</sup> , amplio rango de huésped	Kovach <i>et al.</i> , 1995
pHP45Ω	Ap <sup>R</sup> , Sm <sup>R</sup> , Sp <sup>R</sup> , donador del interposón Ω Sm/Sp	Prentki <i>et al.</i> , 1984
pHP45Ω-Km	Ap <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> , donador del interposón Ω Km	Fellay <i>et al.</i> , 1987
pMJA01	Derivado del pGemT-easy con el fragmento intergénico entre <i>bll6864</i> y <i>bll6865</i> (reg 1) comprendido entre las bases 7560766 y 7561159	Esta Tesis
pMJA02	Derivado del pGemT-easy con el fragmento intergénico entre <i>bll6866</i> y <i>bll6867</i> (reg 2) comprendido entre las bases 7563367 y 7563627	Esta Tesis
pMJA03	Derivado del pK18mob llevando el fragmento intergénico reg1	Esta Tesis
pMJA04	Derivado del pMJA03 llevando el fragmento intergénico reg2	Esta Tesis
pMJA05	Derivado del pMJA04, lleva ambos fragmentos reg1 y reg2 y el cassette ΩSm/Sp	Esta Tesis
pMJA06	Derivado del pGemT-easy con el fragmento del gen <i>bll5843</i> (reg3) comprendido entre las bases 6410133 y 6410727	Esta Tesis
pMJA07	Derivado del pG18mob2 llevando el fragmento reg3	Esta Tesis
pMJA08	Derivado del pBBR1MCS4 llevando un fragmento del gen <i>bll5846</i> (reg4) comprendido entre las bases 6418519 y 6418950	Esta Tesis
pMJA09	Derivado del pMJA07, llevando el fragmento reg4 proveniente del pMJA08	Esta Tesis
pMJA10	Derivado del pMJA09, lleva ambos fragmentos, reg3 y reg4, y el cassette Ω-Km.	Esta Tesis

## II.2 Plantas

Se trabajó con *Glycine max* (soja), variedad Don Mario 4800, provista por el Ing. Agr. Alejandro Peticari del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias de INTA (Castelar, Pcia. de Buenos Aires).

## II.3 Medios de cultivos para microorganismos y plantas.

### II.3.1 Medios de cultivo de microorganismos

El medio extracto de levadura-manitol (YEM) (Vincent, 1970a), se compone de: extracto de levadura 0,4 g l<sup>-1</sup>, manitol 10 g l<sup>-1</sup>, NaCl 0,1 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,2 g l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,5 g l<sup>-1</sup>. El medio YEM agarizado se preparó con agar 1,5% (p/v) y rojo congo 0,25% (p/v). La esterilización se realizó durante 20 minutos a 121°C en autoclave.

El medio mínimo de Götz (Götz *et al.*, 1982) se preparó siempre con agua bidestilada. Su composición es: manitol 5,00 g l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,06 g l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,53 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,25 g l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,13 g l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 15 mg l<sup>-1</sup>, NaCl 5,85 mg l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2,42 mg l<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,28 mg l<sup>-1</sup>, biotina 20 µg l<sup>-1</sup>, tiamina-HCl 20 µg l<sup>-1</sup>, riboflavina 20 µg l<sup>-1</sup>, ácido p-aminobenzoico 20 µg l<sup>-1</sup>, piridoxina 20 µg l<sup>-1</sup>. La mezcla de manitol, fosfatos, sulfato de amonio, cloruro de sodio y molibdato de sodio fue esterilizada en autoclave a 121°C por 20 minutos. Las soluciones de calcio y magnesio fueron esterilizadas en forma separada también por calor húmedo y se agregaron a la mezcla anterior una vez enfriada. Las mezclas de vitaminas y la solución de sulfato ferroso fueron esterilizadas por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22 µm) y luego agregadas al resto del medio esterilizado, una vez enfriado.

En algunas ocasiones se cambió la fuente de carbono del medio, utilizándose L-arabinosa, gluconato de sodio o extracto de levadura al 0,1%. Las mismas fueron esterilizadas individualmente por calor húmedo en soluciones 1% y también fueron agregadas al medio junto con el calcio y el magnesio.

El medio HM salino contiene Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,125 g l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,25 g l<sup>-1</sup>, NH<sub>4</sub>Cl 0,32 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,18 g l<sup>-1</sup>, FeCl<sub>3</sub> 4 mg l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 13 mg l<sup>-1</sup>, HEPES 1,3 g l<sup>-1</sup> y MES 1,1 g l<sup>-1</sup>. Se lo suplementó con extracto de levadura, L-arabinosa y gluconato de sodio 1 g l<sup>-1</sup>. Las soluciones de NH<sub>4</sub>Cl, MgSO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub> se esterilizaron individualmente en autoclave 20

minutos a 121°C y la de FeCl<sub>3</sub> por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22 µm). Estas soluciones se agregaron en esterilidad luego de autoclavar el medio.

El medio PSY contiene peptona 1 g l<sup>-1</sup>, extracto de levadura, 1 g l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,53 g l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,3 g l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> 0,3 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,1 g l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0,05 g l<sup>-1</sup> y micronutrientes: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0,1 mg l<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 mg l<sup>-1</sup>, Fe Cl<sub>3</sub> CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 0,5 mg l<sup>-1</sup>, MnCl<sub>2</sub> 0,15 mg l<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> y biotina 0,2 mg l<sup>-1</sup>. En forma independiente se autoclavaron el MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O y el CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O para completar el medio. La solución de micronutrientes se esterilizó por filtración con filtros Millipore de 0,22 µm y se preparó en un stock 1.000 X.

El medio de Luria-Bertani (LB) está compuesto por triptona 10 g l<sup>-1</sup>, extracto levadura 5 g l<sup>-1</sup>, ClNa 5 g l<sup>-1</sup>, glucosa 1 g l<sup>-1</sup>.

Los medios PSY y LB sólidos se obtuvieron agregando 15 g l<sup>-1</sup> de agar, y el medio semisólido de Götz agregando 3 g l<sup>-1</sup>.

Las cepas de *E. coli* fueron crecidas a 37°C en el medio LB y las cepas de *B. japonicum* fueron crecidas a 28°C en los medios YEM, Götz, PSY o HM según el experimento realizado.

### II.3.2 Solución para el cultivo hidropónico de plantas

Se utilizó la solución de Fåhraeus modificada (FMS) (Lodeiro *et al.*, 2000): CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O 0,11 g l<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,12 g l<sup>-1</sup>; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,20 g l<sup>-1</sup>; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,17 g l<sup>-1</sup>, NaCl 60 g l<sup>-1</sup>, citrato férrico 5 mg l<sup>-1</sup>, y los siguientes micronutrientes: KCl 3,73 mg l<sup>-1</sup>, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 1,55 mg l<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,85 mg l<sup>-1</sup>, CuSO<sub>4</sub>·5 H<sub>2</sub>O 0,13 mg l<sup>-1</sup>, ZnSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O 0,58 mg l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4 H<sub>2</sub>O 18 mg l<sup>-1</sup>, pH=7,0. Esta solución se preparó en agua bidestilada. La preparación de fosfatos, cloruro de sodio, citrato férrico y micronutrientes se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 20 minutos, y luego de permitir su enfriamiento hasta temperatura ambiente, se le agregaron las sales de calcio y magnesio de preparaciones 1.000 X previamente esterilizadas por calor húmedo.

## II.4 Procedimientos microbiológicos

### II.4.1 Conservación de las bacterias

Para mantener a largo plazo las cepas, se crecieron previamente hasta fase logarítmica tardía en YEM o LB según fuesen rizobios o *E.coli* respectivamente, y se

suplementaron con glicerol al 25% (v/v) y 50% (v/v) para su conservación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para uso rutinario, alícuotas de estas reservas se hicieron crecer en YEM sólido con los antibióticos correspondientes y se mantuvieron a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  por períodos que no excedieron de 60 días.

#### II.4.2 Cultivos bacterianos y preparación de inóculos

Para la mayoría de los ensayos, los cultivos se iniciaron a partir de reservas en medio sólido mantenidas a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  y se hicieron crecer en el medio de Götz  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación rotatoria a 180 rpm hasta saturación. Este cultivo se diluyó 1:100 en el mismo medio fresco y se dejó crecer durante tres días para asegurar que todas las células estuvieran en fase exponencial. A partir de este cultivo iniciador, se realizaron diluciones 1:50 en los medios a estudiar y se continuó su cultivo en las mismas condiciones hasta la fase de crecimiento deseada. Exceptuando la dilución final, las restantes se hicieron con el agregado del antibiótico correspondiente.

El crecimiento en medio de Götz semisólido se realizó inoculando las placas con un palillo en la parte central y permitiendo el crecimiento durante 13 a 15 días. Las placas se colocaron en estufa a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  con la tapa hacia arriba y cubiertas con parafilm para evitar su desecación.

#### II.4.3 Estimación de la biomasa y recuento en placa

La biomasa se estimó por lecturas de densidad óptica a la longitud de onda indicada, 500 nm para *B. japonicum* y 600 nm para *E. coli*. El número de células viables se estimó por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) sobre el medio YEM. Los recuentos se realizaron por triplicado. Previamente se había determinado que el recuento de las UFC en el medio YEM sólido arrojaba los mismos resultados que en Götz sólido (López García, 2004). Las placas se incubaron a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  y las colonias fueron visibles a partir de los 5 días. De forma alternativa, se empleó el método de la gota para realizar los recuentos de UFC (Hoben *et al.*, 1982), en el cual se colocan gotas de 5  $\mu\text{l}$ , en las que se puede contar entre 5 y 40 UFC. Se colocaron de 10 a 15 gotas por dilución y se realizaron 3 diluciones por placa.

#### II.4.4 Antibióticos

Los antibióticos se prepararon en agua bidestilada (exceptuando la espectinomicina, que se preparó en metanol) a una concentración 1.000 X y se esterilizaron por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ ). Las concentraciones finales en los medios de cultivo fueron (en  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ):

-Para *Escherichia coli*: kanamicina sulfato (Km) 25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , ampicilina (Ap) 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , estreptomicina (Sm) 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , espectinomicina (Sp) 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , y gentamicina (Gm) 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

-Para *B. japonicum*: Km 150  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Sm 400  $\mu\text{g ml}^{-1}$ , Sp 200  $\mu\text{g ml}^{-1}$  y Gm 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ .

#### II.4.5 Preparación de células electrocompetentes de *E. coli*

La preparación de células electrocompetentes fue realizada según Tung y Chow (1995), con leves modificaciones. Se inocularon 300 ml de medio LB sin NaCl, con 1 ml de un cultivo de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , que había sido crecida desde el día anterior. El cultivo fue incubado a 37°C y agitado a 180 rpm en agitador orbital hasta que se alcanzó una densidad óptica a 600 nm de 0,6 unidades; momento en el cual se procedió al enfriamiento del cultivo en agua hielo durante 30 minutos. Luego, las células se centrifugaron 15 minutos a 4.000  $\times$  g. y se lavaron con 50 ml de glicerol 10% frío. Este procedimiento se realizó dos veces a 4°C. Las bacterias se resuspendieron suavemente en glicerol 10% frío y se fraccionaron en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$ , que se conservaron -80°C.

#### II.4.6 Electrotransformación de células electrocompetentes de *E. coli*

Los vectores plasmídicos construidos requeridos se introdujeron en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  y S17-1, mediante la técnica de electrotransformación. Para este procedimiento se utilizó un equipo Gene Pulser (Bio-Rad) y cubetas comerciales de 0,2 cm de ancho (Gene Pulser Cuvette Bio-Rad), bajo las condiciones recomendadas por el fabricante (25 $\mu\text{F}$ , 200 $\Omega$ , 2,5 kV). Inmediatamente después de la electrotransformación, se adicionó a las células 1 ml de medio LB fresco, y la mezcla se incubó 1 hora a 37°C para permitir que los plásmidos introducidos se replicaran. Pasado este tiempo, se plaquearon las bacterias en medio LB sólido selectivo y se incubaron el tiempo necesario en estufa a 37°C.

### II.4.7 Conjugaciones triparentales

Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon (Simon *et al.*, 1989) con modificaciones menores según se indica a continuación. Las cepas receptoras de *B. japonicum* fueron crecidas en el medio PSY sin antibiótico durante 5 días hasta una  $DO_{500nm}$  aproximada de 0,5 unidades. Las cepas de *E. coli* se diluyeron a medio LB fresco sin antibiótico 3 o 4 horas antes de la conjugación y se dejaron alcanzar una  $DO_{620nm}$  similar. Las cepas de *E. coli* que se utilizaron fueron la DH5 $\alpha$  con el plásmido que se desea transferir y la que lleva el plásmido pRK2013 (Figurski & Helinski, 1979), el cual aporta en *trans* los genes necesarios para la movilización.

Para realizar la conjugación se mezclaron 0,4 ml de cada una de las cepas de *E. coli* con 0,7 ml del cultivo de la cepa receptora en un tubo de polipropileno de 1,5 ml y se centrifugaron a 640 x g durante 8 minutos. El precipitado fue resuspendido suavemente en 50-75  $\mu$ l del mismo medio. Dicho resuspendido fue colocado en placas de PSY sólido en forma de gota y se incubó durante 48 horas a 28°C. Luego la gota fue resuspendida en 1 ml de medio YEM fresco y plaquada en el/los antibiótico/s correspondiente/s para la selección de transconjugantes. El mismo procedimiento se realizó como control para cada una de las cepas.

## II.5 Técnicas de biología molecular

### II.5.1 Preparación de ADN plasmídico

Los plásmidos de *E. coli* fueron preparados por la técnica de lisis alcalina descrita por Sambrook (Sambrook, 1989). Brevemente, se suspendieron bacterias crecidas en medio sólido en una solución Tris-HCl 50 mM, EDTA 10 mM, pH=8.0. Se agregó luego una solución de NaOH 0,2 M, SDS 1% y se mezcló por inversión suave. Finalmente, se agregó una solución de KAc 3 M, pH=4.8 mezclando suavemente. Luego se centrifugó la mezcla a 14.000 x g durante 15 minutos a 4°C y se agregó 15  $\mu$ l de silica clean. Se centrifugó a 14.000 x g y se lavó el sedimento tres veces con una solución de NaCl 50 mM, Tris 10 mM pH=7.5, EDTA 2,5 mM y etanol 50%. Posteriormente se dejó secar y se resuspendió en 20-30  $\mu$ l de agua bidestilada, se incubó durante 5 minutos a 65°C, se centrifugó a 14.000 x g y se tomó el sobrenadante conteniendo el ADN plasmídico.

### II.5.2 Extracción de ADN total

Se utilizaron dos técnicas de extracción de ADN total para molde de reacción de la polimerasa en cadena (ver más adelante):

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

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

### II.5.3 Extracción de ARN total

La extracción de ARN total de *B. japonicum* se realizó a partir de cultivos en fase exponencial tardía los que fueron centrifugados a 14.000  $\times$  g durante 40 minutos a 4°C. Posteriormente, los precipitados se resuspendieron en *buffer* TE pH 8 y las muestras se sometieron a ultrasonido para ayudar a la lisis bacteriana, en un volumen pequeño del mismo medio de cultivo en el cual crecieron las bacterias y en hielo. La lisis finalmente

se completó con la adición del Trizol (Invitrogen). Posteriormente se siguieron los pasos indicados por el fabricante. Una vez obtenido el ARN total este se cuantificó por medida de su absorbancia a 260 nm y se trató cada muestra con ADNasa I (Invitrogen) según lo indica el fabricante para eliminar cualquier contaminación de ADN que existiese.

El ARN se resuspendió en agua bidestilada tratada con DEPC. Se verificó la ausencia de ADN realizando una PCR previa a la retrotranscripción. La muestra conteniendo ARN se conservó a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

#### II.5.4 Transcripción reversa

En una primera etapa se realizó la retrotanscripción con la enzima SuperScript III (Invitrogen) utilizando hexámeros al azar (random primers) para obtener los ADN complementarios (ADNc) de LP 3004 y LP 3008 según las indicaciones del fabricante. En una segunda etapa, se realizaron las reacciones de PCR para cada gen de interés en cada una de las cepas, en tubos separados y utilizando como molde el ADNc.

#### II.5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los ensayos de PCR fueron realizados empleando un ciclador térmico. La composición de las mezclas de reacción fue: buffer Tris-HCl 50 mM pH=8.3, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 200  $\mu\text{M}$  dNTP'S; 2 U de Taq polimerasa y 10  $\mu\text{M}$  de cada uno de los cebadores (primers), completando un volumen final de mezcla de reacción, para todos los casos, de 20  $\mu\text{l}$ . Los cebadores empleados están listados en la Tabla II.3. y fueron sintetizados por encargo en Operon Comp. (EE.UU.).

El ciclado se hizo respetando el esquema básico de una desnaturalización inicial de 3 minutos; 35 ciclos de desnaturalización, pegado (annealing) y elongación; y por último, una elongación final. En todos los casos, la desnaturalización se realizó a  $94^{\circ}\text{C}$  y la elongación a  $72^{\circ}\text{C}$  (temperatura óptima de elongación de la Taq polimerasa). Dependiendo del juego de primers utilizado, se fijó la temperatura de annealing y los tiempos los determinó el largo del fragmento que se quiso amplificar en cada caso.

Al finalizar las reacciones de PCR, 10  $\mu\text{l}$  de cada uno de los productos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa.



Tabla II.3 Cebadores utilizados

Cebadores	Secuencia	Referencia
M13 Fw	GTAAAACGACGGCCAGT	Producto comercial
M13 Rv	GCGGATAACAATTCACACAGG	Producto comercial
<i>nptII</i> Fw	GATTGTCTGTTGTGCCCA	Dra Hozbor
<i>nptII</i> Rv	CGGTGGATGACCTTTTGAAT	Dra Hozbor
Spc/Sm	CGGTGGATGACCTTTTGAAT	Quelas <i>et al.</i> , 2010
reg1 Fw	TCCAGCAGATTGTTGAGCAG	Esta Tesis
reg 1 Rv	CAACCAGAACAGCCAGAGCA	Esta Tesis
reg 2 Fw	CTTTGGACTGATGTGGGTGG	Esta Tesis
reg 2 Rv	TGCCGTTCAAGATGCTGTTC	Esta Tesis
reg 3 Fw	GTGGTCAGACCGAGCTTAT	Esta Tesis
reg 3 Rv	CAGCAACGTGCTCTATACCG	Esta Tesis
reg 4 Fw	GACGTTGGACTTGGTGGAGT	Esta Tesis
reg 4 Rv	GTTAGAGGTCTCGGCACCAG	Esta Tesis
bll6864 FwCh	ACAGCTCGTAACCGGAATTG	Esta Tesis
bll6867 RvCh	CAGATTCCGGACCTCAACTC	Esta Tesis
bll5843 FwCh	GTCAAATGGTTCGCCTGAAG	Esta Tesis
bll5843 RvCh	TCTCCATCAACGCTTTCGTA	Esta Tesis
int bll6865-6 Fw	GACAGGTTGGGTCCTTCACA	Esta Tesis
bll6864 Rv	TCCAGCAGATTGTTGAGCAG	Esta Tesis
bll6867 Fw	TGCCGTTCAAGATGCTGTTC	Esta Tesis
int bll6865-6 Rv	GGCTTGTGGCTCTGTGACTC	Esta Tesis
<i>fliCI</i> Fw	CCTCACCAACTCGTCTGCAA	Esta Tesis
<i>fliCI</i> Rv	CCGTGTTTCAGAGCGGTGTATT	Esta Tesis
<i>fliCII</i> Fw	GGTTACATCGCGCAGGTCA	Esta Tesis
<i>fliCII</i> Rv	GGGTGGACTCCTGGTTCATGT	Esta Tesis
<i>fliC1</i> Fw	CGATGGCACCACCGTACTGT	Esta Tesis
<i>fliC1</i> Rv	ACCGCGGTTCCCTCATAGA	Esta Tesis
<i>fliC234</i> Fw	CGGCTCCTTTGCAAGCACT	Esta Tesis
<i>fliC234</i> Rv	TTCACGGTCAGCGTATCGC	Esta Tesis

Tabla II.3 (continuación)

Cebadores	Secuencia	Referencia
int <i>fliC1-II</i> Fw	TTCACGGTCAGCGTATCGC	Esta Tesis
int <i>fliC1-II</i> Rv	TTCACGGTCAGCGTATCGC	Esta Tesis
int <i>fliC1-2</i> Fw	CTCCAGCTGCTCCGCTAGTAA	Esta Tesis
int <i>fliC1-2</i> Rv	ACTGACGCCGAGAGAACGA	Esta Tesis
int <i>fliC2-3</i> Fw	GGCAGACATCGCAAGCAA	Esta Tesis
int <i>fliC2-3</i> Rv	ACCATAAGCGGGTGGGAAG	Esta Tesis
int <i>fliC3-4</i> Fw	ACATCGCAAGCAAGATCCG	Esta Tesis
int <i>fliC3-4</i> Rv	GCAACGCAACAACTTCGATT	Esta Tesis
<i>sigA</i> Fw	CTGATCCAGGAAGGCAACATC	Hauser <i>et al.</i> , 2006
<i>sigA</i> Rv	TGGCGTAGGTCGAGAACTTGT	Hauser <i>et al.</i> , 2006

#### II.5.6 Tratamientos enzimáticos del ADN

Las digestiones con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las indicaciones de temperatura y buffer propuestas por el proveedor de las enzimas y las recomendaciones descriptas en Sambrook *et al.* (1989). Las reacciones se llevaron a cabo habitualmente con 0,5-5 µg de ADN en agua libre de ADNasas, el buffer correspondiente suministrado en el *kit* comercial (10 X) y 0,5-1 unidad de la enzima a utilizar en un volumen final de 20 µl. Las mezclas de reacción fueron incubadas a la temperatura óptima de las enzimas utilizadas por un período de tiempo de al menos de dos horas.

#### II.5.7 Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis horizontal en geles de agarosa fue la técnica que se utilizó para observar las diferentes clases ácidos nucleicos y los productos obtenidos del tratamiento con enzimas de restricción, así como los de las reacciones en cadena de la polimerasa. El porcentaje de agarosa de la solución (0,8-1,5% p/v) preparada empleando solución tampón Tris-bórico-EDTA (TBE, Tris 89 mM, EDTANa<sub>2</sub> 2,5 mM, BO<sub>3</sub>H<sub>3</sub> 89 mM, pH 8,2) se eligió según el producto que se deseaba observar. Las muestras se mezclaron para su siembra con solución de carga (sacarosa 40%, azul de bromofenol 0,25% en una relación 5 µl solución de ADN en agua o TE/µl solución de carga) y las corridas se realizaron a voltaje constante (80 a 120 volts), utilizando como solución tampón de corrida el mismo TBE.

### *II.5.8 Revelado de geles y fotografía*

La visualización de los fragmentos de ADN se realizó con el agregado de  $0,5 \mu\text{g ml}^{-1}$  de bromuro de etidio a los geles de agarosa por transiluminación con luz ultravioleta de  $\lambda=260 \text{ nm}$ . Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del fago  $\lambda$  digerido con *HindIII*. El registro de los resultados se realizó mediante fotografía de los geles con una cámara digital Kodak modelo DC 120 (software-EDAS-Kodak) bajo iluminación ultravioleta.

### *II.5.9 Secuenciación de los fragmentos de ADN*

El ADN fue secuenciado utilizando un analizador ABI3730XL, por encargo en Macrogen Inc. (Corea del Sur).

## **II.6 Manipulación de proteínas**

### *II.6.1 Obtención de flagelina*

Los cultivos se crecieron a 180 rpm y  $28^{\circ}\text{C}$ , durante el tiempo requerido. En el momento de ser procesados se preenfriaron en agua-hielo, se agitaron por vortex cada uno durante 4 minutos y se centrifugaron a  $11.000 \times g$  durante 30 minutos. El sobrenadante se precipitó con PEG 1,33% y NaCl 166 mM finales durante dos a tres horas a  $4^{\circ} \text{C}$ . Posteriormente se centrifugaron a  $15.000 \times g$  durante 40 minutos y el precipitado se resuspendió en el menor volumen posible. En los casos en que el volumen fuera muy grande se volvió a centrifugar en tubos de polipropileno de 1,5 ml a mayor velocidad con el fin de concentrar más la muestra. El precipitado resuspendió en agua y buffer de siembra de geles desnaturizantes (Laemmli, 1970).

### *II.6.2 Extracción de flagelina de cultivos crecidos en medio de Götze con diferentes fuentes de carbono*

En este caso la extracción se realizó con el mismo protocolo, pero se preparó el medio de Götze con la composición salina base y cada una de las fuentes de carbono por separado (en una concentración 10 X). Cada medio se completó en esterilidad luego de autoclavar. En estas purificaciones se realizó una pequeña modificación del protocolo a fin de analizar si se perdía flagelina en alguna de las fracciones. Dicha modificación se describe en el Capítulo III.

### II.6.3 Obtención de proteínas extracelulares

Se siguió la técnica descrita por Finnie *et al.* (1997). Las proteínas extracelulares se prepararon a partir de 150 ml de sobrenadante de cultivo. Para esto, las células se centrifugaron a 15.000 x g por 45 minutos dos veces y se separó el sobrenadante. Sobre el mismo se agregó ácido tricloroacético (TCA) hasta una concentración final de 7,5% (v/v) y se incubó a 4°C toda la noche. El precipitado se centrifugó a 15.000 X g por 45 minutos a 4°C y se lavó 2 ó 3 veces con etanol 70% frío y finalmente con acetona para eliminar los restos de TCA. El precipitado se resuspendió en agua y buffer de siembra de geles desnaturizantes (Laemmli, 1970).

### II.6.4 Análisis de proteínas mediante geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Se empleó la metodología de Laemmli (1970). Los geles de apilamiento se prepararon con 5% de poliacrilamida en Tris -HCl a pH 6,8, mientras que los de separación se hicieron con 12,5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 8,8. En ambos casos con el agregado de SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, para obtener desnaturizantes y disociantes. Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 minutos a voltaje constante de 100 o 130 volts.

### II.6.5 Tinción de las proteínas

-Tinción Coomassie Blue R-250: para esta tinción el gel se incubó en solución de tinción (0.2% Coomassie Blue R-250 disuelto en agua bidestilada, metanol, ácido acético (45:45:10) por al menos 1 hora. Para la visualización de las bandas el gel se destiñó en una solución agua:metanol: ácido acético en proporción

- Tinción con Nitrato de Plata: luego de la corrida electroforética el gel se fijó por al menos 2 horas en solución conteniendo: metanol, ácido acético y agua (50:10:40). Posteriormente se procedió al lavado del gel con etanol 50% y una vez con etanol 30%. Se realizó luego un tratamiento con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.02% p/v durante 1 minuto con tres lavados posteriores de 20 segundos cada uno con agua bidestilada. Luego se incubó durante 20 minutos con solución de  $\text{AgNO}_3$  0.2% p/v con 75  $\mu\text{l}$  de HCOH 37%. Seguidamente se realizaron dos lavados de 20 segundos cada uno con agua bidestilada. Finalmente se reveló con una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  6% p/v,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.4 mg 100 ml<sup>-1</sup>, 50  $\mu\text{l}$  de HCOH 37%. Una vez que se observó la aparición de las bandas

correspondientes se lavó con agua bidestilada 2 veces de 2 minutos cada una. Luego se detuvo la reacción con metanol 50%, ácido acético 12%.

#### II.6.6 Inmunodetección

Las muestras de proteínas sometidas previamente a corridas electroforéticas fueron transferidas a membranas de difluoruro de olivinildieno (PVDF) (Immobilon, Millipore) utilizando el equipo Mini Trans-Blot transfer Cell (BioRad) según las indicaciones del fabricante. Las membranas transferidas fueron bloqueadas en sus sitios inespecíficos con las proteínas de leche descremada (San Regim) 5% p/v en buffer TBS (Tris-HCl 12 mM, NaCl 4 mM). Seguidamente la membrana se trató con el primer anticuerpo en una dilución 1:500 o 1:1000 en buffer TBS - leche 5% p/v. La membrana con el anticuerpo se incubó O.N a 4°C y con agitación suave. Se retiró la solución con el anticuerpo y se realizaron 6 lavados con buffer TBS- leche 5% p/v. Luego se agregó el segundo anticuerpo específico para IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc.) disuelto en TBS-leche en una dilución 1:1000; se incubó durante 2.5 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Se retiró la solución del segundo anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS y un lavado en buffer para fosfatasa alcalina (PA: 50 mM NaCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris-HCl pH 9.5). Finalmente en el momento del revelado se preparó una solución con el sustrato de la fosfatasa alcalina que consistió en 4,4 µl de NBT (Nitroblue Tetrazolium Chloride) y 3,3 µl de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-indolylphosphate p-toluidine) en 1 ml de buffer PA. Una vez que se desarrolló color se detuvo la reacción con agua bidestilada.

#### II.6.7 Identificación de los polipéptidos mediante digestión trípica y MALDI-TOF(matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometer)

Esta tarea fue realizada en la Universidad de Bielefeld, Alemania.

### II.7 Obtención de anticuerpos

Para obtener el antisuero reactivo frente a las proteínas FliCI-II se inmunizaron, mediante inyección intraperitoneal, 3 ratones con 6 µg de proteína utilizando adyuvante de Freund. Se realizaron dos inmunizaciones más sin adyuvante con intervalos de 14 días, después de las cuales los ratones fueron sangrados a blanco y se obtuvo el suero de los mismos.

## II.8 Microscopía

### II.8.1 Electrónica de Transmisión

Cultivos líquidos de *Bradyrhizobium* se crecieron hasta fase exponencial y luego se dejaron un día en reposo para evitar el desprendimiento de los flagelos. Posteriormente se alícuotas fueron transferidas a una rejilla cubierta con una película de carbono activado a través de evaporación al vacío. Después de 30 s, el exceso de líquido se eliminó un papel de filtro y la muestra se tiñó con 2% de fosfotungstato de potasio (pH 5,2, el 2% p/v KOH). El microscopio usado fue un JEM 1200 EX (Laboratorio JEOL, Japón Óptica Electron Cot, Ltd).

### II.8.2 Electrónica de barrido- Scanning electron microscope- (SEM)

Las muestras de raíces de soja fueron fijadas según (Barahona *et al.*, 2010).

### II.8.3 Óptica

Las observaciones de bacterias se llevaron a cabo con un microscopio óptico Carl Zeiss Jenaval con aumentos de 500 X o 1.000 X y se registraron con una cámara digital Canon Powershot A610 acoplada. Alternativamente se usó un microscopio Nikon Eclipse E400 equipado con una cámara digital Nikon CoolPix 4500.

## II.9 Ensayos Biológicos

### II.9.1 Esterilización superficial y germinación de las semillas

Las semillas se sumergieron unos segundos en alcohol 96° y luego diez minutos en solución de lavandina comercial diluida al 20% v/v con agitación a 28°C. Seguidamente, se lavaron al menos seis veces con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas de esta manera se germinaron sobre una superficie de agar-agua al 1,5% durante dos a cuatro días en la oscuridad a 28°C.

### II.9.2 Quimiotaxis

El ensayo se realizó como una modificación del Test de Adler (Adler, 1973). Los cultivos de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 se crecieron a 28°C y 180 rpm hasta fase logarítmica temprana y aproximadamente  $2 \cdot 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. Se colocaron 200 µl de cultivo

en tubos de polipropileno y se pusieron capilares de 1,40 mm de diámetro conteniendo un quimioattractante en contacto con el cultivo bacteriano durante 30 minutos. Se realizaron triplicados de cada tubo. Las bacterias que ingresaron a un capilar se recuperaron y se llevaron a cabo las correspondientes diluciones para el posterior recuento en placas de YEM. La quimiotaxis se cuantificó con el coeficiente  $R$ , el cual es el cociente entre las UFC recuperadas de los tubos con attractante y las UFC recuperadas de los tubos control. Se realizó una media de  $R$  en cada caso y se calculó el error típico de la media.

### II.9.3 Adhesión

Los rizobios se crecieron hasta fase logarítmica en el medio de Götz y se diluyeron en FMS hasta  $10^3$  rizobios  $\text{ml}^{-1}$ . Luego se incubaron 50 ml de la suspensión con 10 plántulas de soja durante 1 y 4 horas a  $28^\circ\text{C}$  y 50 rpm. Al cabo de este tiempo se realizaron 4 lavados de un minuto a 120 rpm con 50 ml de FMS. Posteriormente se procedió a cortar las semillas de las plántulas y colocar las raíces (con la bacterias que permanecieron adheridas) en una placa de Petri cubriéndolas con medio YEM agarizado fundido a  $45^\circ\text{C}$  y con los correspondientes antibióticos. Luego de aproximadamente 5 días a  $28^\circ\text{C}$  se pueden estimar los eventos de adhesión contando las microcolonias que crecen sobre la superficie de la raíz (Figura II.1). El recuento se realizó con lupa binocular iluminada. Para analizar los datos se realizó un cálculo del Índice de Adhesión -A%- (Caetano-Anolles G & G, 1986b) definido como la relación entre el número de rizobios adheridos a 10 raíces de soja y las UFC totales. Este experimento fue repetido en dos ocasiones.

### II.9.4 Infectividad

En dos ensayos independientes evaluamos la infectividad de las cepas LP 3004 y 3008. Se utilizaron en cada ensayo 14 bolsas por condición y se dejaron dos sin inocular como control negativo. Los cultivos bacterianos crecidos en el medio de Götz durante 5 días hasta fase exponencial se diluyeron en FMS con el fin de inocular  $10^4$  UFC planta<sup>-1</sup>. Los ensayos se realizaron siguiendo la metodología de Bhuvanewari *et al.* (1980). Brevemente, tres semillas estériles y germinadas durante cuatro días se transfirieron en forma aséptica a bolsas plásticas previamente humedecidas con 10 ml de solución de Fåhraeus modificada. Se llevaron al invernáculo, donde permanecieron hasta el día siguiente cuando se marcaron, sobre la superficie de la bolsa plástica, las

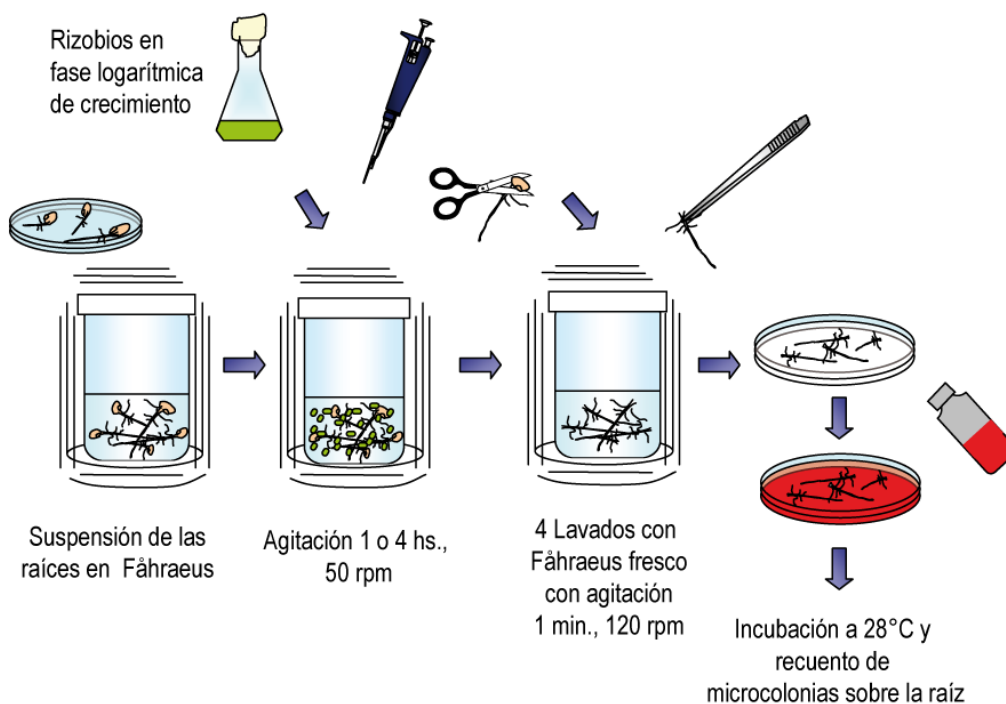
posiciones de la punta de la raíz (PR) y de los pelos radicales emergentes más pequeños (PEMP) de cada planta.

Se inoculó cada raíz con 0,5 ml de solución bacteriana, excepto las que se dejaron como control sin inocular. Las plantas inoculadas y los controles sin inocular se trasladaron al invernáculo y se mantuvieron, durante 21 días, con temperatura diurna de 26°C, nocturna de 18°C y 14 h de fotoperíodo, con riegos periódicos de agua destilada estéril. Los resultados se evaluaron promediando las distancias, en cada planta, del nódulo más alto a la marca de la PR en mm y, por otra parte, graficando la distribución de los nódulos sobre la raíz principal en unidades relativas de distancia (URD), esto es:

$$D_U = D_L / URD$$

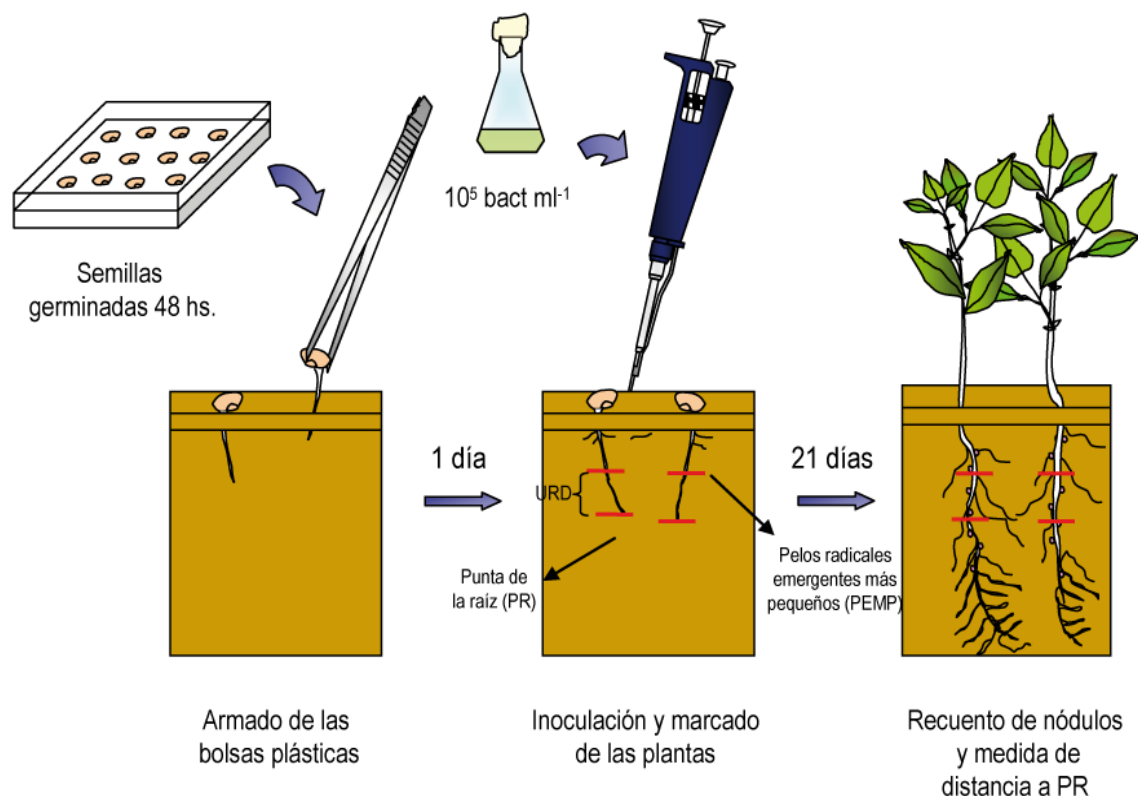
donde  $D_U$  es la distancia del nódulo hasta PR (en URD),  $D_L$  es la distancia (en mm) del nódulo hasta la PR y URD es la longitud (en mm) entre la marca de PR y PEMP. Este cálculo normaliza los resultados ya que compensa las diferencias entre plantas con raíces de distinta longitud (Bhuvanewari *et al.*, 1980).

En la figura II.2 se muestra un esquema del diseño experimental. Luego de 21 días se cosecharon las plantas y se graficó la distribución de los nódulos sobre la raíz principal en URD respecto a la marca de PR.



**Figura II.1** Esquema del ensayo de adhesión. Las bacterias se incubaron con las raíces durante 1 o 4 horas y luego se realizaron 4 lavados suaves con FMS. Se cortaron las semillas y se incubaron las raíces con medio sólido para que crezcan sobre la superficie las microcolonias que quedaron adheridas.





**Figura II.2** Determinación de la infectividad en bolsas plásticas de crecimiento. Al momento de la inoculación se marcó sobre la bolsa la región infectable comprendida entre los pelos emergentes más pequeños (PEMP) y la punta de la raíz (PR) (rayas rojas, izquierda). Esta distancia (URD) es diferente en cada raíz. Luego de 21 días se mapeó la posición de los nódulos en relación con dicha zona (derecha). Los nódulos observados allí provenían de infecciones iniciadas dentro de las seis horas inmediatas a la inoculación (el tiempo requerido para que los pelos radicales de esa zona maduren y se vuelvan no infectables). Los nódulos registrados por debajo de esa zona correspondieron a infecciones más tardías. Así, el recuento de las proporciones relativas de nódulos en cada zona permitió cuantificar la infectividad.

#### II.9.5 Determinación del potencial hídrico y movilidad en arena

La determinación del potencial hídrico de las muestras fue llevada a cabo en el Instituto de Investigaciones en Fisiología Vegetal (INFIVE), UNLP. Se utilizaron sensores Wescor, diseñados para medir humedad de suelos en el campo.

Para diseñar el ensayo de movilidad en arena se evaluó la cantidad de líquido y arena a colocar en las cajas, a fin de que estas se encuentren a capacidad de campo. En las pruebas realizadas estimamos que las proporciones a ensayar se encontraban entre 4,2 a 4,6 g de arena  $\text{ml}^{-1}$  de Götz. Luego seleccionamos valores de 4,2; 4,35 y 4,45 g de arena  $\text{ml}^{-1}$  de Götz para finalmente quedarnos con la proporción de 4,45 g de arena  $\text{ml}^{-1}$  de Götz. Las cajas se llenaron con aproximadamente 30 g de arena y los ml de Götz correspondientes. Una vez listas las cajas, se colocan 20  $\mu\text{l}$  de un cultivo con aproximadamente  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  en el centro de la placa, de modo que el número total de bacterias inoculado fue de aproximadamente  $10^6$  UFC. A continuación se sellaron con papel film y se incubaron en estufa a  $28^\circ\text{C}$ , controlando el nivel del estante. Una vez

transcurrido el tiempo deseado, las muestras fueron tomadas a diferentes distancias del punto de inoculación con puntas de P5000, simulando un “sacabocados”. Las mismas se resuspendieron en 200 µl de medio YEM fresco y se estimó por pesada la cantidad de arena. Se realizaron los plaqueos directos y diluciones en el medio agarizado a fin de realizar el recuento de los rizobios recuperados.

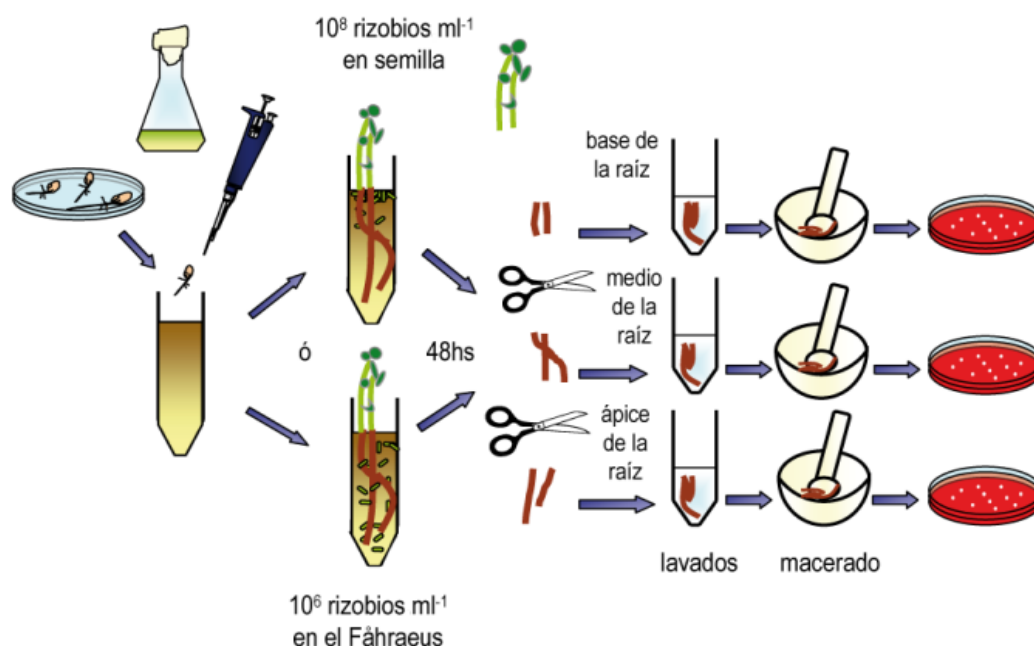
#### II.9.6 Colonización en vermiculita a tiempos cortos

En cada ensayo se emplearon 5 plantas en tubos individuales para cada una de las cepas LP 3004 y LP 3008 y se incubaron 48 horas, tiempo que permitió la correcta manipulación de las raíces. Se realizaron dos variaciones de este ensayo, el primero inoculando el cultivo en fase logarítmica (aproximadamente  $10^8$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ) sobre la semilla habiendo regado la vermiculita con FMS y en el otro caso, el sustrato fue regado con una suspensión de las bacterias en similar estado fisiológico en FMS (aproximadamente  $10^6$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$ ) hasta capacidad de campo. En todos los ensayos LP 3004 y LP 3008 se inocularon individualmente. Al cabo de ese período las raíces se cortaron en tres partes iguales y con las bacterias adheridas se lavaron cuatro veces con 50 ml de FMS durante un minuto a 120 rpm cada vez. Posteriormente se agregaron 0,2 ml FMS a cada raíz y se realizó el macerado. Se hicieron las diluciones correspondientes y se realizó el recuento en placa.

#### II.9.7 Colonizaciones a tiempos prolongados en jarra de Leonard (macetas Riviera)

Se utilizó perlita como sustrato sólido, la cual fue autoclavada junto con las macetas, conteniendo el medio FMS. Una vez esterilizado el sustrato, se humedeció nuevamente con el medio mineral sin N. Las semillas germinadas fueron transplantadas a las macetas riviera, colocando 4 semillas por maceta. Cada ensayo de colonización/competición se realizó por triplicado. Los cultivos bacterianos se realizaron en el medio de Götz, se llevaron a fase log durante 4-5 días, y se inocularon aproximadamente  $1 \times 10^8$  UFC totales por planta ( $5 \times 10^7$  de cada cepa), en un volumen final de 1 ml. Para cada competición el inóculo con ambas cepas fue preparado previamente en un volumen final de 15 ml, suficiente para realizar todas las inoculaciones.

El riego de las macetas se mantuvo de acuerdo a la necesidad de las plantas que pueden absorber el agua por capilaridad en el sistema. Las condiciones de invernáculo fueron las mencionadas en el ensayo de infectividad.



**Figura II.3** Esquema del ensayo de colonización. Una vez que preparado el tubo con vermiculita y FMS a capacidad de campo, se colocaron las semillas germinadas y se inocularon las bacterias en la posición deseada. Luego de 48hs se dividieron las raíces en tres partes iguales y se desprendieron y contaron las bacterias en cada tercio de raíz.

#### II.9.8 Procesamiento de las muestras: aislamiento de bacterias de la rizósfera

Luego de 3 semanas las plantas de soja fueron recuperadas de las macetas suavemente permitiendo el desprendimiento del sustrato. Cada maceta conteniendo 4 plantas fue considerada un experimento independiente. De cada maceta se tomaron las 4 plantas y de cada raíz (primaria y las que se pudo de las secundarias) se recuperó 1 cm de la parte apical. Se las pesó todas juntas y luego se agregaron 3 ml de FMS y se procedió a la liberación de las bacterias por agitación con vortex durante 2 minutos. Finalmente se realizó el recuento de bacterias desprendidas por el método de la gota en los respectivos antibióticos.

#### II.9.9 Ensayos de competición para la nodulación

Estos ensayos se realizaron con cepas llevando diferentes resistencias a antibióticos para permitir su identificación. Se trabajó con macetas plásticas conteniendo vermiculita estéril. Cada maceta con vermiculita estéril (vaso descartables) se regó con solución de FMS conteniendo  $10^6$  rizobios  $\text{ml}^{-1}$  de cada cepa a competir. Se utilizaron distintas condiciones de riego (descrito en Capítulo VI). La siembra de soja se realizó

inmediatamente. Se colocó una plántula de soja de 3-4 días por maceta, se tapó con film para evitar la evaporación de agua y se mantuvo por tres semanas en las condiciones de invernáculo mencionadas anteriormente. El riego se realizó cada 3 o 4 días con agua estéril hasta la determinación de los porcentajes de ocupación de los nódulos. Para cada condición se emplearon 15 plantas. Como controles siempre se incluyeron macetas sin inocular, y también macetas inoculadas con cada cepa en forma separada.

#### II.9.10 Extracción de nódulos y evaluación de experimentos de competición para la nodulación

Los nódulos de cada tratamiento fueron extraídos y cada uno colocado en fosas de placas multipocillo estériles. Luego se los esterilizó superficialmente mediante el agregado de una solución de lavandina comercial al 20% v/v durante cinco minutos seguidos de al menos seis lavados con agua destilada estéril. Así, cada nódulo pudo ser procesado en su fosa y no se corrió el riesgo de que se produjeran contaminaciones cruzadas entre materiales provenientes de distintos nódulos cuando se liberó su contenido bacteriano. Los nódulos fueron macerados con palillos estériles, con los que luego se depositó el material recién extraído en cajas de Petri réplicas conteniendo antibióticos selectivos para cada cepa y cicloheximida, lo que permitió identificar a qué cepa pertenecía el crecimiento del material extraído de cada nódulo. El procedimiento de los ensayos de competición se grafica en la Figura II.4.

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de la transformación angular de los porcentajes de ocupación (Lison, 1976) y por medio de un análisis de  $\chi^2$  con dos hipótesis nulas alternativas. Una que toma el 10% de doble ocupación y la otra un 20%. Este análisis fue implementado ante la imposibilidad de distinguir aquellos nódulos que se encuentran ocupados por la cepa salvaje y cualquiera de los mutantes en flagelina, ya que todos fueron obtenidos en el acervo genético de LP 3004 o LP 3008.

#### II.10 Análisis bioinformático

Para el análisis del contexto genético de los genes de interés se emplearon las bases de datos de acceso público, PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) y RhizoBase (<http://genome.kazusa.or.jp/rhizobase/>), donde se encuentra disponible el genoma completo de *B. japonicum* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002). A partir de las secuencias de interés encontradas, se utilizaron los programas Primer3 y NTI Vector para el diseño de los cebadores necesarios para comenzar con la estrategia de

mutagénesis. El estudio de secuencias promotoras se realizó con SoftBerry - [www.softberry.com](http://www.softberry.com) o Neural Network Promoter Prediction. Las búsquedas de similitud de secuencias se realizaron usando BLAST (Kent, 2002). Los alineamientos de secuencias se realizaron empleando los programas T-COFFEE Version 7.38 (<http://www.tcoffee.org>) y ClustalW (Thompson *et al.*, 1994).

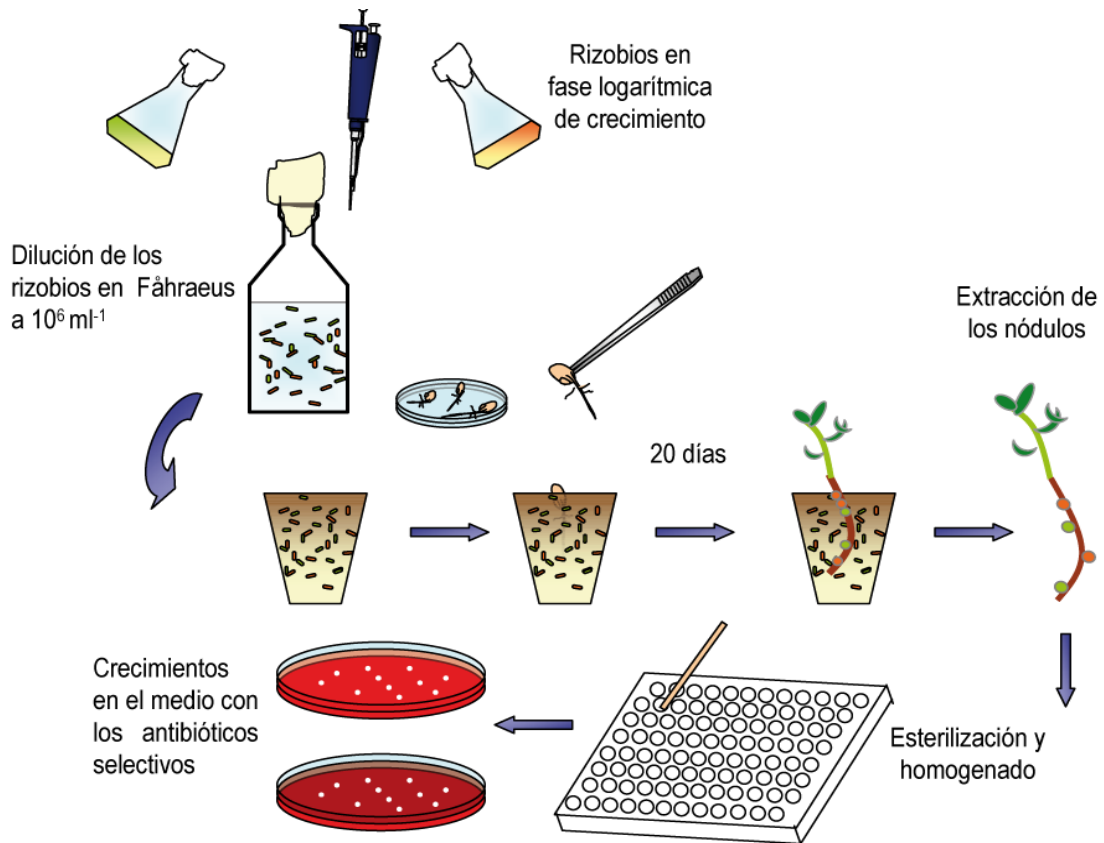


Figura II.4 Esquema general de los ensayos de competición en macetas y el procesamiento de los nódulos.

# Capítulo III

Caracterización de una cepa de  
*B. japonicum* con mayor movilidad

### III.1 Introducción

El problema de la competición para la nodulación implica tanto una pérdida de la rentabilidad del cultivo de soja como un incremento en la contaminación del medio ambiente en la medida en que la biofertilización puede ser reemplazada por el uso de fertilizantes químicos. Por ello constituye un cuello de botella en los sistemas de biofertilización que es deseable resolver. Para esto es necesario conocer y analizar las interrelaciones entre la planta, el rizobio y el suelo. En particular en esta Tesis nos centraremos en el estudio de la movilidad de los rizobios, cómo influyen sobre ella ciertas condiciones del suelo y cómo la movilidad afecta la colonización y la infección de la raíz de soja en diferentes medios. Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio indican que la movilidad de los rizobios en el suelo es escasa y que la posición en que se encuentran los rizobios respecto de los sitios infectables de las raíces es determinante del éxito de la competición (López-García *et al.*, 2002). Por ello, nos interesó estudiar si una mejora de la movilidad de *B. japonicum* podría contribuir a la colonización radical y a la competición para la nodulación.

A partir de la cepa LP 3004 (resistente a estreptomicina derivada de la cepa de referencia USDA 110) obtuvimos la cepa LP 3008 por un proceso de selección artificial, sin utilizar técnicas de ADN recombinante (Althabegoiti, 2004). Esta última presenta un fenotipo de movilidad (natación o *swimming*) aumentada cuando crece en cajas con medio agarizado al 0,3%, formando un halo con un diámetro mayor que el de la cepa salvaje. El fenotipo de este mutante resultó estable luego de inocular la cepa en plantas de soja, recuperarla de nódulo y reaislarla. El método de selección empleado puede aplicarse a cualquier cepa, y permite la inmediata liberación a campo sin mayores inconvenientes. Sin embargo, no permite conocer la identidad de los cambios genéticos que podrían ser la causa de este comportamiento. Está en nuestros planes futuros profundizar estos estudios.

La definición del medio agarizado como medio apto para la natación es una definición operativa que permite distinguir este movimiento de otros como por ejemplo el movimiento en enjambres o *swarming*, también dependiente de flagelos, o de otros movimientos de arrastre o de expansión de colonias, que no dependen de los flagelos (para una revisión véase Harshey, 2003). Nosotros adoptaremos esta definición dado que el movimiento en canales de agua del medio agarizado es más similar al movimiento en poros capilares saturados del suelo, comparado con el movimiento de bacterias

provenientes de cultivo en batch en medio líquido. Además, esta definición permite observar la movilidad durante largos periodos sin encontrarse sujeta a los cambios fisiológicos que ocurren durante las fases del crecimiento bacteriano en medio líquido, se ha demostrado que estas últimas pueden afectar el nivel de expresión de los flagelos (Amsler *et al.*, 1993). A su vez, permite la existencia de gradientes de nutrientes entre el centro y el borde de la masa bacteriana en expansión. En estos medios las bacterias pueden nadar inmersas en la malla de agar por debajo de la superficie (Harshey, 1994) y se puede observar macroscópicamente el desplazamiento al generarse un halo de movilidad. Este halo se hace visible en la caja de Petri no sólo como consecuencia de la movilidad sino también del crecimiento de las bacterias.

A continuación describiremos las caracterizaciones de LP 3008 en relación con la cepa parental.

### III.2 Caracterización fisiológica de la cepa más móvil *B. japonicum* LP 3008.

#### III.2.1 Cinética de crecimiento

Nuestra observación previa de que la cepa LP 3008 produce un halo de mayor diámetro en medio semisólido puede deberse a que dicha cepa es más móvil o bien a que crece más rápido. Para evidenciar si el tamaño del halo de movilidad (Figura III.1) se debía a una diferencia en el tiempo de duplicación, estudiamos la cinética de crecimiento en el medio de Götz. Se tomaron muestras cada 24 hs durante 28 días de los cultivos en medio líquido y se siguió el crecimiento por tres métodos: recuento de células totales realizado al microscopio óptico empleando una cámara de Neubauer, recuento de UFC mediante diluciones apropiadas en placas de medio YEM agarizado y, finalmente, determinación de la biomasa total por medida de la  $DO_{500}$ . Los resultados se presentan en la Figura III.2. Ambas cepas crecieron con igual cinética, y su tiempo de duplicación fue de 22 horas, como se observó antes para USDA 110 en las mismas condiciones (Quelas *et al.*, 2006). Al llegar a la fase estacionaria ambas cepas tuvieron igual número

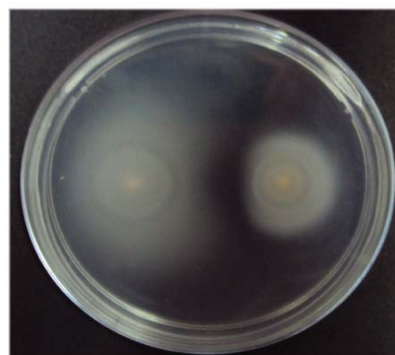


Figura III.1. Movilidad de *B. japonicum* LP 3008 (izquierda) y LP 3004 (derecha) en medio de Götz agarizado al 0,3 %.



de células viables y totales e igual  $DO_{500}$ , con lo cual no se puede atribuir el fenotipo de LP 3008 en placa de medio semisólido a una mayor velocidad de crecimiento respecto de LP 3004.

### III.2.2 Quimiotaxis

Como se ha mencionado anteriormente, las bacterias poseen sistemas quimiotácticos muy desarrollados que les permiten percibir estímulos relacionados con ambientes favorables o desfavorables, y responder ante los mismos con algún tipo de desplazamiento (Alexandre *et al.*, 2004). Dichos sistemas se encuentran muy bien descritos en *E. coli*. Los receptores son proteínas de transmembrana, conocidas como MCPs, que presentan un dominio periplásmico de unión a un ligando (quimioefector) y un dominio citoplásmico altamente conservado que se comunica con el motor del flagelo mediante una cascada de fosforilaciones (Baker *et al.*, 2006; Parkinson *et al.*, 2005).

El genoma de *B. japonicum* USDA 110 presenta tres regiones con genes que codifican para sistemas quimiotácticos, lo cual da idea de la importancia de los mismos. Sin embargo no existen muchos trabajos de quimiotaxis en *B. japonicum*, excepto algunos de al menos unos 10 a 20 años. En estos, se evaluaron diferentes compuestos como atractantes, entre ellos aminoácidos, ácidos dicarboxílicos y flavonoides. Como resultado se mostró que aspartato y glutamato resultan buenos atractantes, mientras que otros compuestos que también se encuentran en los exudados radicales, como es el caso de los flavonoides, no son buenos inductores de quimiotaxis (Barbour *et al.*, 1991). En nuestro ensayo empleamos una modificación del método de Adler (1973). El mismo consiste en colocar capilares de 1,40 mm de diámetro conteniendo en su interior un quimioattractante en contacto con el cultivo bacteriano durante 30 minutos a 28°C, de modo que las bacterias puedan “nadar” hacia el interior del tubo con un sesgo determinado por la presencia del attractante. Este sesgo se puede detectar comparando con la tasa de ingreso de bacterias a capilares similares conteniendo el medio de referencia sin attractante, hacia los cuales las bacterias sólo pueden dirigirse por movimientos al azar, no direccionados. Se utilizó como medio de referencia al medio de Götz con manitol 5,4 mM (en vez de 27 mM) y se creció a los cultivos en el mismo medio. Los compuestos seleccionados fueron aminoácidos con diferentes características

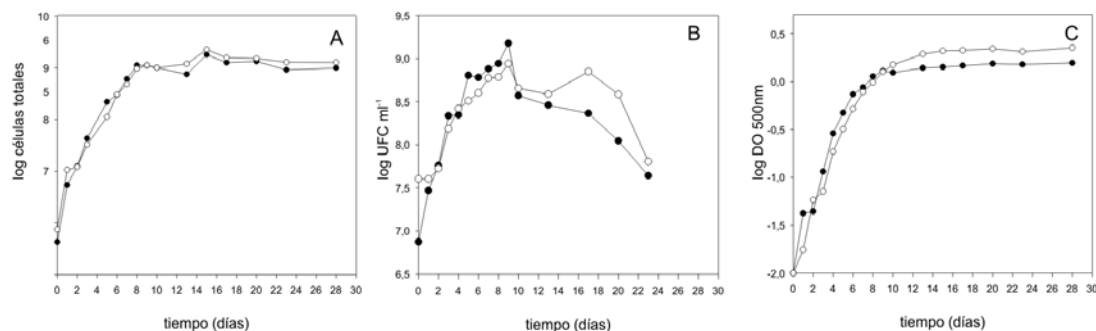


Figura III.2 Cinética de crecimiento de *B. japonicum* LP 3004 (círculos llenos) y LP 3008 (círculos vacíos) en el medio de Götz. (A) recuento de células totales, (B) recuento de células viables y (C) estimación de la biomasa total por DO 500nm.

en sus grupos R tales como aspartato 10 mM, lisina 1 mM, glicina 1 mM, y también se empleó el polialcohol manitol a una concentración de 27 mM (Barbour *et al.*, 1991). La quimiotaxis se cuantificó con el coeficiente R, el cual es el cociente entre las UFC recuperadas de los tubos con atrayente y las UFC recuperadas de los tubos control sin atrayente. Los resultados se expresaron como la media de R en cada caso y la variación se calculó como el error típico de la media. Los valores se presentan en la Tabla III.1. Como se puede observar, para cualquiera de los compuestos LP 3008 resultó de 2 a 5 veces más quimiotáctica que LP 3004. Este resultado indica que independientemente del receptor (es sabido que en *E. coli* el aspartato es percibido por una MCP diferente que el resto de los aminoácidos y el manitol), el sistema quimiotáctico y/o de movilidad es más eficiente en la cepa mutante.

Tabla III.1 Quimiotaxis de *B. japonicum* hacia diferentes compuestos

	R ± error típico de la media	
	LP 3004	LP 3008
Aspartato 10mM	0.71±0.05	4.07± 0.62
Lisina 1mM	1,55± 0.09	3,60± 0,78
Glicina 1mM	1,59± 0,04	5,47±0,75
Manitol 27mM	1,03±0,17	5,10 ±0,51

### III.3 Estudio de los flagelos de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008

#### III.3.1 Obtención de flagelina

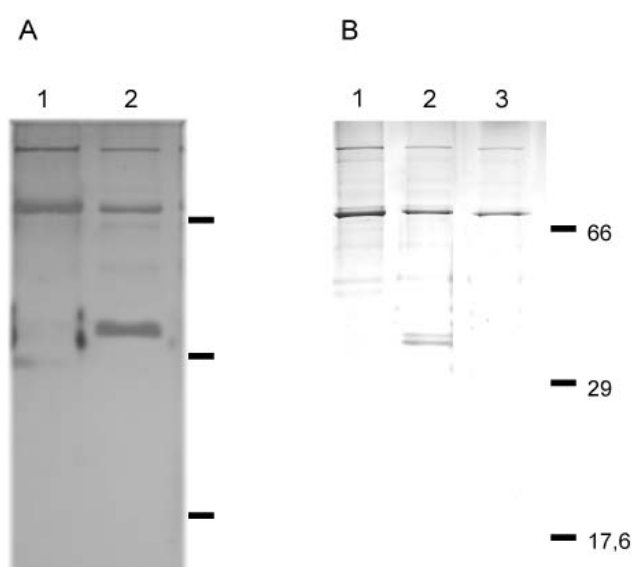
Los flagelos son los responsables de la movilidad bacteriana conocida como *swimming*, la cual hemos registrado en el medio semisólido tal como se muestra en la Figura III.1. Por lo tanto, decidimos estudiar estos filamentos tanto en la cepa salvaje como en la mutante más móvil.

La única publicación referida a la estructura de flagelos en *B. japonicum* hasta el momento en que se realizó este análisis, era un trabajo de Kape (1991), en el cual sugerían la existencia de un único flagelo subpolar complejo en la cepa 110*spc4*. Para dicha época, se sabía de la existencia de dos tipos de flagelos bacterianos: los simples, constituidos por filamentos como los de *E. coli* y *S. typhimurium*, y los complejos, formados por filamentos con un patrón característico de crestas y surcos helicoidales en superficie, más gruesos y rígidos. Se hipotetizaba además, la presencia de este tipo de filamentos en especies cuyo hábitat natural es el suelo. En la bibliografía ya estaban publicadas las estructuras de los flagelos de *S. meliloti* (Krupski *et al.*, 1985) y *S. lupini* (Maruyama *et al.*, 1978), cuyos flagelos son complejos; y la de *Pseudomonas rhodos*, que presenta ambos tipos flagelares (Schmitt *et al.*, 1974). En cuanto a las flagelinas de rizobios, se sabía que eran polipéptidos cuyo tamaño variaban entre 37 y 55 kDa, pero se creía que cada filamento estaba constituido por una sola proteína. Con el avance científico y las técnicas de secuenciamiento se dilucidó que, por ejemplo, *S. meliloti* presenta dos subunidades diferentes en su filamento (Pleier & Schmitt, 1989; Scharf *et al.*, 2001).

En nuestro caso realizamos la purificación de la flagelina de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008. Partimos de diversos cultivos líquidos de 150 ml crecidos en el medio de Götz durante 5 días hasta fase exponencial (se procesaron cultivos con DO<sub>500</sub> de 0,3 hasta 0,8 en diferentes ocasiones) y purificamos flagelina por precipitación con PEG y NaCl. Las proteínas se sembraron en un SDS-PAGE junto con un marcador de peso molecular y en todos los casos se observó el mismo patrón de bandas (en la Figura III. 3. A se muestra un resultado representativo). De este modo calculamos la masa de cada una de las subunidades proteicas obtenidas. Se observó claramente una diferencia entre las dos cepas: si bien ambas presentaron una banda correspondiente a 68 kDa, en la cepa más móvil se observó una banda adicional de unos 37 kDa. El PM deducido a partir de los

genes anotados como flagelinas (*bll6865* y *bll6866*) en el genoma completo de *B. japonicum* USDA 110 es de 34,6 kDa (Kaneko *et al.*, 2002). Estos se encuentran contiguos en uno de los dos clusters de movilidad que posee dicho genoma y presentan una identidad del 98%, lo cual no es sorprendente, pues parecería ser una característica intrínseca de los genes de flagelina (Deakin *et al.*, 1999; McCarter, 2001; Scharf *et al.*, 2001; Tambalo *et al.*, 2010a).

El hecho de que las proteínas reveladas en el gel fueran pocas nos sorprendió, pues la técnica no es específica para flagelinas y podrían haber coprecipitado muchas proteínas extracelulares, aunque también sabemos que la flagelina es la proteína mayoritaria entre las exportadas en esta especie (Suss *et al.*, 2006). Consecuentemente, llevamos a cabo una precipitación de proteínas extracelulares con ácido tricloroacético (TCA) a partir de cultivos crecidos en iguales condiciones. En este experimento utilizamos, además de LP 3004 y LP 3008, la cepa USDA 110 original (sin resistencia natural a estreptomicina) y verificamos que luego de la extracción presentaba, al igual que la cepa derivada LP 3004 resistente a estreptomicina, solamente la banda de mayor peso molecular. Si bien se observaron bandas tenues adicionales, el patrón de bandas de 37 y 68 kDa se mantuvo en la cepa LP 3008 luego de extraer las proteínas extracelulares con esta metodología (Figura III. 3.B). Es importante destacar que la tinción de estos geles se realizó con plata (Blume *et al.*, 1987) debido a que el medio usado es un medio mínimo y a que *B. japonicum* es de crecimiento lento, y en consecuencia la biomasa y la cantidad de proteína obtenidas son escasas.



**Figura III. 3** Análisis de las proteínas extracelulares de *B. japonicum* por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE). **A)** Proteínas extraídas con PEG y NaCl. **B)** con TCA. 1) *B. japonicum* LP 3004, 2) LP 3008 y 3) USDA 110. Las posiciones de los marcadores de peso molecular (en kDa) se indican a la derecha de cada gel. El gel **A)** fue teñido con azul de Coomassie, mientras que el gel **B)** fue teñido con plata.

De acuerdo a los SDS-PAGE podíamos suponer que la banda de 37 kDa era la flagelina; sin embargo, las cepas salvajes USDA 110 y LP 3004 no presentaban dicho polipéptido, lo cual nos dejaba inmersos en una gran incógnita pues estas bacterias son móviles cuando se las observa al microscopio óptico. Era menester entonces proceder a la identificación de las proteínas.

### III.3.2 Identificación de los polipéptidos por espectroscopía de masa.

Con el objetivo de poder identificar las proteínas por MALDI-TOF, se realizó una tinción especial del gel de poliacrilamida con nitrato de plata (tinción de Mann), se cortaron taquitos de cada banda y se enviaron a la Universidad de Bielefeld, Alemania. Por digestión triptica y MALDI-TOF, comprobamos que la banda de 37 kDa correspondía a las proteínas Bll6865 y Bll6866, si bien no pudimos discriminar si estaban presentes ambas o sólo una, debido a su alta identidad de secuencia. En segundo lugar, observamos que la banda de 68 kDa pertenecía, en principio, a una mezcla de las proteínas Bll5843, Bll5844, Bll5845 y Bll5846, anotadas como proteínas hipotéticas. Estos polipéptidos también se encuentran contiguos en el genoma y presentan una alta identidad. Al realizar un BlastP de Bll5846 contra el genoma entero de USDA 110, se encuentran identidades del 97, 94 y 73% con Bll5845, Bll5844 y Bll5843 respectivamente. Estos números no nos permitieron discernir si en la banda digerida con tripsina había una sola proteína o una mezcla de dos, tres o las cuatro proteínas. Más adelante en este Capítulo se analizará la transcripción de estos genes.

Un dato interesante que encontramos fue que la masa molecular predicha (34,6 kDa) de los polipéptidos Bll6865 y Bll6866 era menor a la observada en los geles (37 kDa). Sumado a ello, en algunas purificaciones (por ejemplo Figura III. 3.B) detectamos la presencia de un doblete en lugar de una única banda. Este tipo de variaciones en el peso molecular podrían deberse a modificaciones postraduccionales como glicosilaciones (Tambalo *et al.*, 2010a). Por ello, al buscar posibles patrones de glicosilación, cuya secuencia es N-X-S/T (X es cualquier aminoácido menos prolina), encontramos que Bll6865 tiene dos posibles sitios en la región N terminal y que Bll6866 tiene uno en la región N terminal y otro en la C terminal. Sería factible entonces que estas flagelinas se encuentren glicosiladas, siendo esto congruente con la diferencia entre el tamaño predicho y el esperado (aproximadamente 13 hexosas).

### III.3.3 Alineamientos de las secuencias amino y carboxilo terminales de Bll6865-6 y Bll5843-6.

Al analizar las secuencias Bll5843 a Bll5846 se puede ver que sus regiones amino y carboxilo terminales son similares a las de las flagelinas Bll6865 y Bll6866. Por ejemplo, si se eligen Bll6866 y Bll5846 y se alinean los 150 aminoácidos del N terminal por medio de un BlastP, se tiene una identidad del 32% y una similitud del 55%. Para las regiones C terminales, tomando 97 aminoácidos, se obtienen porcentajes similares. Valores muy parecidos se obtienen también con los otros tres ORF. En la bibliografía está descrito que las flagelinas procariotas tienen muy conservadas sus regiones amino y carboxilo terminales, mientras que la región central es en general variable, tanto en secuencia como en tamaño (Joys, 1988; Wilson & Beveridge, 1993). De hecho, Homma *et al.* (1987) propusieron un modelo en el cual las flagelinas se plegarían de manera tal que dejarían sus regiones amino y carboxilo terminales hacia el interior y la región central expuesta en la superficie. De esta manera se aseguraría el correcto ensamblaje del filamento por medio de las regiones más conservadas. Conjuntamente, se puede explicar que la región central es la que presenta variabilidad antigénica. Este modelo ha sido validado a lo largo de los años con diversos trabajos (Newton *et al.*, 1989; Wilson & Beveridge, 1993; Winstanley & Morgan, 1997).

Para evaluar las similitudes de las proteínas Bll5843 a 5846 y Bll6865-6 en *B. japonicum*, se realizó un alineamiento de las secuencias aminoácídicas con el programa T-COFFEE Versión 7.38 [<http://www.tcoffee.org>] (Figura III.4.A) en el cual se puede apreciar la diferencia de tamaños de ambos tipos de polipéptidos, aunque también la conservación en las regiones amino y carboxilo terminales. En paralelo, se realizaron alineamientos múltiples de otras secuencias de flagelinas con el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) (Figura III.4.B y C). Al alinear las secuencias N terminales con *flaA* de *S. meliloti* como referencia, Bll6865 y Bll6666 mostraron 51-55% de identidad y 73-76% de similitud respectivamente, mientras que Bll5843 a Bll5846 mostraron un 24-25% de identidad y 51-52% de similitud. Para las secuencias C terminales se obtuvo, respecto de la misma flagelina de *S. meliloti*, un 63% de identidad y un 80-82% de similitud con Bll6865 y Bll6866 respectivamente, y un 35-38% de identidad y 61% de similitud con Bll5843 a Bll5846.

Finalmente, luego de estos análisis podemos concluir que las secuencias de los polipéptidos Bll5843 a 5846 parecen ser otro tipo de flagelinas aún no descritas en

*B. japonicum*. A continuación profundizamos el análisis, abocándonos a estudiar la estructura del o los flagelos en LP 3004 y LP 3008.

**A**

```

B115846 MSG-IVLSASVRQNL LSLQSTADLLATTQNLSTGKSVNSALDNPTNFFTAQSLDNRASD
B115845 MSG-IVLSSSVRQNL LSLQSTADLLATTQSR LSTGKSVNSALDNPTNFFTAQSLDNRASD
B115844 MSG-IVLSASVRQNL LSLQSTADLLATTQNLSTGKSVNSALDNPTNFFTAQSLDNRASD
B115843 MSN-IVLSASVRQNL LSLQSTADLLATTQERLSTGKSVNTALDNPTNFFTAQGLDNRASD
B116866 MSS-LLTNSTAMTALQTLRSVSSQLSTTQTRISTGQRVSTASDNAAWYSIATSMRSDNAA
B116865 MGSSLLTNSSAMTALQTLRNVTQLATTQNRISTGQRVSTASDNSAYWSIATSMRSDNAA
*.. :: .:.. * :*:..: *:*:* *:*:* *.:* **: : * .: . :

B115846 INNLLDGIANGV-----QVLQAANTGITSLQKLIDSAKSIAN-----QALQTTV
B115845 INNLLDGIANGV-----QVLQAANTGITSLQKLIDSAKSIAN-----QALQTTV
B115844 INNLLDSIANGV-----QVLQAANTGLTSLQKLIDSAKSIAN-----QALQTTV
B115843 ISNLLDGINNGV-----QVLQAANTGITSLQKLIDSAKSIAN-----QALQTTV
B116866 LSAVSDSLGLSAATVDTEYALNTVIGDKD SGLTKLQALLVEAKTAGIDRSKIQADVTQI
B116865 LSAVSDSLGLSAAMVDTEYALNTVIGDKNSGLTKLQALLVEAKTAGIDRTKIQAEVTVI
.: : *.: . . * : :*:*.** * : .** : . ** * :

B115846 GYSTKSN-VSATISGATAADLRGTTSFASATASS-NVVFSGAAGGTTAASGTTTLGATIG
B115845 GYSTKSN-VSTTISGATAADLRGTTSFASATASS-NVVYSGAAGGTTAASGTTTLGASIG
B115844 GYSTKSN-VSTTISGATAADLRGTTSFASATASS-NVLYNGTAGGTTAASGTTTLGASIG
B115843 GYSTKSN-VSTTIPGATPADLRGTTSYASATANS-NVLYTGAAGGTPVTGTAALGASLG
B116866 QNQLKSTADSATINGINWLSIDTTPSSSTATPTSFNLVSSYSRVGNTPTIGSITV-----
B116865 QQDMKLSDSATINGINWLSIDITPSSSTATPTTFNLVSSYSRVGTPPTIGSITV-----
. * . *:* * . . : *.* :*:*..: *::. : * *.. * : :

B115846 SFAST----GATAGDGTALTGAI TL IATNGTTATGLAGNAQPADGDTLTVNGKTIIFRS
B115845 SFAST----GATAGDGTALTGAI TL IATNGTTATGLAGNAQPADGDTLTVNGKTIIFRS
B115844 SFAST----GATAGDGTALTGAI TL IATNGTTATGLAGNAQPADGDTLTVNGKTIIFRS
B115843 SNAGSAVGFAATAADGTTVLSGTATLLGTTASTTFG----APPADGDTITVNGKTIIFRT
B116866 -----TTATYALYTTGGSSTTGILD-----
B116865 -----TTATYALYTTGGSSTTGILD-----
: . : :* * .: : *

B115846 GAAPASTAVPSGSGVSGNLVTDGNGNTTVYLAS-----ATVNDLLSAIDLASGVKTVSIS
B115845 GAAPASTAVPSGSGVSGNLVTDGNGNTTVYLAS-----ATVNDLLSAIDLASGVKTVSIS
B115844 GAAPASTAVPSGSGVSGNLVTDGNGNTTVYLAS-----ATVNDLLSAIDLASGVKTVSIS
B115843 GIPPTTQPTGWGLDASGH IATDGNGNSIVYEGTAVAPRATVNDVLSAIDLASGVKTATIS
B116866 -----
B116865 -----

B115846 SGAATIAVSASQP----GAAVSTAAAGAVTLKSSTGADLSVTGKADLLKALGLTTAVGG
B115845 SGAATIAVSASQP----GAAVSTAAAGAVTLKSSTGADLSVTGKADLLKALGLTTAVGG
B115844 SGAATIAVSASQP----GAAVSTAAAGAVTLKSSTGADLSVTGKADLLKALGLTTSTGA
B115843 AGAAAIAVSGSTGPIGTLQVASSISGGGQVTLKSSTGADLSVTGKADFLNKLGLTTATGA
B116866 -----
B116865 -----

B115846 GNATVNVNRTTSAASLGATIADGSTLNV DGHVITFKNAPIPGSTGAPSVPTGYGASGNVL
B115845 GNATVNVNRTTSAASLGATIADGSTLNV DGHVITFKNAPIPGSTGAPSVPTGYGASGNVL
B115844 GNATVNVNRTTSAASLGATIADGSTLNV DGHVITFKNAPIPGSTGAPSVPSGYGASGNIL
B115843 GNANVTANRSTTAGSLGTLVQD GSTL NIDGHTITFKNAQTPQS--AASVTS G-VVNGNIV
B116866 -----
B116865 -----

B115846 TDGNGNSTVY LQAGTVNDV LKAIDLATGVQTATINANGTATLATATGQTNSSINASGQLK
B115845 TDGNGNSTVY LQAGTVNDV LKAIDLATGVQTATINANGTATLATATGQTNSSINASGQLK
B115844 TDGNGNSTVY LQAGTVNDV LKAIDLATGVQTATINANGTATLATATGQSNSSINTSGQLK
B115843 TDGNGNSTVY IQSATLTDLLNSIDLATGVKTASIF-NGAASLTTTAGQIPSSVNSSGQLA
B116866 -----
B116865 -----

B115846 LSTGVNADLSVTGTGNALNVLGLAGNTGTSTAF TAARTSGVGGITGKTLTFASFNGGTAV
B115845 LSTGVNADLSVTGTGNALNVLGLAGNTGTSTAF TAARTSGVGGITGKTLTFASFNGGTAV
B115844 LSTGVNADLSITGTGNALNVFGLAGNTGSATAFTAARTSGIGGIAGKTLTFTSFNGGTAV
    
```

```

B115843      LSTGINADLSITGTGNALHAFGLSGNTGTATAFTAARTSGVGGVSGKTLTFTSFNGGTPV
B116866      -----
B116865      -----

B115846      NVTFGDGTNGTVKTLTDLNQLNKLQANLTLATIDANGLLTVSTTNDYASSTIGSSAAGGAIG
B115845      NVTFGDGTNGTVKTLTDLNQLNKLQANLTLATIDANGLLTVSTTNDYASSTIGSSAAGGAIG
B115844      NVTFGDGTNGTVKTLTDLNQLNKLQANLTLATIDANGLLTVSTTNDYASSTIGSSAAGGAIG
B115843      NVTFGDGTNGTVKTLTDLNQLNKLQANLTLATIDANGLLTVSTTNDYASSTIGSSAAGGAIG
B116866      -----AVVGGSTG
B116865      -----TVVGGSTG
                                           : . ** : *

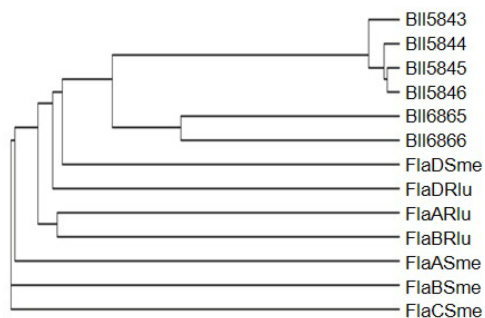
B115846      GTLTTSLTFSTASSPVQDQTSRANLVSQYNNILNQIDTTSQDSSFNGVNLNGDQLK
B115845      GTLTTALTFSTASSPVQDQTSRANLVSQYNNILNQIDTTSQDSSFNGVNLNGDQLK
B115844      GTLTSALTFSTASNVPQDQVATARANLVSQYNNILNQIDTTSQDSSFNGVNLNGDQLK
B115843      GTITGILAFTTAQPPVQDQVATARSNLVNQFNILAQIDTTSQDSSFNGVNLNGDQLK
B116866      ASVSSI-----NIGALTDSAT-----
B116865      ASVASI-----NIGALTDSAT-----
                . . . . : * * : . . . .

B115846      LVFDETGKSNLSITGVTYNSKGLGLAALTSQVDFIDNAATNKVLSNLNAAASSTLRSEASS
B115845      LVFDETGKSNLSITGVTYNSKGLGLAALTSQVDFIDNAATNKVLTNLNSASSTLRSEASS
B115844      LVFDETGKSSLNITGVTYNSKGLGLAALTVGVDFIDNAAANRVLTNLNAASSTLRSEASS
B115843      LVFNETGSSTLGINGVVFNAAAGLGLSNLVNGVDFIDNGATNKVLTSLNAAASSTLRSEASS
B116866      -----DQTKLDGYIAQVTAAGSVASAAAN
B116865      -----DQTKLDGYINQVTAAINSASAAAN
                                           * : : : . . . * . . . * . .

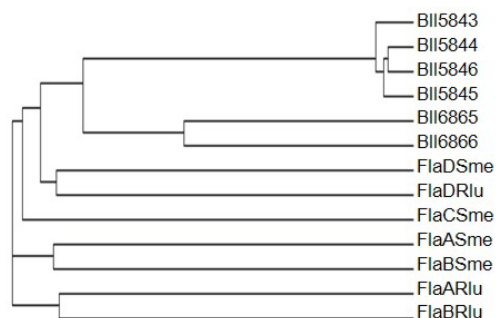
B115846      LGSNLSVVQVRQDFNKSLINVLQGTGSSNLTLDADTNTEAANSQALSTRQSI AVSALSANQ
B115845      LGSNLTIVQVRQDFNKSLINVLQGTGSSNLTLDADTNVEAANSQALSTRQSI AVSALSANQ
B115844      LGSNLSVVQIRQDFNKSLINVLQGTGSSNLTLDADTNVEAANSQALSTRQSI AVSALSANQ
B115843      LGSNLSIVQVRQDFSKNLINVLQGTGSSNLTLDADTNVEAANSQALSTRQSI AVSALSANQ
B116866      LGAVKNRISTNTEFVKNLMDSDRGVGLVDADMNQESTRLAALQVQQQLGVQALSANQ
B116865      LGAVKNRIATNTEFVKNLMDSDRGVGLVDADMNAESTRLQALQVQQQLGVQALSANQ
                ** : . : . : * * . * : : : * . : * . * * * * : . * * . : . : * * * * : * :

B115846      SQQSVLQLLR
B115845      SQQSVLQLLR
B115844      SQQSVLQLLR
B115843      SQQSVLQLLR
B116866      SSQSILSLFR
B116865      NSQSILSLFR
                . . ** : * . * : *
    
```

**B**



**C**



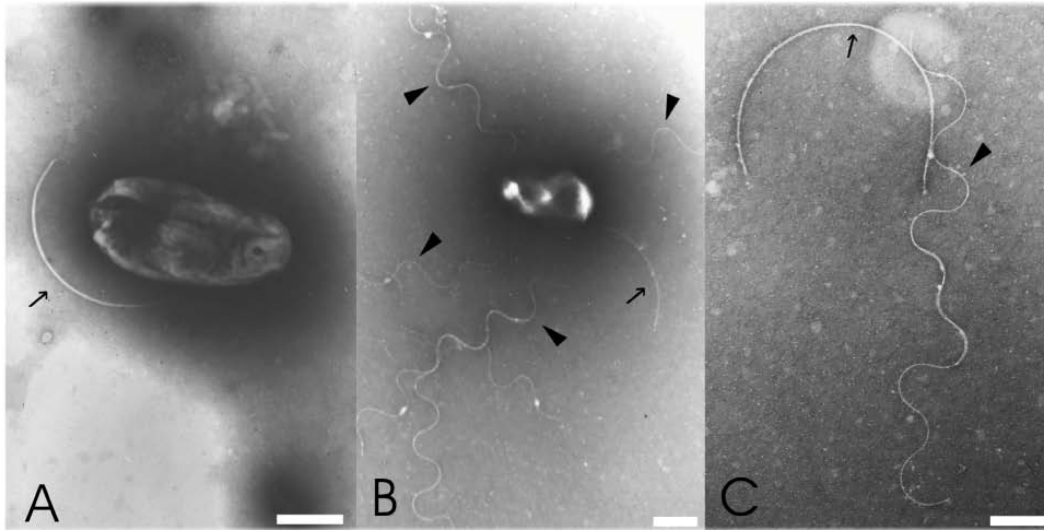
**Figura III.4.A)** Alineamiento de las flagelinas B116866 y B116865 con las proteínas B115843 a B115846 de *B. japonicum* USDA 110 con el programa T-COFFEE Version\_7.38. **B-C)** Cladogramas obtenidos a partir de alineamientos múltiples de flagelinas realizados con el programa Clustal W. **B)** 139 aminoácidos de la secuencia N terminal. **C)** 84 aminoácidos de la secuencia C terminal. Las flagelinas de *B. japonicum* se anotaron como figuran en el genoma. Las otras secuencias corresponden a: FlaA-D de *S. meliloti* (Sme) y flaA, flaB y flaD de *R. lupini* (Rlu). Los residuos invariables se indican con asteriscos, los residuos semi-conservados que mantienen las propiedades de su cadena lateral con dos puntos, y los residuos semi-conservados que modifican las propiedades de su cadena lateral con un punto.



### III.3.4 Estructura de los flagelos de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008

Una vez identificadas las flagelinas, decidimos ver la estructura y cantidad de flagelos de *B. japonicum* al. Para ello, los cultivos se crecieron en las condiciones habituales: 5 días a 180 rpm y 28°C, con la diferencia de que luego se dejaron un día en reposo para evitar el desprendimiento de los filamentos. Una vez listos fueron teñidos con ácido fosfotúngstico y lavados sobre una grilla. Como era esperable, ambas cepas poseían flagelo y estos filamentos eran claramente distinguibles. Sin embargo, en algunas de las preparaciones fue difícil encontrar y poder registrar por medio de fotografías la unión de flagelos a las células, ya que se veían superpuestos a ellas o sueltos en el preparado. A pesar de esto, pudimos observar que LP 3004 tenía un único flagelo subpolar, grueso y que no presentaba ondulaciones (Figura III.5.A), mientras que LP 3008 tenía el mismo tipo de flagelo más otros peritricos, finos y con forma sinusoidal (Figura III.5.B). En la Figura III.5.C se puede comparar ambos tipos de flagelos tomados de la preparación de LP 3008. Este resultado es congruente con el observado en las purificaciones de flagelina, donde hay una proteína expresada en ambas cepas y que podría constituir el filamento grueso, mientras que la otra, expresada en forma diferencial, sería el monómero constituyente de los flagelos peritricos de LP 3008. En el transcurso de estos experimentos Kanbe *et al.* (2007) mediante el empleo de mutantes sitio-específicos demostraron que efectivamente, el flagelo grueso está formado por las flagelinas Bll5843 a Bll5846, a las que denominaron FliCI-4, y el fino por las flagelinas Bll6865 y Bll686, a las que denominaron FliCI-II. Por otra parte, la resolución de las micrografías en nuestros experimentos no nos permite afirmar nada acerca de la presencia de esa estructura de crestas y surcos observada para los flagelos complejos, como el descrito con anterioridad para *B. japonicum* H0spc4.

En nuestro trabajo, logramos observar un resultado claro y es que la cepa salvaje tenía un flagelo que se expresaba constitutivamente en el medio líquido de Götz. El mismo se encuentra constituido por unas flagelinas de un peso molecular mayor a lo habitual, FliCI,2,3 y 4, mientras que la cepa más móvil expresa un flagelo adicional, cuyo filamento está formado por las flagelinas FliCI-II. Con este panorama, estuvimos entonces en condiciones de afirmar la existencia de dos sistemas de flagelos en *B. japonicum* constituidos por flagelinas diferentes. La presencia de dos sistemas flagelares ya ha sido descrita para otras especies como *Aeromonas sp.*, *Azospirillum sp.*, *Rhodobacter*



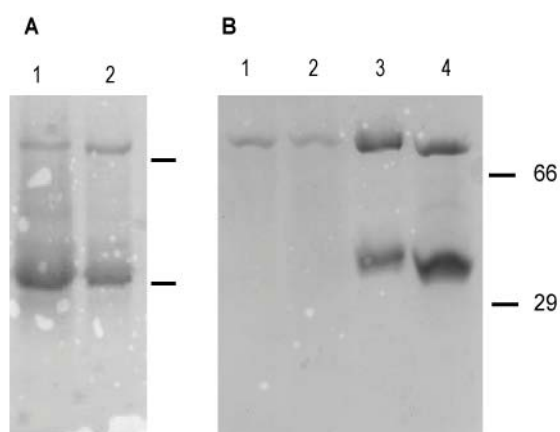
**Figura III.5** Morfología del flagelo de *B. japonicum*. **A)** Flagelo grueso subpolar (flecha) en LP 3004. **B)** Flagelos finos peritricos (cabezas de flecha) y flagelo grueso (flecha) en LP 3008. **C)** Flagelo supolar (flecha) y flagelo peritrico (cabeza de flecha) desprendidos de LP 3008

*centenum*, *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus*. Más adelante se discutirá acerca de la función de cada uno.

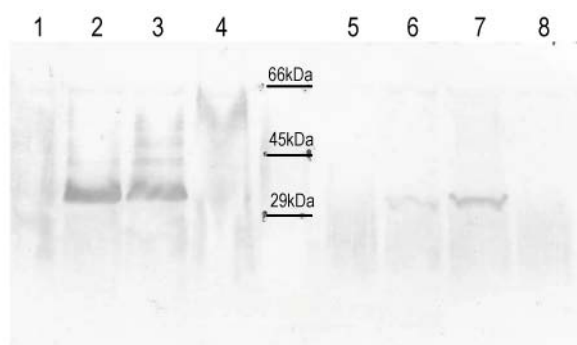
### III.3.5 Expresión diferencial de *FliCI* y *FliCII* en *B. japonicum* LP 3004 crecida con diferentes fuentes de carbono.

Al comenzar nuestros trabajos sobre la movilidad de *B. japonicum* decidimos utilizar el medio mínimo de Götz justamente porque había sido desarrollado para estudios de movilidad y quimiotaxis en *S. meliloti*. La fuente de carbono de dicho medio es el manitol, originalmente 5,4 mM (0,1 % p/v), pero aumentada por nosotros a 27 mM (0,5 % p/v) puesto que a la concentración original se dificulta el crecimiento de *B. japonicum* (López-García *et al.*, 2001). En este medio nuestra cepa salvaje expresaba únicamente el flagelo grueso, constituido por *FliCI*, *FliC2*, *FliC3* y *FliC4*. Sin embargo, en el trabajo de Kanbe *et al.* (2007) emplearon el medio salino HM suplementado con arabinosa, extracto de levadura y gluconato de sodio, todos al 0,1 % (p/v) y observaron que en estas condiciones la cepa salvaje *B. japonicum* 110 *spc4* expresaba ambos tipos de flagelos. Dado que sabíamos que la fisiología del crecimiento de *B. japonicum* varía al cambiar la fuente de C (Karr *et al.*, 2000; Quelas *et al.*, 2006) decidimos comparar las extracciones de flagelina de LP 3004 y LP 3008 crecidas en el medio HM suplementado con las tres fuentes de carbono. El resultado se muestra en la Figura III.6.A, donde pudimos corroborar que tanto LP 3004 como LP 3008 expresaban ambas flagelinas mientras que

en el medio de Götz LP 3004 solamente expresaba FliCI-4 (Figura III.3.A). A continuación, decidimos ver qué observábamos al cultivar las bacterias en el medio de Götz suplementado ahora con cada una de las fuentes de carbono del medio HM, pero en forma separada. Con LP 3008 vimos que la desrepresión del flagelo fino era constante en cualquiera de las fuentes carbonadas (no mostrado). En cambio, en las purificaciones de LP 3004 observamos que tanto en manitol (medio original) como en extracto de levadura, FliCI-II no se detectaban, pero cuando las fuentes de carbono fueron gluconato de sodio o arabinosa, se pudo ver de manera clara la banda 37 KDa correspondiente a FliCI-II (Figura III.6.B). Decidimos ver si este resultado podría deberse a un desprendimiento diferencial de los flagelos en los distintos medios, tomando la precaución de modificar levemente el protocolo de purificación, de modo tal de asegurarnos de no perder ninguna fracción que posiblemente tuviera flagelos. Centrifugamos los 150 ml de cultivo a  $11.000 \times g$  y  $4^\circ C$  y separamos dos fracciones: el sobrenadante conteniendo el medio de cultivo (fracción I) y el precipitado, conteniendo las bacterias (fracción II). A la fracción I, que presentaba flagelos desprendidos, la precipitamos con PEG y NaCl. A la fracción II (precipitado de células) la resuspendimos en 10 ml del mismo medio, la agitamos con vortex durante 4 minutos y la centrifugamos a  $15.000 \times g$  y  $4^\circ C$ , obteniendo un segundo sobrenadante, que precipitamos de la misma forma que el anterior. Así, partiendo de cultivos de LP 3004 en las cuatro fuentes de carbono, obtuvimos ocho muestras. Se pudo observar el mismo patrón de bandas en ambas fracciones, siendo siempre el precipitado de la fracción I más sucio, (no mostrado) con más degradación, suponemos debido a que el volumen que es mucho mayor y la muestra no logra enfriarse lo suficiente; y, posiblemente a la presencia de EPS. De esta manera, pudimos corroborar que la falta de detección de FliCI-II en el



**Figura III.6** Separación de las flagelinas de *B. japonicum* por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). **A)** Flagelinas de *B. japonicum* LP 3004 (1) y LP 3008 (2) obtenidas de cultivos crecidos en HM. **B)** Flagelinas de *B. japonicum* LP 3004 obtenidas de cultivos en Götz con 1) manitol 0,5%, 2) extracto de levadura 0,1%, 3) gluconato de sodio 0,1% y 4) arabinosa 0,1%. Marcador de peso molecular en kDa. Geles teñidos con Coomassie blue.

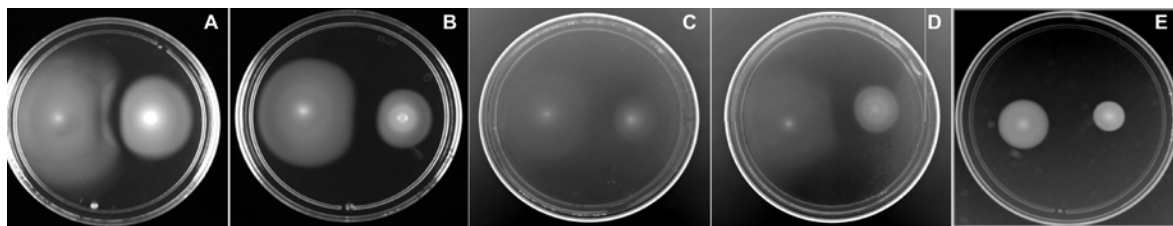


**Figura III.7** Western blot de la purificación de flagelinas de *B. japonicum* LP 3004 revelado con anticuerpos anti FliCI-II. Calles 1 a 4 Fracción I. Calles 5 a 8 Fracción II: Cultivos en Götz con manitol 0,5% (1 y 5), gluconato de sodio 0,1% (2 y 6), arabinosa 0,1% (3 y 7) o extracto de levadura 0,1% (4 y 8) como únicas fuentes de C.

medio de Götz con manitol o extracto de levadura se debía a un menor nivel de expresión de dichas flagelinas y no a una mayor fragilidad de los filamentos en estos medios. La falta de detección de FliCI-II no necesariamente refleja la ausencia de los polipéptidos, ya que la tinción con Coomassie blue es relativamente poco sensible. Por lo tanto, realizamos con las mismas muestras un Western blot, que es unas 1.000 veces más sensible, para ver si en manitol o extracto de levadura podíamos detectar algo de FliCI-II. El resultado se muestra en la Figura III.7, donde comprobamos que FliCI-II siguen siendo indetectables en extractos de bacterias crecidas en el medio de Götz con manitol o con extracto de levadura.

### III.3.6 Movilidad de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 en diferentes fuentes de carbono.

Una vez que comprobamos que en el medio líquido de Götz con arabinosa o gluconato de sodio como únicas fuentes de carbono la cepa LP 3004 expresa FliCI-II, decidimos ensayar qué sucedía con la movilidad en las cajas de agar semisólido suplementadas con esas fuentes de carbono. Como resultado se observó que, aún en las cajas con la fuente de carbono en que la cepa salvaje expresaba el flagelo fino compuesto por FliCI-II, el halo de la cepa LP 3008 seguía siendo más grande (Figura III.8.A-E). Esto indica que existen otras modificaciones que conducen a este fenotipo además de la expresión del flagelo, como por ejemplo su mayor capacidad quimiotáctica. Aún en el medio HM con las tres fuentes de carbono se observaba el mismo comportamiento de las cepas (Figura III.8.E). Asimismo, observamos que el desplazamiento en el medio mínimo de Götz era significativamente mayor que en el medio HM, más rico, y que en el medio mínimo de Götz el mayor desplazamiento se observaba empleando manitol como única fuente de C. Estos resultados indican que la magnitud del desplazamiento en medio semisólido no tiene relación ni con la velocidad de crecimiento de esta cepa (en HM > Götz-arabinosa o Götz-gluconato > Götz-extracto de levadura o Götz-manitol) ni



**Figura III.8** Cajas de movilidad de *B. japonicum*. En cada caja se muestra la cepa LP 3008 a la izquierda y LP 3004 a la derecha. Los cultivos se realizaron en el medio de Götz con agar semisólido durante 15 días y diferentes fuentes de carbono: **A)** manitol 0,5%, **B)** arabinosa 0,1%, **C)** extracto de levadura 0,1%, **D)** gluconato de sodio; o en el medio HM (**E**).

con la expresión del flagelo fino (positiva en HM, Götz-arabinosa o Götz-gluconato y negativa en Götz-extracto de levadura o Götz-manitol).

### III.4 Análisis molecular de los genes *fliCI-II* y *fliC1234*

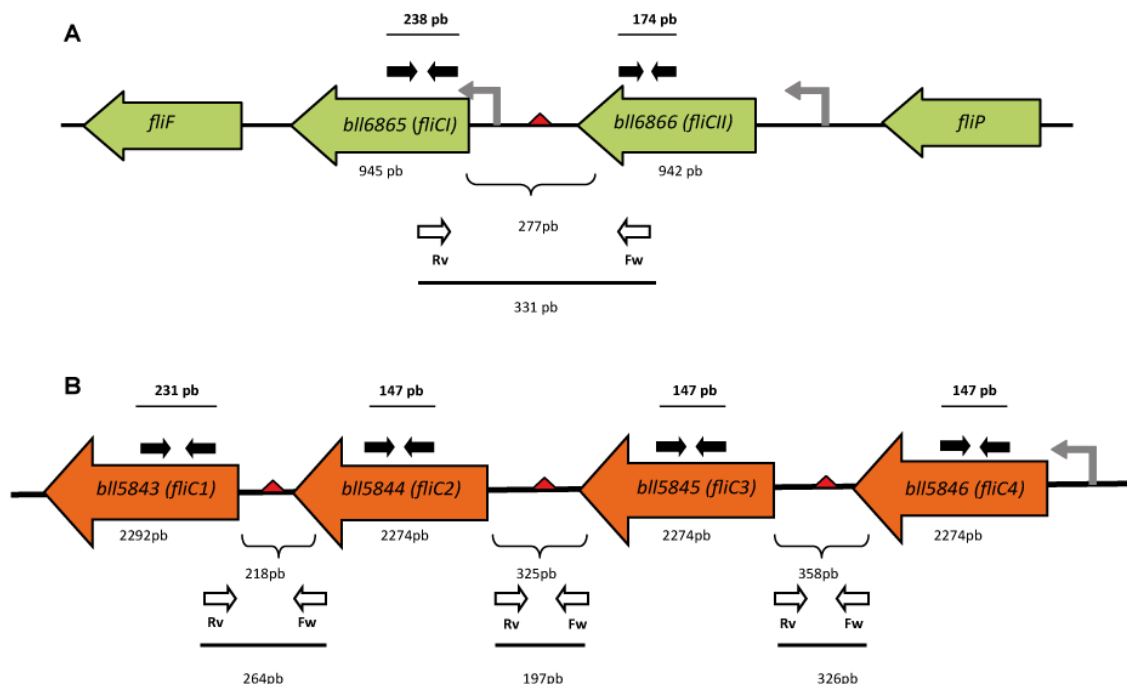
#### III.4.1 Análisis de las secuencias promotoras de *fliCI* (*bll6866*) y *fliCII* (*bll6865*) en *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008.

*B. japonicum* LP 3008 fue obtenida por selección artificial en placas de Götz con 0,3 % (p/v) de agar, luego de un proceso que involucró 13 rondas de selección y el pasaje por nódulos de soja (Althabegoiti, 2004). Dado que el carácter de mayor movilidad se mantuvo inalterado, suponemos que este cambio heredable fue causado por una modificación en la secuencia de ADN. En vista de las diferencias de expresión de *FliCI-II* comentadas anteriormente, decidimos ver si las supuestas modificaciones en la secuencia de ADN podrían encontrarse en o cerca de los promotores de estos genes, o bien en sus secuencias de unión de ribosomas. Para ello, amplificamos secuencias corriente arriba de *fliCI* y *fliCII* con los cebadores denominados *int bll6865-6 Fw* y *bll6864 Rv* y *bll6867 Fw* e *int bll6865-6 Rv*, que abarcaron 1401 y 1413 pares de bases (pb) de *fliCI* y *fliCII* respectivamente, las cuales incluían las posibles regiones promotoras (117 pb y 345 pb río arriba de cada gen respectivamente). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con una polimerasa de alta fidelidad (*Pfx* Invitrogen). En cada caso se repitieron las reacciones a partir de tres moldes independientes. Luego del secuenciamiento de los 12 amplicones comprobamos que todos tenían 100 % de identidad con las secuencias anotadas en el genoma de *B. japonicum* USDA 110. Por lo tanto, la causa de la diferencia de expresión observada no parece residir en las secuencias no traducidas corriente arriba de las zonas codificantes de estos genes.

#### III.4.2 Análisis de la expresión de *fliCI-II* y *fliCI234*

Profundizando en el análisis de estos genes, realizamos un estudio transcripcional. Dado que tanto *fliCI-II* como *fliCI234* se encuentran contiguos formando dos clusters en el genoma, analizamos la expresión de dichos genes para ver si forman ARN mensajeros policistrónicos. Como ya hemos mencionado, en estas regiones se hallan genes de movilidad y quimiotaxis, siendo una de ellas la mejor caracterizada, o al menos, la que más funciones anotadas presenta (a la cual pertenecen *fliCI* y *fliCII*). En la Figura III.9 se muestra la longitud de los genes en cada cluster (en pares de bases) y su polaridad.

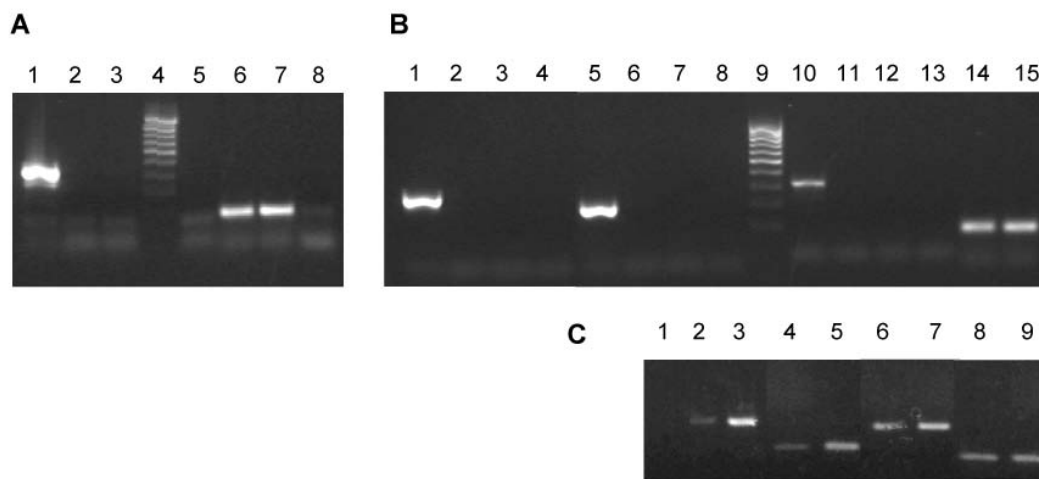
Como primer paso para hacer un análisis de la transcripción debimos poner a punto la extracción de ARN, que si bien es una técnica sencilla en células eucariotas, resulta un poco más compleja en bacterias y más aún en aquellas que, como la nuestra, producen mucho exopolisacárido (EPS) y polisacárido capsular (CPS). Finalmente logramos, mediante una modificación del protocolo de Trizol (Invitrogen), obtener el ARN total a partir de cultivos líquidos de bacterias. Las extracciones se realizaron a partir de 20 ml de cultivos líquidos de LP 3004 y LP 3008 con una DO<sub>500</sub> de 1,2. Para analizar si los genes se expresaban como uno o varios transcritos, se utilizaron cebadores que hibridan en diferentes marcos de lectura abiertos u ORFs (en inglés, *Open Reading Frames*) o en la secuencia intergénica (Redondo-Nieto *et al.*, 2008), de modo que únicamente si la expresión es en operón se generará producto luego de la retrotranscripción y la reacción de PCR (RT-PCR). Este experimento requiere dos controles básicos, por un lado debe normalizarse la cantidad de ARN utilizado o extraído por medio de un control interno, un gen cuya expresión sea constante durante el crecimiento de la bacteria. En nuestro caso el gen empleado fue *sigA* que codifica un factor de transcripción vegetativo (Hauser *et al.*, 2006). Por otro lado, debemos tener la certeza de que los genes de flagelina se están expresando en la condición evaluada; de lo contrario, podría suceder que no veamos amplificación por RT-PCR de alguna zona intergénica no porque el ARNm no sea policistrónico sino simplemente como consecuencia de la falta de transcripción de los genes involucrados. Para las secuencias de *fliCI* y *fliCII* se diseñaron cebadores internos que amplifican fragmentos de 238 y 174 pb respectivamente. Al analizar los ADN complementarios (ADNc), tanto de LP 3004 como de LP 3008, se pudo ver que estos genes se expresaban de manera independiente uno de otro, pues la banda esperada de 331 pb no se encontró en ningún caso, mientras



**Figura III.9** Organización genómica de los genes de flagelina de *B. japonicum* USDA 110. En verde (A) las flagelinas de bajo peso molecular y en naranja (B) las de alto peso molecular. Se esquematizan posibles secuencias promotoras (flechas grises) y posibles terminadores de la transcripción (triángulos rojos), según [www.softberry.com](http://www.softberry.com) o Neural Network Promoter Prediction. Flechas blancas: cebadores para la amplificación de regiones intergénicas por RT-PCR en el caso de que el transcripto sea policistrónico. Flechas negras: cebadores para la amplificación de regiones internas de cada ORF por RT-PCR. Los tamaños de los genes y amplicones no están en escala. La orientación de los genes corresponde a la establecida en la secuencia genómica Kaneko *et al.* (2002).

que en el control positivo de la reacción (usando ADN total de LP 3008) resultó una banda intensa correspondiente a ese peso molecular (Figura III.10). En forma paralela, los controles con los fragmentos internos indicaron que tanto *fliCI* como *fliCII* se encontraban expresadas. Haciendo un análisis bioinformático se pudo predecir la existencia de posibles secuencias promotoras a 40 pb y a 151 pb de *fliCI* y *fliCII* respectivamente ([www.softberry.com](http://www.softberry.com) o Neural Network Promoter Prediction), y también que a 50 pb río abajo de *fliCII* existe una secuencia terminadora del tipo Rho independiente ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)) (Figura III.9.A).

Para analizar el otro cluster se diseñaron cebadores internos que amplifican fragmentos de 231 pb para *fliC1* y 147 pb para *fliC2*, *fliC3* y *fliC4*. Debido a que estos tres últimos genes presentan entre sí identidades del 94 al 97% no se pudieron diseñar cebadores diferentes para cada uno de ellos. En paralelo, se diseñaron los cebadores intergénicos para evaluar si existe un único transcripto o varios. En este caso, debemos destacar que los ORFs son muy grandes (casi 2.300 pb) y se encuentran separados por



**Figura III.10 A)** RT-PCR de los posibles operones de genes de flagelina de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008. **A)** PCR utilizando los cebadores de la región intergénica *fliC I-III* (1 a 3) y del control interno *sigA* (calle 5 a 8). Como moldes se utilizaron ADNc de LP 3004 (2 y 6) y ADNc de LP 3008, (3 y 7). Para el control positivo se empleó ADN total de LP 3004 (1) y para los controles negativos agua (5) y ARN sin retrotranscribir (8). Calle 4: marcador de PM, 100 a 900 pb (fragmentos de 100 pb).

**B)** PCR utilizando cebadores de las regiones intergénicas *fliC 1-2-3-4*. Con los cebadores intergénicos *fliC 1-2* se realizaron PCRs de los controles positivo con ADN total de LP 3004 (1), y negativo con agua (4); y sobre los ADNc de LP 3004 (2) y LP 3008 (3). Con los cebadores intergénicos *fliC 2-3* se realizaron los mismos controles positivo (5) y negativo (8), así como las reacciones sobre los ADNc de LP 3004 (6) y LP 3008 (7). Con los cebadores intergénicos *fliC 3-4* se realizaron sendos controles positivo (10) y negativo (13); y las reacciones sobre los ADNc de LP 3004 (11) y LP 3008 (12). Las PCRs con los cebadores *sigA* sobre LP 3004 y LP 3008 se muestran en las calles 14 y 15, respectivamente. Calle 9: marcador de PM, 100 a 900 pb, 100 a 900 pb (fragmentos de 100 pb)

**C)** Expresión de los fragmentos internos de los genes *fliC I-II* y *fliC 1-2-3-4*. PCR utilizando los cebadores *fliC I* en: control negativo con agua (1), ADNc de LP 3004 (2) y LP 3008 (3); *fliC II*, con ADNc de LP 3004 (4) y LP 3008 (5); *fliC I* con ADNc de LP 3004 (6) y LP 3008 (7), y *fliC 234* con ADNc de LP 3004 (8) y LP 3008 (9).

PM: marcador de peso molecular, fragmentos entre 100 y 1000pb. El control negativo con ARN sin retrotranscribir se realizó una sola vez para verificar la ausencia de contaminación con ADN.

entre 200 a 350 pb. Sin embargo, haciendo el mismo análisis bioinformático utilizado anteriormente observamos que sólo para el gen *fliC I* ambas bases de datos predicen una misma posible región promotora a 227 pb, mientras que para el resto de los ORFs únicamente se pudo encontrar predicción de promotores por Softberry. En la búsqueda de terminadores de la transcripción encontramos terminadores del tipo Rho independientes predichos para todos los ORFs ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)). Para corroborar estos datos se llevaron a cabo las reacciones de PCR con los cebadores int *fliC I-2* Fw y Rv, int *fliC 2-3* Fw y Rv y con int *fliC 3-4* Fw y Rv, que amplifican fragmentos de 264, 197 y 326 pb respectivamente.

Las secuencias amplificadas entre *fliC 2-3* y entre *fliC 3-4* son exclusivamente intergénicas. En cambio en el caso de la int *fliC I-2* los cebadores se aparean al comienzo y al final de *fliC I* y *fliC 2*. Se eligió esta nomenclatura de los cebadores para simplificar la comprensión. En la Figura III.10.B se puede apreciar que estamos en presencia de



ARNm monocistrónicos, e igual que en el caso anterior, verificamos la expresión de estos transcriptos (Figura III.10.C). Junto a estos sets de reacciones realizamos la amplificación del fragmento del gen *sigA* en LP 3004 y LP 3008, y pudimos corroborar que la cantidad de ARNm tomado para las reacciones en ambas cepas fue similar. Se podría discutir acerca de la expresión de *fliC2*, *fliC3* y *fliC4*, ya que sólo tenemos un par de cebadores que amplifican la misma región en los tres, por lo que podría suceder que alguno de estos genes no se esté expresando, y en este caso no lo podríamos discriminar.

Así, por medio de estos análisis, logramos deducir que los genes que codifican las flagelinas de *B. japonicum* se expresan en ARNm monocistrónicos.

### III.5 Discusión

En este capítulo hemos realizado la caracterización fisiológica de las cepas *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008. La cepa LP 3008 es un mutante de mayor movilidad seleccionado artificialmente en nuestro laboratorio sin utilizar técnicas de biología molecular. Previo a analizar las características simbióticas de la cepa, nos pareció correcto evaluar su comportamiento en vida libre. En primer lugar encontramos que LP 3008 es más quimiotáctica que LP 3004 en todos los compuestos ensayados y posee uno de sus flagelos desreprimido. El filamento de este flagelo se encuentra formado por FliCI y FliCII, mientras que existe otro flagelo que se expresa de manera constitutiva en las condiciones ensayadas, tanto en la cepa salvaje como en la mutante y está compuesto por unas flagelinas de mayor peso molecular, denominadas FliC1234. Estos resultados se verificaron por medio de la identificación de las proteínas y de microscopía electrónica.

En forma contemporánea a nuestros hallazgos, Kanbe *et al.* (2007) observaron que *B. japonicum* expresa sus dos flagelos en el medio líquido HM. Cuando probamos suplementar nuestro medio de Götz con cada una de las fuentes de carbono del medio HM, encontramos que en la cepa salvaje con gluconato de sodio o arabinosa también se expresan FliCI y FliCII, como ocurre en LP 3008. No obstante, aún cuando este flagelo está expresado en LP 3004, no se logra igualar el comportamiento de LP 3008 en las placas de movilidad. Esto nos condujo a pensar en la existencia de otro factor que contribuiría a la desrepresión del flagelo para generar el fenotipo más móvil.

Los estudios fisiológicos realizados en este trabajo, nos permitieron postular de LP 3008, encontramos que *B. japonicum* tiene dos sistemas de flagelos, siendo hasta el momento el único rizobio con esta característica. Además, sus flagelos difieren de los flagelos complejos de otros rizobios, y son más similares a los de especies bacterianas tales como *V. parahaemolyticus* y *A. brasilense*, las cuales utilizan uno de los filamentos para nadar en medios líquidos, y el otro lo emplean para desplazarse sobre superficies. Curiosamente se encontró una discrepancia entre el peso molecular teórico y el calculado experimentalmente de FliCI y FliCII en LP 3008, quizás debido a una glicosilación de estas proteínas. En otras bacterias se han encontrado glicosilaciones en las flagelinas, por ejemplo en *P. aeruginosa* (Verma *et al.*, 2006) y, recientemente, en *R. leguminosarum* (Tambalo *et al.*, 2010a).

Estos hallazgos nos conducen a diversas preguntas. En primer lugar, ¿la mayor movilidad de LP 3008 introduce alguna mejora en su interacción con plantas de soja?. En segundo lugar, ¿qué rol cumple cada flagelo en la movilidad de *B. japonicum*?. En tercer lugar, ¿cada uno de los flagelos condiciona de distinto modo la competitividad para colonizar la rizósfera y nodular en medios porosos a capacidad de campo? En capítulos posteriores intentaremos responder estas preguntas.

# Capítulo IV

Estudios simbióticos y de la  
movilidad de *B. japonicum* LP 3004 y  
LP 3008 en medios con distintos  
contenidos de agua

## IV.1. Introducción

Normalmente, los suelos agrícolas están compuestos por partículas cuyos diámetros varían entre 0,1  $\mu\text{m}$  a 2 mm, dependiendo tanto del tipo de mineral del cual derivan, como de los procesos formadores que actuaron. Así, se divide generalmente a los poros en dos categorías: no capilares, los cuales se drenan fácilmente luego de un riego o una lluvia, y capilares en los que el agua permanece después de que el suelo haya sido completamente drenado. Así, en un suelo normal, los poros no capilares constituyen espacios gaseosos y discontinuos, y el agua del suelo se encuentra formando películas y lentes. En este contexto no debería esperarse que el agua del suelo forme canales continuos a través de los cuales las bacterias puedan nadar a grandes distancias. Pero sí puede suceder que la natación de las bacterias en el suelo ocurra luego de un periodo de lluvias, hasta que el suelo haya drenado. Entonces, en los medios porosos como el suelo es importante distinguir entre estados de saturación de agua o condiciones de menor contenido hídrico.

Los rizobios poseen sistemas de flagelos cuya principal función es permitir la natación en medios con disponibilidad de agua. Como hemos definido en el Capítulo III, el agar 0,3% es considerado también un medio para la natación (Harshey, 1994). Además, datos citados por Watt *et al.* (2006) indican que la difusividad de solutos en medios agarizados es más cercana a la que se observa en soluciones acuosas que en medios porosos insaturados. Dado que nuestro medio de referencia para ensayar movilidad es el Götz, determinamos los  $\Psi_h$  de este medio en su estado líquido o con 0,3% de agar, siendo los mismos de -0,114 MPa y -0,136 MPa, respectivamente. Si consideramos  $\Psi_g$  y  $\Psi_p$  (aporte de la gravedad y la presión, respectivamente) iguales para ambos pues no dependen de la composición, podemos observar que el  $\Psi_h$  de un medio líquido está dado por su  $\Psi_o$  mientras que en el caso del medio con agar se agrega el componente  $\Psi_m$  que modifica el  $\Psi_h$ . Según los valores obtenidos, podemos estimar el valor de este  $\Psi_m$  para el medio agarizado al 0,3% en alrededor de -0,022 MPa. A continuación compararemos la capacidad simbiótica de LP 3008 con la cepa parental LP 3004 tanto en medios líquidos como en medios porosos a capacidad de campo.

## IV.2 Ensayos en medios líquidos- Interacciones tempranas con raíces de soja

### IV.2.1 Adhesión

Nuestro mutante *B. japonicum* LP 3008 presenta una movilidad aumentada y la expresión de uno de sus flagelos desreprimida, factores ambos que podrían afectar la adhesión de estos rizobios a las raíces de soja. En efecto, en otras especies bacterianas se ha observado que la movilidad y la quimiotaxis podrían estar relacionadas con la capacidad de colonizar la rizósfera y adherirse a las superficies vegetales, y que los flagelos en particular podrían actuar además como adhesinas (Fujishige *et al.*, 2006; Lodeiro *et al.*, 1995; Mongiardini *et al.*, 2008; Smit *et al.*, 1992). Por lo tanto, decidimos evaluar la adhesión de las cepas LP 3004 y LP 3008 a raíces de soja mediante el empleo de una técnica ya puesta a punto en nuestro laboratorio (Caetano-Anolles & Favelukes, 1986b) y utilizada con éxito en diferentes sistemas planta-bacteria (Caetano-Anolles & Favelukes, 1986a; Lodeiro & Favelukes, 1999; Lodeiro *et al.*, 1995; Mongiardini *et al.*, 2008; Wall & Favelukes, 1991).

Los inóculos bacterianos se cultivaron en el medio de Götz hasta fase de crecimiento exponencial y se diluyeron hasta  $10^3$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ , concentración a la cual se realizó la incubación con las raíces. Como resultado observamos en dos experimentos independientes que luego de una incubación de 4 horas LP 3008 se adhirió de 1,5 a 2 veces más que la cepa salvaje (Figura IV.1). Por el contrario, la adhesión luego de 1 hora de incubación resultó similar para ambas cepas. La tasa de adhesión de *B. japonicum* a raíces de soja luego de la primera hora de incubación es muy activa, y disminuye luego de cuatro horas de incubación (Lodeiro & Favelukes, 1999). Así, podríamos postular que el proceso en el cual el flagelo fino desempeña un papel tiene una tasa de actividad similar a la tasa de adhesión luego de la primera hora de incubación pero continúa activamente, permitiendo un aumento de adhesión luego de cuatro horas de incubación. Si se tratara de la

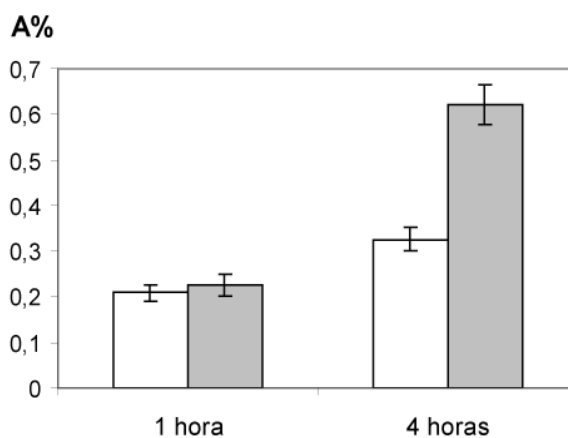


Figura IV.1 Adhesión a raíces de soja de de *B. japonicum* LP 3004 (barras blancas) y LP 3008 (barras grises). A%  $\pm$  Intervalo de Confianza con  $p < 0,05$ .

movilidad y la quimiotaxis, estos procesos son rápidos y se esperaría que los gradientes quimiotácticos en medio líquido ya estén formados luego de una hora.

Por lo tanto, estos resultados apuntan a que el rol del flagelo fino en la adhesión es más coherente con un rol de adhesina, que permita una adhesión más firme y/o una tasa de desorción más lenta, manifestándose así a tiempos largos de incubación.

Si bien se han realizado trabajos de quimiotaxis en *B. japonicum* (Barbour *et al.*, 1991; Kape *et al.*, 1991) nunca se emplearon mutantes en flagelos o en quimiotaxis para los estudios de adhesión. Sólo en 1986 Vesper y Bauer describieron la adhesión a superficies plásticas de *B. japonicum* mediada por fimbrias (pili); sin embargo encontraron que un bajo porcentaje de la población bacteriana presentaba este tipo de estructuras y que dependían mucho de la fase de crecimiento (Vesper & Bauer, 1986). La pilina constituyente de estos pili fue caracterizada como una proteína de 21 kDa. En nuestras preparaciones de flagelos y observaciones al microscopio electrónico, en ningún caso hemos podido observar la presencia de una estructura similar al pilus, como así tampoco la presencia de esta proteína en nuestras preparaciones de proteínas extracelulares de la cepa salvaje o las mutantes.

#### IV.2.2 Infectividad

La infectividad puede definirse en relación con la rapidez con que los rizobios ingresan a las raíces, infectan el primordio de nódulo y promueven su desarrollo. Obviamente la infectividad tiene como prerrequisito la adhesión de los rizobios a las raíces, si bien una mínima fracción de las bacterias que se adhieren completa la infección. En vista de los resultados obtenidos para la adhesión, decidimos ensayar la infectividad de la cepa más móvil, comparada con la salvaje, en raíces de soja.

Esta metodología se basa en la existencia de una única zona infectable al momento de la inoculación. Esta zona se denomina *ventana de infección* y está comprendida entre la punta de la raíz (PR) y la zona de los pelos emergentes más pequeños (PEMP), dado que no pueden producirse infecciones en la región de los pelos radicales maduros. Debido a que esta zona se desplaza a medida que la raíz crece y se desarrolla, cuanto más tarde ocurran las infecciones, más cerca del ápice de la raíz aparecerán los nódulos. Por lo tanto, cuando más infectivos sean los rizobios, una mayor cantidad de nódulos se encontrará en las zonas cercanas a la base de la raíz. Para expresar la distribución de los nódulos a lo largo de cada raíz se definen unas unidades relativas de distancia (URD) que compensan las diferencias de longitud entre raíces individuales. Una URD se define

como la distancia que existe al momento de la inoculación entre PR y la zona de los PEMP (para más detalles ver Materiales y Métodos y Bhuvaneswari *et al.*, 1980. Estos ensayos se realizan en bolsas plásticas de crecimiento regadas con FMS proporcionando un ambiente saturado de agua. De acuerdo a estudios anteriores sobre el aumento de la infectividad con el tamaño del inóculo, se verifica una relación directa hasta inóculos bacterianos de  $10^6$  UFC planta<sup>-1</sup>, por encima de los cuales la infectividad ya no aumenta más (Halverson & Stacey, 1986).

Para comparar el efecto de la mayor movilidad de la cepa LP 3008 era pues necesario que los inóculos contuvieran concentraciones bacterianas no saturantes, esto es, bastante por debajo de  $10^6$  UFC ml<sup>-1</sup>. Los cultivos bacterianos empleados en estos experimentos fueron crecidos en el medio de Götz hasta fase exponencial y se diluyeron en FMS con el fin de inocular  $10^4$  UFC planta<sup>-1</sup>. Luego del período de incubación planta-bacteria, se registró el número de nódulos formados en las raíces primarias y su distancia a la marca de PR (realizada al momento de la inoculación) y los datos se agruparon por segmentos de distancias a la marca de PR. Los nódulos formados por debajo de la marca de PR (es decir, en partes de la raíz que no existían al momento de la inoculación) recibieron valores negativos de URD. El resultado se volcó en un gráfico que muestra la distribución de los nódulos en URD respecto a la marca de PR (Figura IV.2) Se obtuvo siempre una mayor densidad de nódulos en la zona cercana a PR en las plantas inoculadas con la cepa LP 3008, lo cual refleja que posee una mayor infectividad que la cepa salvaje. Otro parámetro calculado es el valor medio de la distancia del nódulo más alto a PR (en URD). Este número se presenta en la gráfica para el ensayo mostrado, mientras que en un ensayo independiente se obtuvieron valores de  $-1,29 \pm 0,52$  para LP 3004 y de  $-0,29 \pm 0,30$  LP 3008. En ambos ensayos estos valores fueron más cercanos a 0 para LP 3008, indicando que esta cepa generó infecciones más rápidamente que LP 3004. Un resultado similar para este parámetro se observó para *S. meliloti*-alfalfa, donde una cepa que carece de flagelos y otra que con fenotipo Mot<sup>-</sup> (tiene flagelo pero no funciona) presentan valores promedio más negativos, o sea más alejados del 0 (Caetano-Anolles *et al.*, 1988).

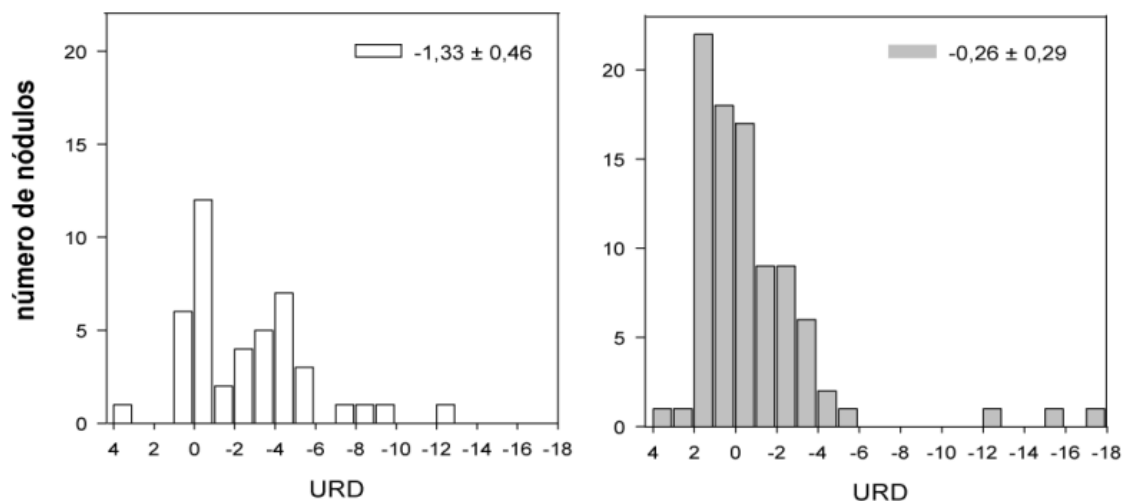


Figura IV.2 Inefectividad de *B. japonicum* LP 3004 (izquierda) y LP 3008 (derecha) en plantas de soja. Los valores negativos indican distancias relativas (URD) de nódulos situados en regiones de la raíz ausentes al momento de la inoculación. Los histogramas muestran la totalidad de los nódulos desarrollados en las raíces de cada condición. Insertadas se encuentran las distancias promedio del nódulo más alto a la marca de la punta de la raíz.

### IV.3 Ensayos en medios porosos

Abordar los ensayos de interacción planta-bacteria y poder evaluar el desplazamiento y la movilidad bacteriana en medios porosos no resulta una tarea sencilla, más aún conociendo la complejidad de los suelos, hábitat donde se encuentran los rizobios en vida libre. Allí son capaces de sobrevivir durante largos períodos, aún en escasez de nutrientes (López-García *et al.*, 2002; Sadowski & Graham, 1998). Sin embargo, en este medio los rizobios presentan una escasa movilidad vertical (Sadowski & Graham, 1998). Un experimento realizado en suelos de Norteamérica en el año 1989 demostró que la inoculación sobre la semilla permitía competir a los rizobios inoculados únicamente en la zona de aplicación y no a lo largo del sistema radical, siendo el inoculante incapaz de desplazarse hacia las profundidades (McDermott & Graham, 1989). Este resultado fue confirmado posteriormente en nuestro laboratorio (López-García *et al.*, 2002). El desplazamiento de los rizobios parece depender de factores capaces de transportarlos, tales como la labranza, la acción de las lombrices, o el agua de percolación (Madsen & Alexander, 1982). Más recientemente, la movilidad de *S. meliloti* hacia los exudados radicales en turba usada como sustrato fue observada nuevamente como muy restringida, a menos que también estuvieran presentes nematodos capaces de ser atraídos por compuestos volátiles liberados de las raíces de *Medicago truncatula*. En estos experimentos se observó que los rizobios fueron transportados tanto sobre la superficie como en el tracto intestinal de los nematodos

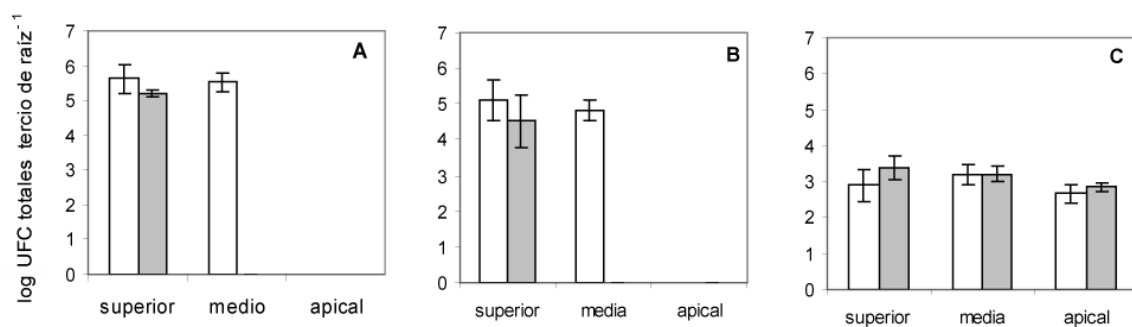


(Horiuchi *et al.*, 2005). En contrapartida con las evidencias anteriores existe otra tendencia a pensar que los exudados radicales, percibidos por los rizobios, permiten una quimiotaxis y movilidad positiva hacia las raíces en el suelo y confieren una ventaja competitiva; sin embargo estos trabajos se realizaron en condiciones de saturación de agua (Ames & Bergman, 1981; Barbour *et al.*, 1991; Brencic & Winans, 2005; Dharmatilake & Bauer, 1992; Yost *et al.*, 2003). Sabiendo que la movilidad en medios porosos no saturados es escasa, pero habiendo observado diferencias significativas en los experimentos realizados en medios líquidos, decidimos evaluar el comportamiento en medios porosos insaturados y comprobar si una mayor movilidad bacteriana puede contribuir a una mejor colonización de las raíces en estos medios.

#### IV.3.1 Colonización rizosférica a tiempos cortos

Diseñamos ensayos de colonización de raíces de soja en un sustrato neutro, vermiculita, comúnmente empleado para realizar cultivos hidropónicos de plantas. Este sustrato presenta una aireación y retención de agua similares a las del suelo. De esta manera, no sólo intentamos semejar las condiciones del suelo, sino que a la vez logramos controlar la composición nutritiva y descartar la influencia de otras variables bióticas o abióticas. Los rizobios se inocularon de dos maneras diferentes. En el primer caso se inocularon sobre las semillas (semejando el modo más frecuente de aplicación de los inoculantes) y en el segundo caso se distribuyeron en la vermiculita (semejando la distribución de los rizobios de la población del suelo).

Para llevar a cabo las inoculaciones de las semillas los cultivos bacterianos se crecieron hasta obtener inóculos de  $10^8$  rizobios  $\text{ml}^{-1}$ , ya sea en medio YEM o en Götz. Luego de colocar plántulas de soja de tres días de edad en los tubos regados con FMS se realizó la inoculación sobre la semilla (que quedaba al ras de la superficie de la vermiculita) con 1 ml de cultivo. Al cabo de 48 horas se cortaron los tubos y se desprendió cuidadosamente la vermiculita adherida a las raíces, de modo tal de no modificar la distribución de bacterias en la superficie radical. Luego cada una fue dividida en tres partes iguales: superior, media y apical y lavadas suavemente. Como resultado, independientemente del medio en que fueran cultivadas, ambas cepas fueron capaces de colonizar el tercio superior de raíz, el tercio medio únicamente fue alcanzado por la cepa salvaje, y el tercio apical no fue colonizado en ninguno de los dos casos (Figura IV.3. A y B). Este resultado nos llamó la atención, pues hubiésemos esperado un resultado opuesto en cuanto a la colonización de la parte media de la raíz. Sin embargo



**Figura IV.3** Colonización de *B. japonicum* sobre raíces de soja. Se inocularon los cultivos bacterianos crecidos en los medios de YEM (A y C) o Götz (B), ya sea sobre la semilla (A y B) o en la vermiculita (C). Se registró el número de UFC en el tercio superior, medio o apical de la raíz. Las barras de error indican el desvío estándar (n=5).

estos resultados corroboraron observaciones previas acerca de la escasa movilidad bacteriana en el suelo (McDermott & Graham, 1989).

Para inocular los rizobios en la vermiculita se regaron los tubos con una solución de FMS conteniendo  $1,49 \cdot 10^6$  rizobios LP 3004  $\text{ml}^{-1}$  o  $2,29 \cdot 10^6$  rizobios LP 3008  $\text{ml}^{-1}$ . Se permitió el drenaje del agua gravitacional para alcanzar la capacidad de campo, se colocaron las plántulas de soja y se dejaron 48 horas, luego de las cuales se procesaron como en el experimento anterior. Los resultados mostraron que en primer lugar, las tres partes fueron colonizadas por ambas cepas, y en segundo lugar, no hubo diferencias significativas entre la cepa salvaje y la mutante de mayor movilidad (Figura IV.3.C)

Estos datos son congruentes con trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio donde se demostró que la posición de los rizobios en el sustrato determina su competitividad (López-García *et al.*, 2002), pero además indican que el aumento en la movilidad de *B. japonicum* no se reflejó directamente en una mejora en la colonización radical, pese a que anteriormente hemos visto aumentos de adhesividad e infectividad. Estos resultados ponen nuevamente de relieve las profundas diferencias entre los medios líquidos y los medios porosos insaturados y señalan la necesidad de no extrapolar resultados obtenidos en los primeros a los segundos.

### IV.3.2 Colonización a tiempos largos: distribución de *B. japonicum* en raíces de soja<sup>1</sup>

*B. japonicum* es capaz de colonizar las raíces de soja para finalmente invadir las células de la raíz e ingresar a la planta; sin embargo, no se conoce cómo es la distribución de las bacterias a lo largo de la raíz. A fin de analizar si hay sitios preferenciales de colonización, realizamos una microscopía electrónica de barrido de las raíces de soja inoculadas con su simbionte. Las plantas inoculadas con los rizobios fueron cultivadas

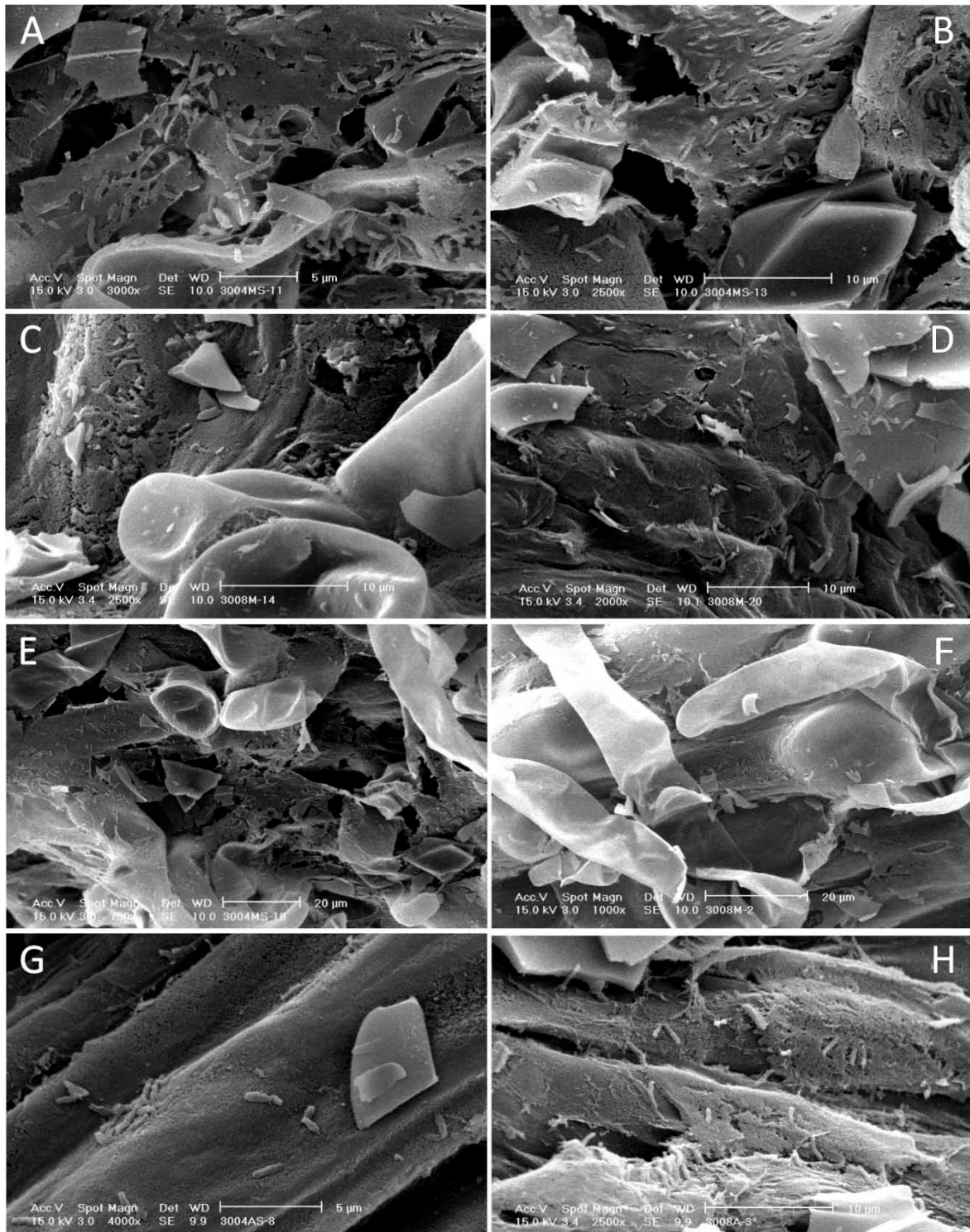
<sup>1</sup> Realizado en la Universidad Autónoma de Madrid (España) bajo la dirección de los Dres. Rafael Rivilla y Marta Martín por convenio en el marco de la Red BIOFAG-CYTED.

en jarras de Leonard, donde se espera que no haya perturbaciones ocasionadas por el riego sobre el patrón de colonización. La inoculación de los rizobios se realizó con las cepas LP 3004 y LP 3008 sobre las semillas de plántulas de tres días. Luego de dos semanas de crecimiento en las jarras de Leonard se realizó el procesamiento de las plantas. Se eligieron trozos de raíces principales y secundarias y se observaron al microscopio electrónico de barrido. Los patrones de colonización indicaron que los rizobios no tapizaban uniformemente la raíz, encontrándose en mayor cantidad en las partes medias de la raíz que en las apicales (Figura IV.4). Por otro lado, y al igual que se puede observar en *P. fluorescens* colonizando alfalfa (Barahona *et al.*, 2010), las bacterias se ubicaron por debajo del mucílago generado por la raíz, y se pueden apreciar en regiones donde esta película se ha roto, ya sea naturalmente o a consecuencia de la manipulación con las pinzas durante el proceso de fijación. La distribución no parece estar acotada a los pelos radicales sino que los rizobios se encontraban en toda la superficie de la raíz (Figura IV.4. E y F). Las observaciones resultaron indistintas para LP 3004 o LP 3008 y en general, los rizobios se encontraban adheridos lateralmente a la superficie radical, observándose pocos casos de adhesión polar.

### IV.3.3 Movilidad en arena

En la búsqueda de otro sustrato diferente a la vermiculita, y debido a la complejidad de los sistemas naturales para evaluar los desplazamientos de las bacterias, diseñamos un sistema poroso con arena dispuesta en cajas de Petri de 9 cm de diámetro regada con medio de Götz. En primer lugar, evaluamos la cantidad de medio de Götz que debíamos agregar a una cantidad fija de arena para mantener un estado hídrico similar a la capacidad de campo. Luego de algunas pruebas seleccionamos una proporción de 4,45 g de arena  $\text{ml}^{-1}$  de Götz, que poseía un  $\psi_h$  de -0,23 MPa, valor no muy lejano al hallado en los suelos. Se colocaron 20  $\mu\text{l}$  de un cultivo con aproximadamente  $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  en el centro de la caja de Petri de modo que el número total de bacterias inoculado era de aproximadamente  $10^6$  UFC. Luego, a distintos tiempos se tomaron muestras a diferentes distancias del punto de inoculación. Comenzamos con la cepa salvaje y tomamos muestras en un radio de 1 cm respecto del punto de inoculación a los 5 días. Sin embargo, en estas condiciones no pudimos recuperar bacterias, con lo que dedujimos que en el periodo mencionado no llegaron a desplazarse a esa distancia. Por lo tanto, en los siguientes experimentos, prolongamos los tiempos de incubación a 7 días y pudimos contar del orden de  $10^4$  UFC  $\text{mg arena}^{-1}$  a 1 cm de distancia del punto de

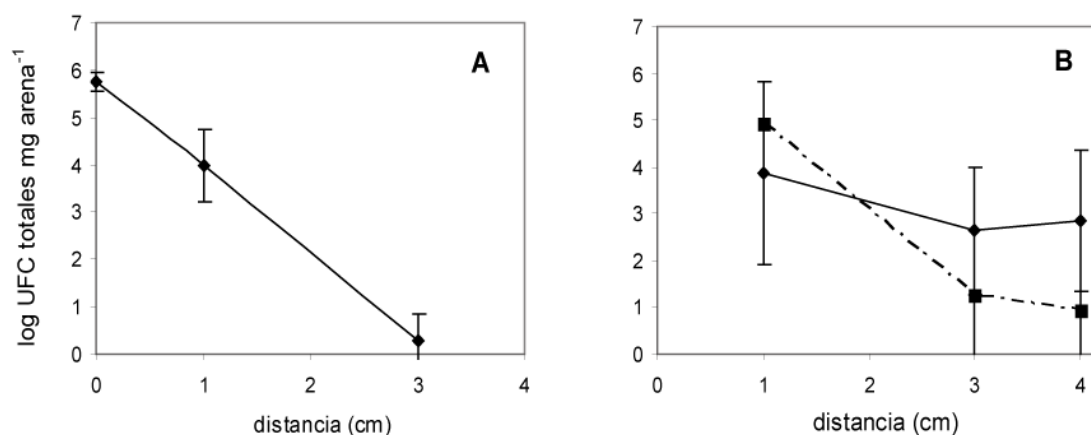
siembra, pero sólo en algunas muestras. En un ensayo realizado únicamente con LP 3008, inoculamos un total de  $1,41 \cdot 10^7$  UFC en tres cajas diferentes. En una de ellas tomamos una muestra del centro a tiempo 0, y recuperamos  $4,36 \cdot 10^4$  UFC mg de arena<sup>-1</sup>.



**Figura IV.4** Colonización de raíces de soja por parte de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 luego de dos semanas de cultivo en jarras de Leonard. Se muestran micrografías electrónicas de barrido de las partes medias de raíces inoculadas con LP 3004 (A, B y E) o con LP 3008 (C, D y F) y de las partes apicales con LP 3004 (G) o con LP 3008 (H). En cada figura se indica el aumento y se muestran las barras de referencia de tamaño.

En las otras dos placas tomamos muestras a 0; 1 y 3 cm luego de 7 días de incubación (Figura IV.5.A). Finalmente, decidimos inocular cajas tanto con la cepa salvaje o con la más móvil e incubarlas durante 14 días, en ambos casos se inoculó un total de  $1 \times 10^7$  rizobios y se tomaron muestras en cuatro direcciones diferentes respecto del centro en la misma placa. Para ambas cepas, recuperamos del orden de  $10^5$ ,  $10^3$  y  $10^2$  bacterias  $\text{mg arena}^{-1}$  a 1; 3 y 4 cm respectivamente (Figura IV.5.B). Con estos ensayos, corroboramos que el desplazamiento neto de los rizobios en este medio es muy escaso. Incluso en algunos casos, por ejemplo a la distancia de 1 cm, las bacterias podrían haberse duplicado además de haberse desplazado, tal como ocurre en vermiculita regada con FMS, donde *B. japonicum* es capaz de crecer dos órdenes de magnitud en 10 días y persistir en ese número durante 40 días más (López García, 2004).

Para observar cómo era la expresión de los flagelos en este medio decidimos purificarlos a partir de bacterias recuperadas de la arena. Para ello recuperamos las bacterias de las placas de Petri resuspendiéndolas en buffer PBS. Luego sonicamos la suspensión durante 10 minutos en baño de agua, a fin de desprender a las bacterias que se encontraran unidas a las partículas de arena; y vorteamos 5 minutos a máxima potencia, con el objetivo de desprender los flagelos de las células. Centrifugamos a  $8.000 \times g$  y recuperamos el sobrenadante. El mismo fue recentrifugado y se obtuvo el pellet y un nuevo sobrenadante. Se sembraron muestras de estas fracciones y se realizó un Western blot de las mismas. Así pudimos observar que tanto LP 3004 como LP 3008 tenían expresado el flagelo fino en este medio (Figura IV.6) (se muestra únicamente la fracción del sobrenadante). Debemos recordar que en el medio de Götz líquido con la

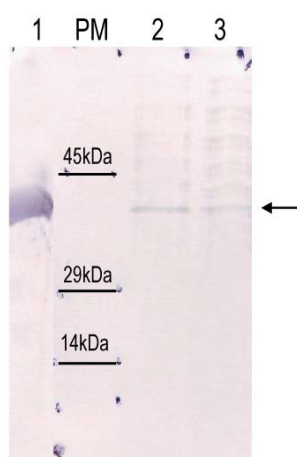


**Figura IV.5** Desplazamiento de *B. japonicum* en placas con arena regada con medio de Götz ( $\Psi_h -0,23\text{MPa}$ ) durante 7 días (A) y 14 días (B) a  $28^\circ \text{C}$ . Las muestras se tomaron a tres distancias diferentes del punto de inoculación (o en el punto de siembra en A) luego de los tiempos indicados. Línea llena LP 3004 y línea punteada LP 3008.

fuente de carbono original (manitol) la cepa salvaje LP 3004 no expresaba dicho flagelo. En la membrana del Western blot, además de la banda discreta y del peso molecular correspondiente a las flagelinas se puede observar de fondo un bandeo con dobletes equiespaciados, característico del perfil del LPS de *B. japonicum* (Quelas *et al.*, 2010), indicando que las flagelinas de bajo peso molecular FliCI-II pueden haberse asociado al LPS o bien que el anticuerpo también reconoció al LPS y éste pueda haber coprecipitado junto a las flagelinas en nuestra extracción.

#### IV.3.4 Competición para la nodulación en el campo

Una vez realizados los experimentos en medios porosos no saturados y en condiciones controladas de laboratorio, decidimos probar las cepas LP 3004 y LP 3008 en competición con las cepas residentes en los suelos naturales mediante un ensayo a campo. El experimento se realizó en un campo de San Antonio de Areco, Provincia de Buenos Aires y la siembra se realizó el 20 de diciembre del año 2005. El suelo es cultivado con soja desde hace años. Por medio de un ensayo del número más probable (Vincent, 1970) se determinó que la densidad de rizobios noduladores de soja era de  $1,8 \cdot 10^5$  rizobios g de suelo<sup>-1</sup>. El suelo era un argiudol vértico de textura limosa y al momento de la siembra su contenido hídrico se encontraba a 70% de la capacidad de campo. El diseño experimental consistió en bloques completamente aleatorizados con tres bloques por condición, cada uno de 3,14 m por 7 m. Los inoculantes conteniendo las cepas LP 3004 y LP 3008 fueron preparados en formulaciones líquidas por Síntesis Química S.A.I.C y contenían un título de  $10^9$  rizobios ml<sup>-1</sup>. Los métodos de inoculación fueron sobre semilla o en el surco de siembra empleando siembra directa. En el surco se inocularon 25 semillas m<sup>-1</sup> y se encontraban separados a 0,38 m uno del otro. De este modo, se realizaron 4 tratamientos, dos para cada cepa, más el control sin inocular. En



**Figura IV.6** Western blot de la fracción del sobrenadante de proteínas obtenidas de bacterias recuperadas del ensayo de movilidad en arena, reveladas con antisuero anti-FliCI-II. Calle 1: control positivo, flagelina FliCI-II purificada: Calle 2: extracto proteico de LP 3004 y calle 3. extracto proteico de LP 3008. La flecha indica la banda correspondiente a FliCI-II. PM: Marcadores de peso molecular.

ambos tipos de inoculación la dosis de inoculante fue de  $4 \times 10^9$  rizobios kg de semilla<sup>-1</sup>. Las plantas se cosecharon en el estado vegetativo V6: se tomaron 10 plantas de cada bloque y se sacaron todos los nódulos. Los mismos se esterilizaron en superficie individualmente y sus contenidos se sembraron en cajas réplica de YEM con cicloheximida o con cicloheximida y estreptomicina. Aquellas colonias que crecieron en ambas cajas pertenecían a los nódulos ocupados por la cepa LP 3004 o LP 3008 (dependiendo del tratamiento). Los porcentajes de ocupación se analizaron por medio del análisis de varianza y el test de Tukey. En todos los tratamientos la población naturalizada ocupó mucho más de la mitad de los nódulos, como era esperable de acuerdo a resultados previos (Triplett & Sadowsky, 1992). Cuando los rizobios fueron inoculados en semilla, las cepas LP 3004 y LP 3008 ocuparon un 6% y un 10% respectivamente, pero estas diferencias no son estadísticamente significativas. Sin embargo, cuando la inoculación se realizó en el surco de siembra, los porcentajes de ocupación de nódulos fueron 12% para LP 3004 y 22% para LP 3008, siendo estos valores diferentes con  $p < 0,05$  (Figura IV.7).

#### IV.4 Discusión

En el presente capítulo hemos desarrollado experimentos que evaluaron las interacciones más tempranas de *B. japonicum* y soja en medios con distintos grados de saturación de agua. En los medios líquidos o en sistemas saturados de agua se pudo observar mayor adhesividad e infectividad en la cepa más móvil LP 3008 que en la

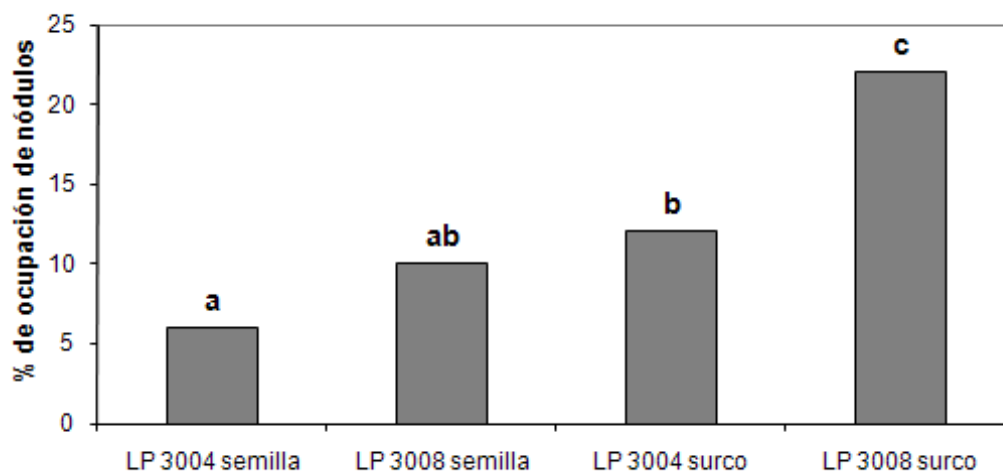


Figura IV.7 Ocupación de nódulos en un cultivo de soja en San Antonio de Areco durante la campaña 2005/6 inoculado con *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 en semillas o en el surco de siembra. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas con  $p < 0.05$  en un análisis de varianza.

parental LP 3004. En medios porosos a capacidad de campo las bacterias no pudieron desplazarse a grandes distancias. Estos datos concuerdan con nuestros experimentos previos, donde las cepas LP 3004 o LP 3008 mostraron una baja capacidad de nodular en macetas con vermiculita en competencia con una población establecida en el sustrato (Althabegoiti, 2004). Sin embargo, en la competición para la nodulación en el campo se pudo observar una mejora cuando LP 3008 fue inoculada en el surco de siembra. Asimismo, ensayos como este fueron realizados en otros campos con la cepa LP 3008 y con la cepa LP 3018, derivada de la EI09 (cepa de inoculación de referencia) resistente natural a espectinomicina y a estreptomycin. La misma tiene una movilidad similar a LP 3004. Estos campos también tenían historia previa de soja, y se encontraron poblaciones residentes de entre  $10^4$  y  $10^5$  rizobios noduladores de soja g de suelo<sup>-1</sup>. Las inoculaciones se realizaron en semilla y en el surco de siembra y resultaron en valores medios de ocupaciones de nódulos del 28,2 y 37,2% respectivamente para la cepa LP 3008, mientras que para la cepa 3018 las ocupaciones de nódulos resultaron ser del 13,2 y 24,2%. El análisis de variancia demostró un fuerte componente de la cepa para explicar la variabilidad total del ensayo, que además involucró al tipo de inoculación y a la localidad (López-García *et al.*, 2009).

Nuestros resultados en medios líquidos indican que la movilidad de los rizobios tiene un papel en las etapas tempranas de infección (Brenic & Winans, 2005; Caetano-Anolles *et al.*, 1988). Sin embargo, los ensayos realizados en medios porosos a capacidad de campo parecen acotar este papel a la condición de saturación de agua. Estos experimentos confirmaron que la movilidad *per se* en medios porosos a capacidad de campo es limitada y no llegaría a ser determinante para una mejora en la colonización.

Analizando el comportamiento bacteriano, podríamos plantear la discusión acerca del rol de cada flagelo en el desplazamiento de *B. japonicum* en medios líquidos y porosos. Recientemente en nuestro laboratorio la Licenciada J. M. Covelli caracterizó el *swarming* de *B. japonicum*, pero desconocemos si podríamos asignarlo a uno u otro flagelo, y en qué condiciones naturales ocurre. A partir de nuestros ensayos pudimos verificar que en arena a capacidad de campo cambiaba la expresión del flagelo fino en la cepa salvaje, respecto de un medio líquido con igual composición. Esto, sumado a nuestras observaciones previas acerca de los cambios de expresión del flagelo fino según la fuente de C empleada, nos indica que en distintos medios, ya sea desde el punto de vista físico o químico, la expresión de los flagelos puede ser diferencial y estar directamente relacionada con el tipo de movimiento que realice el rizobio. Es por ello que



consideramos obtener mutantes en cada uno de los tipos de flagelina para analizar sus contribuciones a la movilidad y la competitividad para nodular en *B. japonicum*.

# Capítulo V

Construcción y caracterización de  
mutantes en las flagelinas de  
*B. japonicum* LP 3004 y LP 3008

## V.1 Introducción

En capítulos previos hemos analizado la expresión y la función de los flagelos de *B. japonicum* en LP 3004 y en LP 3008. Pudimos comprobar que en medio líquido de Gotz la cepa parental no expresa el flagelo fino, mientras que sí se induce cuando el medio es suplementado con arabinosa o gluconato de sodio; e incluso cuando las bacterias se encuentran en un medio poroso como la arena. De forma contraria, la cepa LP 3008 presenta este mismo flagelo desreprimido en el medio líquido de Gotz con su fuente de carbono original, lo cual le confiere una mayor adhesividad e infectividad. Asimismo, se ha observado una mejora en la competición en el campo empleando esta cepa. Estos resultados nos condujeron a pensar en qué rol cumplen los flagelos en dichos procesos. En esta Tesis estudiaremos los flagelos de *B. japonicum* enfocándonos principalmente en su relación con la movilidad.

En bacterias se han descrito al menos seis tipos de movimientos (Henrichsen, 1972), siendo dos de ellos, el *swimming* y el *swarming* mediados por flagelos y los más estudiados. Existe una gran diversidad en sus arreglos y existen además especies bacterianas con dos sistemas de flagelos. Entre ellas podemos enumerar a la familia *Vibrionaceae*, las más estudiada hasta el momento (McCarter, 1999; McCarter, 2001; 2004), y otras especies como *Rhodospirillum centenum* (bacteria púrpura fotosintética) (McClain *et al.*, 2002) *Azospirillum spp* (rizobacteria fijadora de nitrógeno en vida libre) (Moens *et al.*, 1996) y *Aeromonas spp* (patógeno oportunista gastrointestinal de humanos) (Gavin *et al.*, 2002), entre otras. Sus flagelos poseen diferentes características y cumplen funciones disímiles en el desplazamiento. En general, uno de ellos es responsable del *swimming* en medios líquidos y el otro es el responsable del *swarming*.

*B. japonicum* se encuentra alejado filogenéticamente de otros rizobios. Esta lejanía se ve reflejada en varios aspectos, uno de ellos es el tamaño de su genoma, de  $9,1 \cdot 10^6$  pb y la cantidad de genes: 8.373, al compararlo con el genoma de *S. meliloti*, que tiene  $6,7 \cdot 10^6$  pb y 6287 genes, o con el genoma de *R. etli* de  $6,53 \cdot 10^6$  pb y sus 6.022 genes. Es probable entonces que *B. japonicum* tenga muchos de sus genes repetidos. Por ejemplo, una de las enzimas de la vía de síntesis de polihidroxibutirato, la hidroxibutiril-CoA sintasa, presenta 5 copias en el genoma (Quelas, 2009). Otra particularidad que lo caracteriza es que no posee plásmidos naturales, mientras que la mayoría de los rizobios tienen plásmidos simbióticos, incluso algunos de gran tamaño como los son pSymB ( $1,68 \cdot 10^6$

pb) y pSymA (1,35 10<sup>6</sup> pb) de *S. meliloti* o los 6 plásmidos de *R. etli* CFN42. Finalmente, es el único rizobio conocido que presenta dos sistemas de flagelos, descritos en el Capítulo III, y en los cuales enfocaremos nuestro estudio. Ambos filamentos son aparentemente simples, existe un único flagelo grueso subpolar, constituido por una flagelina de 65 kDa y varios peritricos finos compuestos por una flagelina de 37 kDa (aunque la masa molecular teórica es de 34,6 kDa). La energía necesaria para que estos propulsores funcionen está dada por la disipación de un gradiente de protones (Kanbe *et al.*, 2007). En el genoma de *B. japonicum* USDA 110 (Kaneko *et al.*, 2002) se pueden observar dos clusters de genes de biosíntesis y regulación de flagelos e inmersos en ellos se encuentran los genes de flagelina. Además, hay algunos genes relacionados dispersos en el genoma. En el presente capítulo abordaremos la construcción de mutantes en cada uno de los tipos de flagelina por medio de la delección de los genes respectivos y analizaremos los fenotipos obtenidos.

## V.2 Construcción de mutantes en los genes que codifican flagelinas en *B. japonicum*.

Para la construcción de todos los mutantes se eligió una estrategia de doble recombinación homóloga, en la cual se inserta en el genoma una resistencia a antibiótico en reemplazo de los genes de flagelina. La organización de los genes de flagelina de bajo peso molecular (*fliCI* y *II*) y alto peso molecular (*fliCI23* y *4*) se muestran en las Figuras V.1 y V.2, respectivamente.

Para llevar a cabo la delección en *fliCI* y *II* (*bll6865* y *bll6866* respectivamente) la estrategia general de clonado se muestra en la Figura V.1. Brevemente, se amplificó por PCR un fragmento de 393 pb denominado región 1 (reg1), que se encuentra río abajo a *bll6865* abarcando la región intergénica y parte de *bll6864*. Dicho amplicón (Figura V.1.A, gel a) fue clonado en el vector comercial pGemT-Easy (Promega) según las indicaciones del fabricante. Así se obtuvo el plásmido pMJA01, corroborándose por PCR con cebadores M13 y los específicos del fragmento insertado (no mostrado). El mismo procedimiento se realizó con un fragmento de la región intergénica entre *bll6866* y *bll6867*, de 262 pb (Figura V.1.B, gel d), al cual denominamos región 2 (reg2), y al vector que lo contiene pMJA02. Luego, se liberó del plásmido pMJA01 el inserto previamente clonado por digestión con *EcoRI* y se introdujo el mismo en el plásmido pK18*mob*,

suicida en rizobios (Figura V.1.B, gel b), originando el plásmido pMJA03. El mismo fue chequeado por PCR para obtener la orientación deseada y compatible con el segundo fragmento a clonar (Figura V.1.A, gel c). A partir del plásmido pMJA02 con el inserto *reg2* (orientado en la dirección deseada, Figura V.1.B, gel e), se realizó su digestión con *Pst*I y *Sph*I, de modo de posibilitar su posterior clonado de manera orientada en pMJA03, digerido previamente con las mismas enzimas (Figura V.1.B, gel f). El plásmido resultante, denominado pMJA04, fue evaluado por PCR, y se corroboró que contiene ambos fragmentos (Figura V.1.B, gel g), con un sitio de clonado *Bam*HI entre ellos. La digestión con *Bam*HI del plásmido pHP452 liberó el casete de resistencia a Sm/Sp, que luego fue introducido en el plásmido pMJA04 digerido con la misma enzima (Figura V.1.B, gel h) para así construir finalmente el plásmido pMJA05, el cual se chequeó por digestión (Figura V.1.C, gel i) y posterior secuenciación. Esta última construcción se movilizó a *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 por conjugación triparental utilizando el plásmido asistente pRK2013. La primera selección se realizó en cajas YEM Sm/Sp, a favor de aquellas colonias que pudieran presentar simples y dobles recombinaciones homólogas, y en contra de las *E. coli* portadoras del pRK2013. Posteriormente, las colonias que desarrollaron se picaron cajas réplicas de YEM Sm/Sp/Km y YEM Sm/Sp para detectar los candidatos a haber incorporado el fragmento clonado por doble recombinación homóloga, siendo estos resistentes a Sm/Sp (codificada en el inserto) y sensibles a Km (codificada en el vector). Los candidatos así seleccionados se chequearon por PCR con cebadores específicos de un fragmento del casete de resistencia y de fragmentos río arriba y río abajo de *reg1* y *reg2* respectivamente (Figura V.1.C, gel j). De esta manera se verificó la presencia del casete y que su ubicación en el genoma fuera la esperada. Los mutantes en la flagelina que forma parte del flagelo fino, confirmados a partir de LP 3004 y LP 3008, se denominaron LP 6865 y LP 6866, respectivamente.

Para obtener los mutantes *fliC1234* (*bll5843 a 5846*) la estrategia de clonado se muestra en la Figura V.2. Brevemente, se amplificó un fragmento de 595 pb, denominado región 3 (*reg3*), dentro del gen *bll5843* y se ligó en el vector comercial pGemT-Easy como en los casos anteriores (Figura V.2.A gel a), obteniéndose así el plásmido pMJA06. La presencia del fragmento fue chequeada por PCR (no mostrado). Luego el fragmento se liberó con *Eco*RI y se introdujo en el vector suicida en rizobios, pG18mob2 (Figura V.2.A, gel b). Se seleccionó la orientación deseada con los cebadores específicos y los M13

A

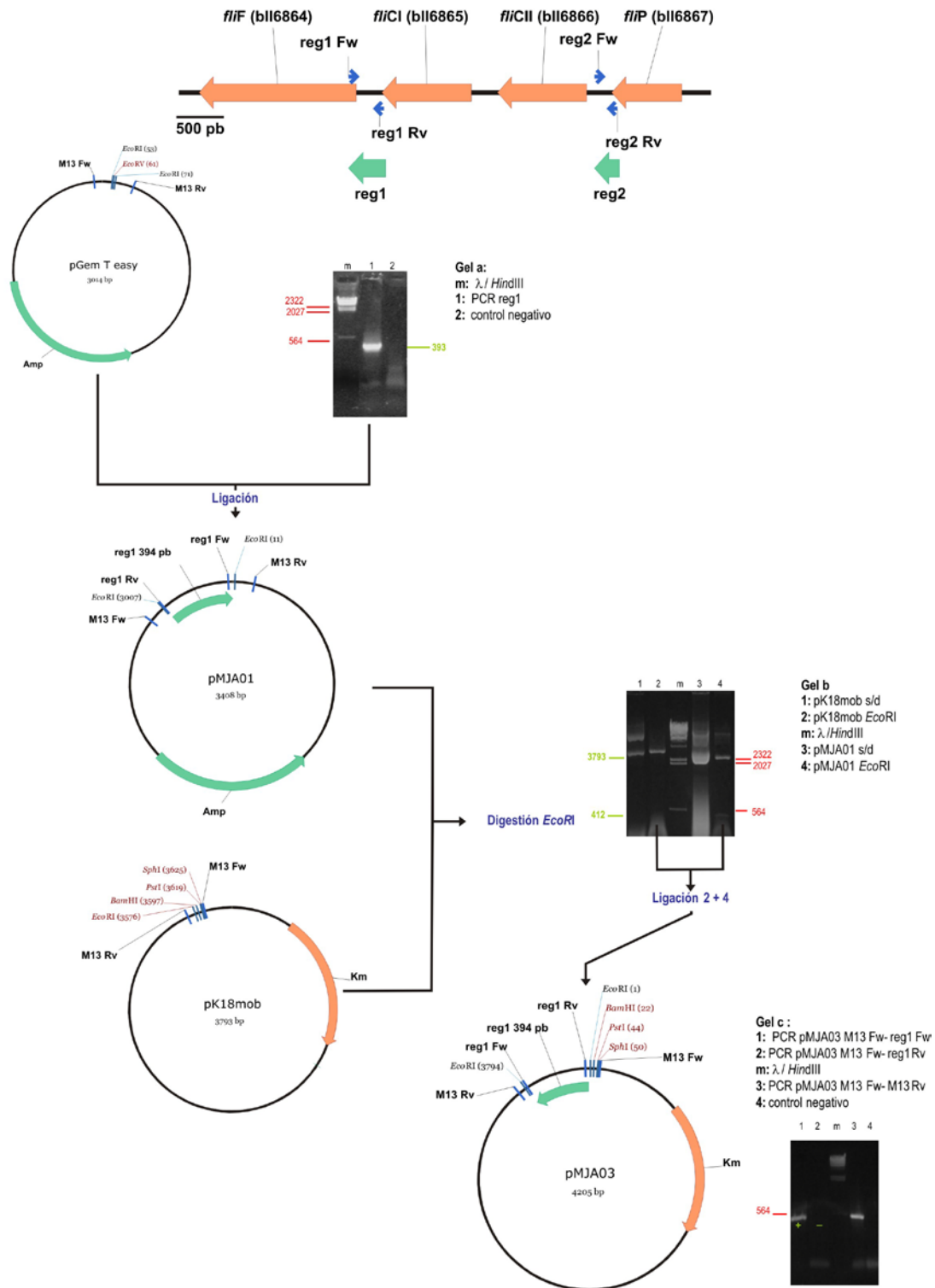


Figura V.1 Estrategia de clonado para la construcción del vector pMJA05 empleado para realizar la delección de *fliC* y *fliCII* en *B. japonicum*. A) Obtención del vector pMJA03. B) Obtención del vector pMJA05. C) Transferencia del vector pMJA05 a *B. japonicum* y evaluación genotípica del mutante.

B

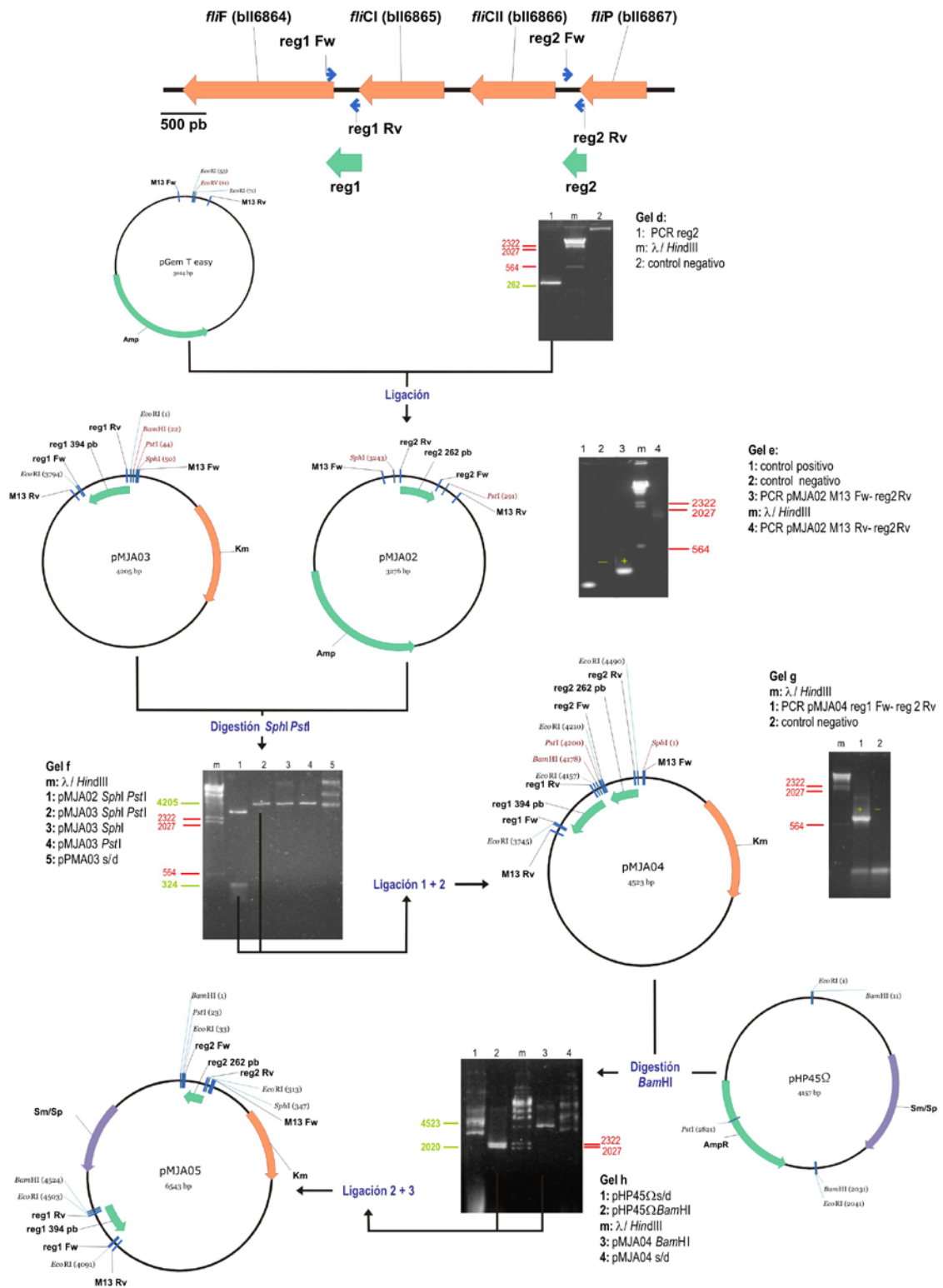


Figura V.1 (continuación)

C

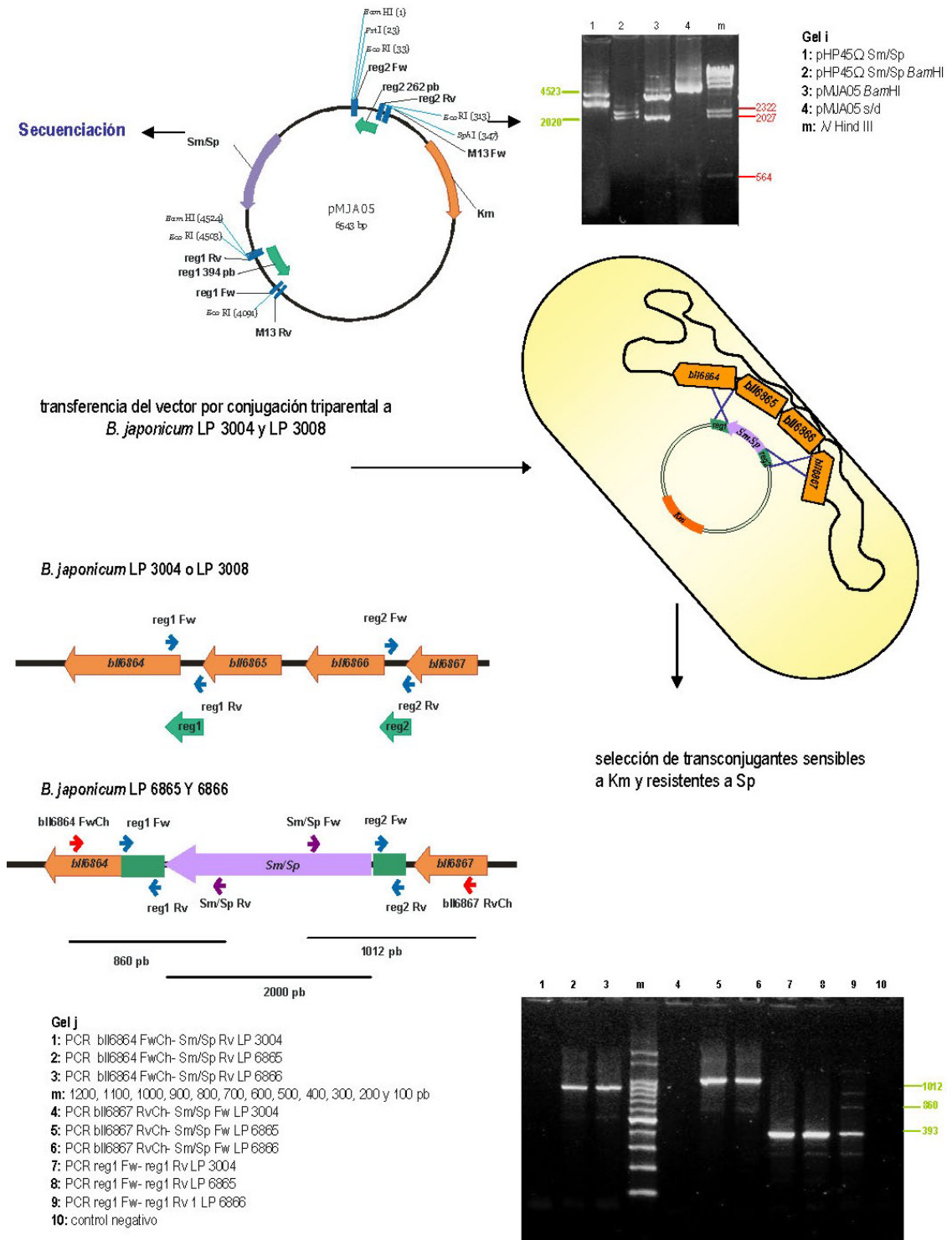


Figura V.1 (continuación)



pertenecientes al pG18mob2 (V.2.A, gel c). El plásmido obtenido se denominó pMJA07.

El segundo fragmento de la recombinación se encuentra ubicado al principio del gen *bll5846*, fue llamado región 4 (*reg4*) y su tamaño es de 432 pb. Se amplificó con la ADN polimerasa PFX (Invitrogen) a fin de obtener un fragmento con extremos romos (Figura V.2.B, gel d). Este fragmento fue clonado en el vector pBBR1MCS4 digerido previamente en el sitio *SmaI* (no mostrado), dando lugar al vector pMJA08, en el cual se corroboró la orientación correcta por PCR con los cebadores M13 y los específicos del inserto (Figura V.2.B, gel e). El fragmento *reg4* se liberó del plásmido pMJA08 con *XbaI* y *HindIII* y se clonó en estos sitios en el pMJA07 (Figura V.2.B, gel f), obteniéndose el plásmido pMJA09. Este último tiene clonados ambos fragmentos en la misma orientación, debido a que la digestión con *XbaI* y *HindIII* introducen el fragmento *reg4* orientado en pMJA07. Por digestión (Figura V.2.B, gel g) se corroboró la presencia de ambos fragmentos. Por último, se liberó mediante digestión con *BamHI* el casete de resistencia a Km de 2 kpb del plásmido pHP45Ω-Km para introducirlo en el plásmido pMJA09 digerido con la misma enzima (Figura V.2.B, geles h-i respectivamente) y así construir finalmente el plásmido pMJA10. Este último vector fue chequeado por digestión (Figura V.2.C, gel j) y posterior secuenciación. Al igual que en el caso anterior, la construcción se movilizó a *B. japonicum* LP 3004, LP 3008 y ahora también a LP 6865 y LP 6866 por conjugación triparental utilizando el plásmido asistente pRK2013.

En este caso la primera selección se realizó en cajas YEM/Sm/Km (para candidatos en el acervo de LP 3004 y LP 3008) o YEM/Sm/Sp/Km (para candidatos en el acervo de LP 6865 y LP 6866) a fin de seleccionar a favor de los simples y dobles recombinantes y en contra de las *E. coli* portadoras del pRK2013, y en una segunda ronda, se seleccionó los candidatos a haber incorporado el inserto por doble recombinación homóloga como aquellas colonias resistentes a Km (codificada en el inserto) y sensibles a Gm (codificada en el vector). Además, los candidatos se chequearon por PCR con cebadores específicos de un fragmento del casete Km y de fragmentos río arriba y río abajo de *reg3* y *reg4*, respectivamente, para corroborar la presencia del casete y que su ubicación en el genoma de *B. japonicum* fuera la esperada (Figura V.2.C gel k). En este último caso se obtuvieron los mutantes en las flagelinas que componen el flagelo grueso derivados de LP 3004 y LP 3008, a los que se denominó LP 5843 y LP 5844, y los dobles mutantes delecionados en ambos tipos de flagelina en el acervo de LP 3004 o LP 3008, denominados LP 6543 y 6644, respectivamente.

A

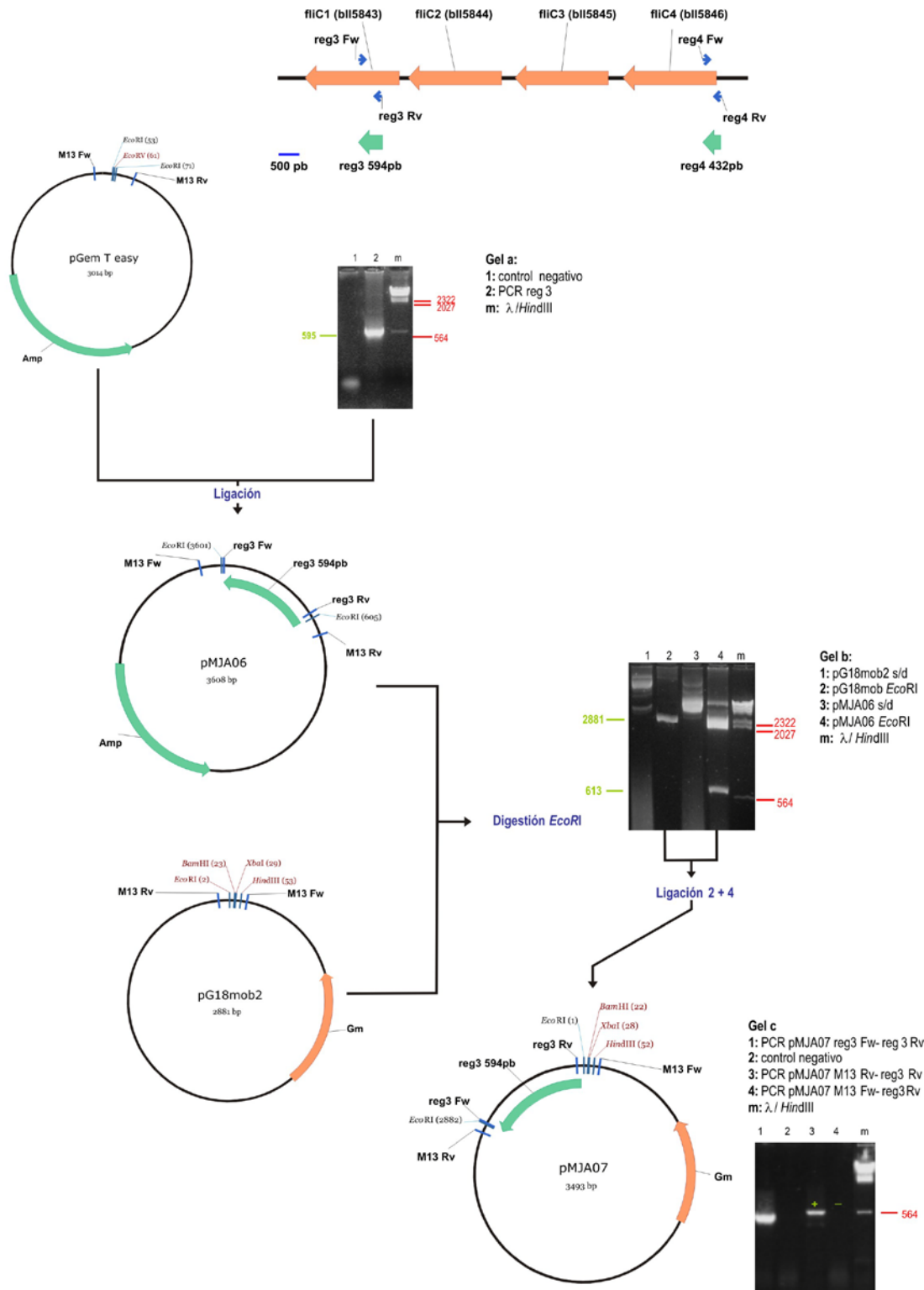


Figura V.2 Estrategia de clonado para la construcción del vector pMJA10 empleado para realizar la delección de *fliC1-4* en *B. japonicum*. A) Obtención del vector pMJA07. B) Obtención del vector pMJA10. C) Transferencia del vector pMJA10 a *B. japonicum* y evaluación genotípica del mutante.

**B**

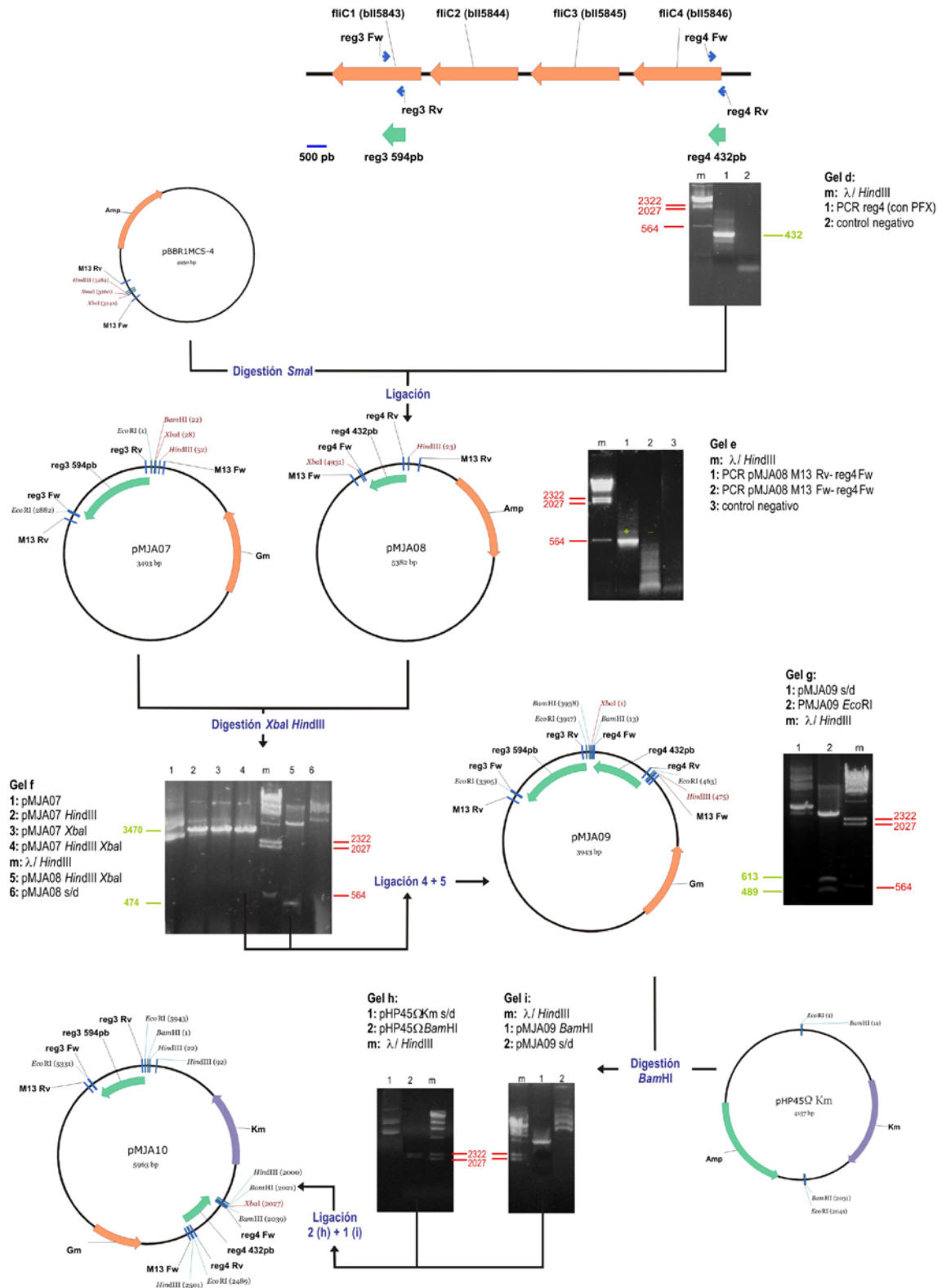


Figura V.2 (continuación)

C

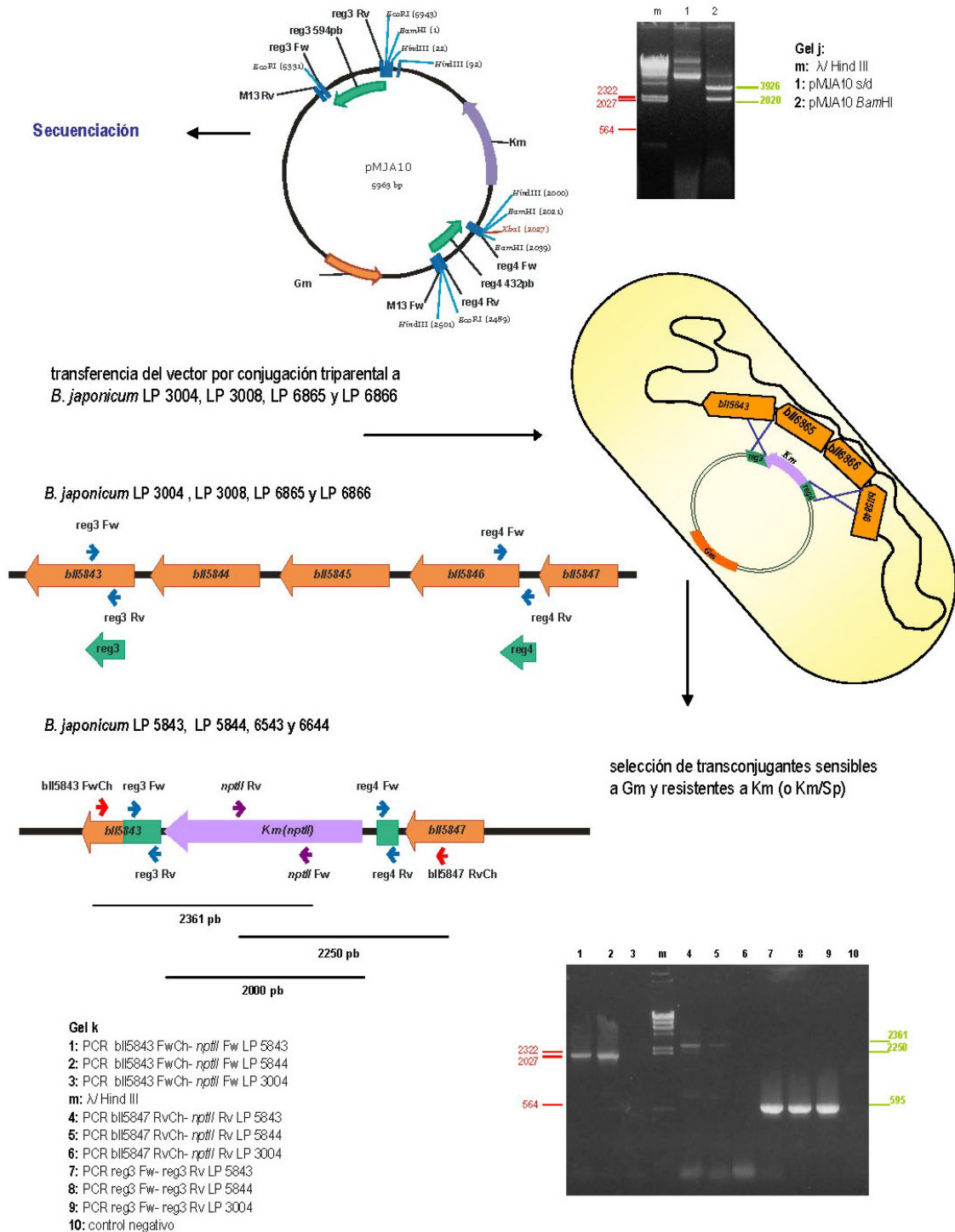


Figura V.2 (continuación)

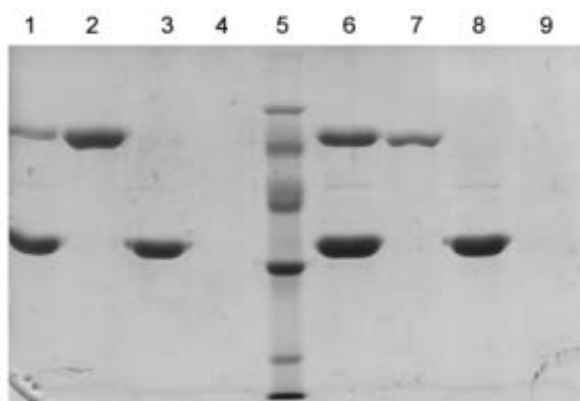
### V.3 Caracterización fenotípica de los mutantes.

#### V.3.1 Purificación de flagelinas

A fin de corroborar la presencia y/o ausencia de las flagelinas en cada uno de los mutantes, decidimos realizar una obtención de estas proteínas a partir de cultivos líquidos con la metodología expuesta en el Capítulo III. Dado que la cepa salvaje LP 3004 sólo expresaba uno de los filamentos en el medio de Götz, en este proceso de obtención de flagelinas cultivamos los rizobios en el medio HM, donde tanto LP 3004 como LP 3008 expresaban ambos flagelos (Figura III. 3.A). Los resultados obtenidos se muestran en la Figura V.3, donde se puede ver que las cepas mutantes no expresaron las flagelinas cuyos genes fueron delecionados.

#### V.3.2 Caracterización de las cepas mutantes mediante técnicas microscópicas

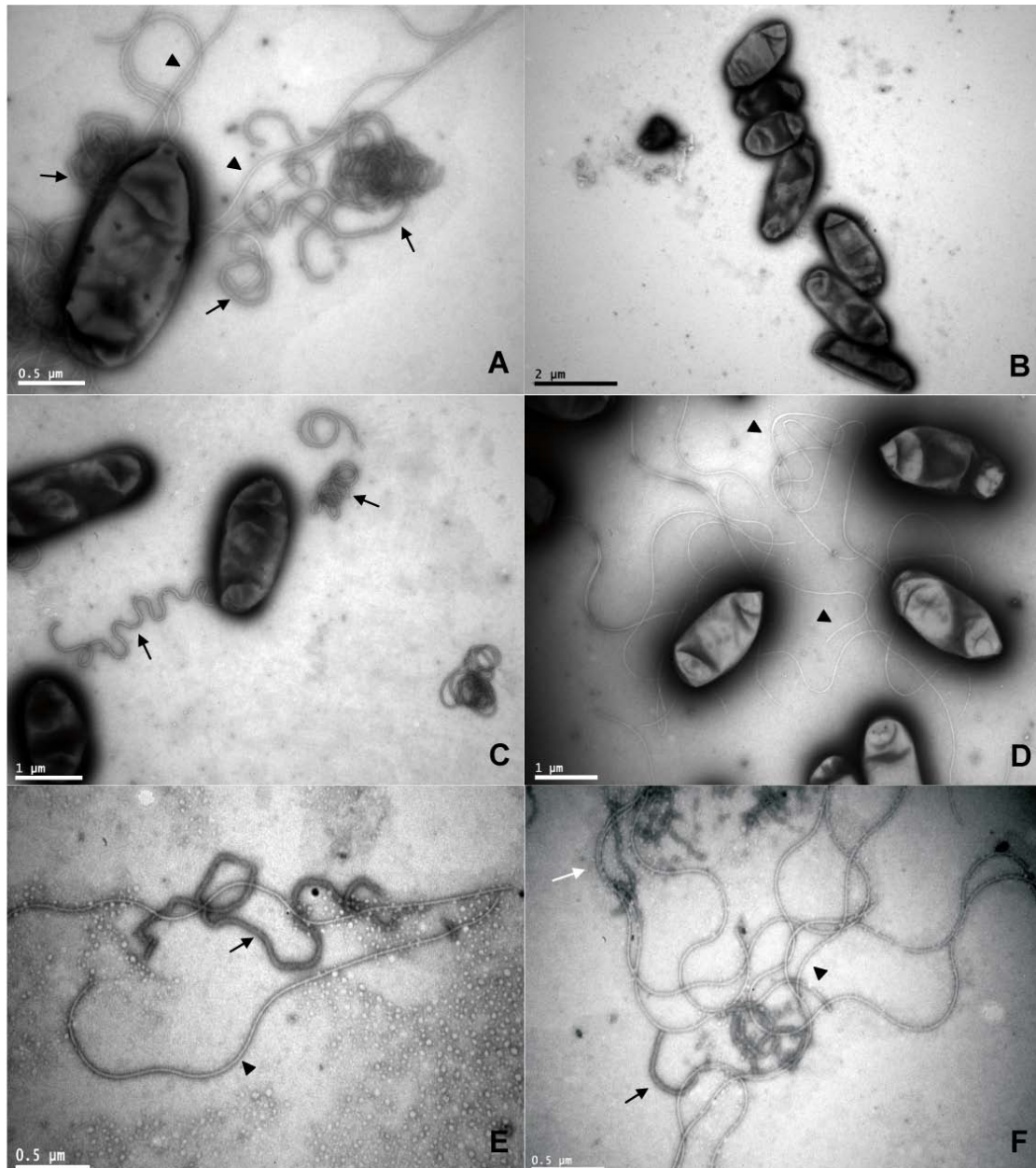
A fin de observar la morfología de los flagelos y completar la caracterización fenotípica de estos mutantes decidimos utilizar la microscopio electrónico de transmisión. En este caso los rizobios se crecieron en el medio HM con sus tres fuentes de carbono, al igual que en la purificación de flagelinas, para permitir la expresión de ambos sistemas de flagelos. Se muestran las cepas LP 3004 y sus derivadas LP 6865, LP 5843 y LP 6543, habiéndose observado lo mismo en LP 3008 y las mutantes derivadas. Los resultados obtenidos fueron congruentes con las observaciones de la electroforesis en gel de poliacrilamida y se pudo evidenciar una clara diferencia entre ambos flagelos, así como la presencia de uno u otro en cada mutante (Figura V.4). Uno de los inconvenientes que se nos presentó desde el inicio es la fragilidad de los flagelos y la facilidad con la que se desprenden de la bacteria; así, resultó dificultoso ver y fotografiar



**Figura V.3** Análisis de las flagelinas producidas por las cepas LP 3004, LP 3008 y las mutantes derivadas, obtenidas a partir de cultivos líquidos en medio HM y luego separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante. Calles 1-4: derivadas de LP 3004; calles 6-9: derivadas de LP 3008, según el siguiente detalle: 1) LP 3004, 2) LP 6865, 3) LP 5853, 4) LP 6543, 6) LP 3008, 7) LP 6866, 8) LP 5844, 9) LP 6644. En la calle 5 se muestran los marcadores de peso molecular: 97; 66; 45; 29; 20,1 y 14,4 kDa.

el anclaje de ambos flagelos. En muchos campos pudimos observar una célula y un “manejo” de flagelos, sin poder discernir el lugar donde están anclados o incluso si pertenecen a esa bacteria.

También realizamos observaciones y filmaciones al microscopio óptico de cultivos de LP 3004 y sus mutantes derivadas, crecidas en el medio HM, donde expresan ambos flagelos. Debido a una capacidad intrínseca de los flagelos para unirse al cubreobjetos o al portaobjetos, se puede observar las bacterias “amarradas” por sus flagelos (en inglés, *tethered cells*). De este modo, el giro del motor del flagelo “amarrado” hace girar al cuerpo celular, y se hace visible la dirección de giro del motor del flagelo. En nuestro caso, los mutantes nos permitieron determinar la dirección de giro de cada motor. Al observar LP 3004 se pudo apreciar que las bacterias giraban tanto en el sentido de las agujas del reloj (horario) como en el contrario (antihorario). Continuando con el análisis de LP 5843, que posee sólo el flagelo fino, observamos en 11 videos a 21 células que giraban únicamente en sentido horario, con lo cual este flagelo gira sólo en el sentido antihorario (nótese que el sentido de giro del cuerpo celular de una célula “amarrada” es inverso al del flagelo). Al observar la cepa LP 6865, que posee sólo el flagelo grueso, observamos, en 16 videos, a 18 bacterias que giraban en sentido antihorario y otras 18 que giraban en sentido horario, con lo cual el flagelo grueso puede girar en ambas direcciones. Estos datos también fueron mencionados por Kanbe *et al.* (2007), aunque no se presentaron evidencias en la publicación. También pudimos observar en los videos que aquellas bacterias que sólo tenían el flagelo grueso eran capaces de desplazarse en forma rectilínea una distancia mayor que las que únicamente tenían el flagelo fino. Estas últimas presentaron un movimiento más inestable, dando tumbos constantemente y no permitiendo el desplazamiento en forma recta. En base a esto, podríamos pensar que el flagelo grueso sería el responsable del *swimming*, pero este comportamiento no se observó en el medio semisólido, donde tanto uno como otro flagelo aportaron a la natación (ver siguiente sección), siendo el flagelo fino el más importante en este sentido en la cepa LP 3008 (Figura III.1). No obstante, ambos medios no son comparables, ya que en el líquido, al ser una mezcla homogénea, no existen gradientes, mientras que en medio con agar 0,3%, el crecimiento bacteriano va generando gradientes de sustancias quimioattractantes en su recorrido. Además, las células tomadas del cultivo líquido en batch representan un instante del desarrollo del cultivo, y se sabe que la expresión de los flagelos puede variar con la fase de crecimiento del cultivo (Amsler *et al.*, 1993; Niehus *et al.*, 2002; Tambalo *et al.*, 2010). En nuestro caso, hemos observado que las



**Figura V.4** Microscopías electrónicas de transmisión de *B. japonicum* LP 3004 (A), LP 6543 (B), LP 6865 (C) y LP 5843 (D). Flagelos desprendidos en la preparación de LP 3004 (E y F). Las flechas negras indican flagelos gruesos y las puntas de flecha flagelo fino. La flecha blanca indica la asociación de dos flagelos finos.

células tomadas en fase logarítmica o logarítmica tardía (cuya duración aproximada es de dos a tres días en el medio HM) expresaban las flagelinas y eran móviles, pero evidentemente este estado de crecimiento no es comparable al de una colonia en expansión mantenida durante más de 13 a 15 días en medio semisólido.

### V.3.3 Movilidad en medio de Götz semisólido

El ensayo en placas de Petri con medio de Götz agarizado al 0,3% p/v fue la herramienta que nos permitió seleccionar en el laboratorio la cepa con mayor movilidad,



LP 3008, a partir de la cual iniciamos los trabajos de esta Tesis. Por ello nos resultó interesante plantear ensayos de movilidad en este medio con la cepa salvaje LP 3004, con LP 3008 y con los mutantes obtenidos a partir de cada una de ellas. En este ensayo pudimos observar la natación de las bacterias como un desplazamiento pocos milímetros por debajo de la superficie del agar, dentro de la malla laxa formada por el agar semisólido, sometidas en todo momento a un gradiente quimiotáctico (Harshey, 1994). En el experimento que se describe a continuación se decidió emplear placas de Petri de 16 cm de diámetro a fin de poder observar en la misma placa las ocho cepas. Se cuantificó la movilidad a través de la medida del diámetro del halo de movilidad diariamente durante 13 días. Una vez transcurrido ese tiempo los halos vecinos empezaron a inhibirse entre sí. Según se puede ver en la Figura V.5, al analizar la cepa salvaje LP 3004 respecto de sus mutantes, la falta de una u otra flagelina alteró de igual manera la natación en la placa. De hecho, las curvas que vinculan el diámetro del halo con el tiempo se encuentran casi superpuestas. Sin embargo, cuando observamos el comportamiento de los mutantes derivados de la cepa más móvil LP 3008, pudimos apreciar que la delección de la flagelina de bajo peso molecular afectó el desplazamiento y se observó un comportamiento similar al de la cepa salvaje LP 3004, mientras que la delección de la flagelina de alto peso molecular provocó sólo una pequeña disminución de la movilidad (Figura V.5). Como era de esperarse, los mutantes desprovistos de ambas flagelinas no se desplazaron, y las colonias se ensancharon algo sólo debido a su crecimiento.

Analizando los resultados en LP 3004 se puede observar que ambos flagelos aportaron en igual medida a la natación, al menos en este medio. Este resultado fue sorprendente, ya que en observaciones previas en medio líquido vimos que la flagelina de bajo peso molecular era indetectable aún con técnicas muy sensibles como el Western blot y el flagelo fino estaba ausente, tal como lo indicaban las preparaciones observadas al microscopio electrónico de transmisión (Figura IV.6 y Figura III.5.A). De todos modos, no puede descartarse que en el medio semisólido haya un cierto nivel de expresión de la flagelina de bajo peso molecular, tal como se observó en las cajas con arena (Figura IV.6) o bien (no excluyente) que la falta del flagelo grueso induzca de alguna manera un aumento en la expresión del flagelo fino. Mientras tanto, en LP 3008 el flagelo fino, que se encuentra desreprimido en medio líquido, parece haber sido el que más aportó a la movilidad en estas condiciones. Analizando este comportamiento, encontramos un trabajo realizado en *E. coli* donde estudian movilidad de las bacterias en



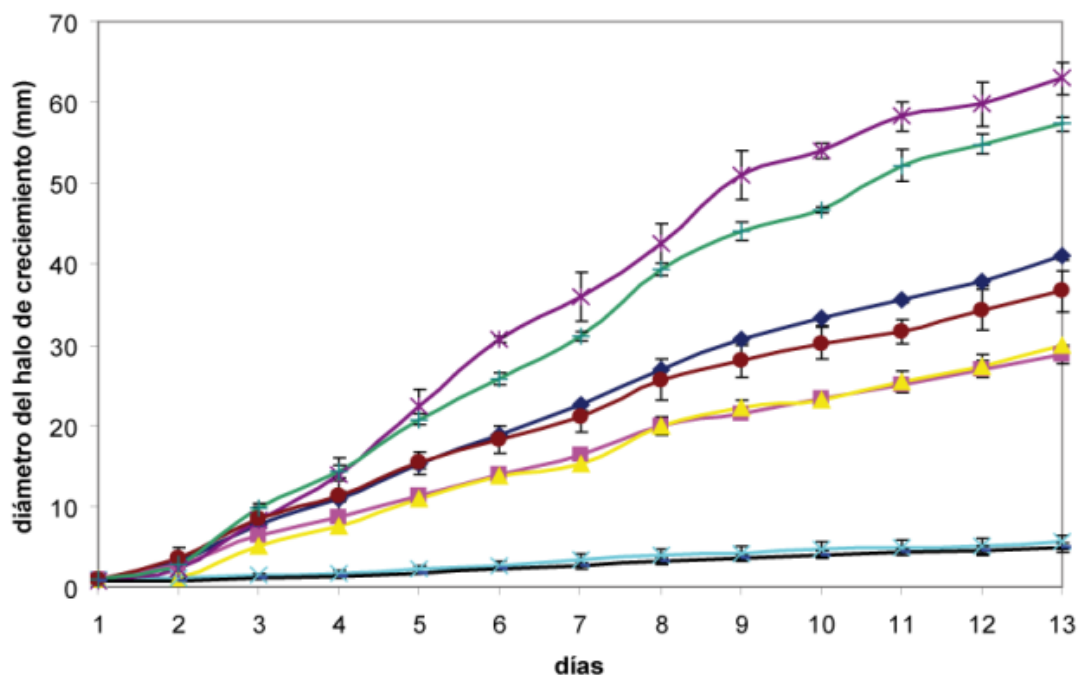


Figura V.5 Diámetros ( $\pm$  desvío estándar,  $n = 4$ ) de los halos de movilidad de *B. japonicum* a lo largo de 13 días de crecimiento en el medio de Götz semisólido. LP 3004 (azul), LP 6865 (rosa), LP 5843 (amarillo), LP 6543 (celeste), LP 3008 (violeta), LP 6866 (rojo), LP 5844 (verde) y LP 6644 (negro).

medio semisólido. En el mismo observaron que aquellas bacterias incapaces de dar tumbos quedan atrapadas en la malla del agar, mientras que las que logran reorientarse pueden avanzar más y formar halos de movilidad de mayor diámetro (Wolfe & Berg, 1989). Nuestros resultados de observaciones al microscopio óptico del mutante que sólo tiene flagelo fino (presenta movimientos inestables) junto con el comportamiento de LP 3008 en el Götz 0,3%, podrían ser explicados por medio de este fenómeno. Tomados en conjunto, estos resultados no permiten corroborar la hipótesis de que el flagelo grueso se utiliza para el *swimming* y el fino para el *swarming* como lo sugiere Kanbe (2007), sino que ambos estarían desempeñando un papel en el *swimming* en medio semisólido.

#### V.4 Discusión

Luego de analizar en capítulos previos el comportamiento de *B. japonicum* LP 3004 y LP 3008 enfocándonos en su movilidad, surgió la necesidad de evaluar los roles que podrían cumplir uno u otro flagelo en los eventos de colonización radical y competición para la nodulación. Para ello, se construyeron mutantes por delección de los genes de flagelinas en cada uno de los sistemas y pudimos verificar sus genotipos y fenotipos por medio de diferentes técnicas. Estos resultados fueron contundentes y estuvieron de

acuerdo a lo esperado. Posteriormente analizamos el perfil electroforético de preparaciones de flagelinas de los mutantes. Observamos que, mas allá de la presencia o ausencia de la flagelina correspondiente, no se detectaban otros polipéptidos que pudieran haber sido exportados por el sistema de secreción del flagelo, muy similar al sistema de secreción de tipo III (Blocker *et al.*, 2003; Konkel *et al.*, 2004; Troisfontaines & Cornelis, 2005). Ni aún en las dobles mutantes carentes de ambas flagelinas. En segundo lugar, nosotros hemos comprobado que las flagelinas que se expresaban eran las codificadas por los genes *bll6865-bll6866* y *bll5843-bll5844-bll5845-bll5846* sin embargo, existe en el genoma otro gen anotado como *flaA* (*blr3695*), que también podría ser una probable flagelina. Al alinear su secuencia aminoacídica contra otros genomas bacterianos, resulta en un 89% de identidad con FliC de *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 o TIE-1 y en un 86% y 84% con genes de *Bradyrhizobium* sp. TAIL y *Bradyrhizobium* sp. ORS278, respectivamente. En ambos casos, también existe conservación en el entorno genómico. Asimismo, la hipotética FlaA presenta una identidad del 25% y 24% con las flagelinas FliCI-II y FliCI234 de *B. japonicum* USDA 110, respectivamente. Si bien nunca detectamos la expresión de dicha proteína, existiría la posibilidad de que este pseudogen se vuelva funcional al mutar los otros, lo cual no ha sido observado en nuestros experimentos, ya que las dobles mutantes en *fliCI-II* y *fliCI234* estaban desprovistas de flagelina, de flagelos y no eran móviles.

Por último, las placas de movilidad en las cuales pudimos seguir la expansión de los halos de *swimming* durante 13 días, tanto en cepas salvajes como mutantes, nos permitieron deducir que en este medio *B. japonicum* utilizaba ambos flagelos para desplazarse. Esto puede observarse de manera clara al comparar los diámetros casi iguales de las mutantes LP 5843 (no tiene flagelo grueso) y LP 6865 (no tiene flagelo fino). También se pudo ver que en la cepa LP 3008 el mayor aporte en este medio estaba dado por el flagelo fino. Al comparar los mutantes de cada una de las cepas, indistintamente del flagelo mutado, siempre el mutante de LP 3008 poseyó una mayor movilidad respecto a la misma mutante en el acervo de LP 3004. Este hecho confirma nuestra hipótesis planteada en el Capítulo III, donde se deduce que el fenotipo de LP 3008 no es consecuencia únicamente de la desrepresión del flagelo fino, sino también de otros factores, como por ejemplo la quimiotaxis.

Finalmente, analizando los halos de movilidad de los mutantes y las observaciones realizadas en el microscopio óptico, no podríamos proponer una única función para

cada uno de los flagelos en el *swimming* o el *swarming*. Además, no podemos hacer extrapolaciones a lo que sucede en el hábitat natural de las bacterias, el suelo, donde pueden existir tanto superficies sólidas como canales acuosos donde los rizobios pueden moverse, y podrían además, existir varios gradientes desconocidos.

Por ello nos propusimos realizar ensayos de competición para la colonización rizosférica y la nodulación en macetas, semejando un poco mejor las condiciones del suelo y allí evaluar el comportamiento de las mutantes en competencia con las cepas salvajes. En el siguiente capítulo se presentan los estudios realizados con estos mutantes en los ensayos de plantas con el fin de entender el posible rol de cada flagelo en el establecimiento de la interacción simbiótica.

# Capítulo VI

Competitividad de mutantes de  
*B. japonicum* defectivos en flagelos  
para la colonización rizosférica y  
la nodulación

## VI.1 Introducción

El ciclo anual de *B. japonicum* comprende la colonización de la rizósfera de soja, la infección de las raíces, la nodulación, la maduración y senescencia de los nódulos y finalmente la liberación de los rizobios de los nódulos y su persistencia en el suelo hasta iniciar un nuevo ciclo de infección radical. Teniendo en cuenta que entre la germinación y el llenado del grano de un cultivo de soja transcurren de cuatro a cinco meses, que es el periodo aproximado entre el inicio de la infección radical y la senescencia de los nódulos, se concluye que más del 60% del ciclo de vida anual de los rizobios transcurre en el estado de vida libre en el suelo. Se han realizado muchos estudios acerca de las etapas tempranas del proceso de simbiosis hasta la diferenciación de las bacterias a bacteroides, pero poco se conoce acerca de las etapas de vida libre previas a que se establezca la interacción. Allí, las variables que pueden influir sobre la fisiología de estas bacterias son muchas, dependiendo del tipo de suelo, de sus características físicoquímicas, de la presencia de raíces y de la gran diversidad de microorganismos, hongos y animales que habitan el suelo. La rizósfera es un medio rico en compuestos carbonados, pero el suelo circundante es en general un medio hostil, donde los nutrientes escasean y las condiciones pueden ser muy variables. Es posible que los microorganismos en el suelo se encuentren formando biopelículas como una estrategia de supervivencia, ya sea sobre las raíces o sobre superficies inertes (Danhorn & Fuqua, 2007; Rudrappa *et al.*, 2008); o bien en estado planctónico. En este estado las bacterias son capaces de moverse y ello les permitiría explorar y colonizar nuevos nichos. Por lo tanto, se cree que las bacterias del suelo varían entre estos dos estados: permanecerían en las biopelículas hasta que el crecimiento de las mismas no permita la adecuada captación de nutrientes y el descarte de desechos metabólicos, momento en el cual algunas bacterias se diferenciarían al estado planctónico para actuar como propágulos en la dispersión de la colonia para formar nuevas biopelículas en otro lado (Stoodley *et al.*, 2002). Considerando además que la movilidad de las bacterias en el suelo es escasa (Horiuchi *et al.*, 2005; Madsen & Alexander, 1982; McDermott & Graham, 1989) estos desplazamientos estarían restringidos a cortos períodos de saturación de agua en el suelo (por ejemplo, durante una lluvia o riego, antes de que se pierda el agua gravitacional).

Como se mencionó en el Capítulo I, existe una controversia respecto del rol de la quimiotaxis y la movilidad en la infección temprana y la competición para la

nodulación. Varios autores sostienen que tanto la movilidad como la quimiotaxis hacia los exudados radicales tienen lugar en el suelo y condicionan la infectividad y la competitividad para nodular (Fujishige *et al.*, 2006; Gonzalez & Marketon, 2003; Miller *et al.*, 2007; Yost *et al.*, 2003). Mientras tanto, otros autores señalan que los experimentos en los que se basó esta idea se realizaron en medios líquidos o bien en medios porosos saturados de agua, pero que en el suelo a capacidad de campo la situación es diferente, por cuanto la movilidad y la quimiotaxis están muy reducidas (Horiuchi *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 1989; López-García *et al.*, 2002; Madsen & Alexander, 1982; McDermott & Graham, 1989; Patrick & Lowther, 1993). Si bien en nuestro laboratorio también observamos una reducida movilidad de los rizobios en vermiculita a capacidad de campo (López García *et al.*, 2002), nuestros ensayos a campo indicaron que una cepa de movilidad aumentada es más competitiva para nodular (véase Capítulo IV y también López García *et al.*, 2009). Por lo tanto, la situación real seguramente se encuentra en algún punto medio entre estos dos extremos y resulta de gran importancia establecer cuál es ese punto.

Uno de los objetivos principales de esta Tesis fue contribuir a la mejora de la competición para la nodulación, con la esperanza de que esta mejora se traslade a aumentos del rendimiento de los cultivos a campo, evitando el empobrecimiento en N del suelo. En este camino obtuvimos resultados interesantes a campo con las cepas de movilidad aumentada. Dado que la movilidad aumentada en LP 3008 correlacionó con una desrepresión de la expresión del flagelo fino, nos propusimos analizar si la competición para la colonización radical y la nodulación puede estar relacionada con este flagelo o bien con el flagelo grueso, mediante el empleo de las cepas mutantes obtenidas en esta Tesis. Asimismo, planteamos explorar la influencia del estado hídrico del sustrato realizando experimentos con diferentes contenidos de agua.

## VI.2 Colonización radical<sup>1</sup>

Trabajos realizados en *P. fluorescens* demuestran que bacterias más móviles son capaces de colonizar mejor las raíces de alfalfa en ensayos realizados en jarras de Leonard (Martinez-Granero *et al.*, 2006) y también que los flagelos y la quimiotaxis son necesarios en la competición entre dos cepas para la colonización radical (de Weert *et*

---

<sup>1</sup> Realizado en la Universidad Autónoma de Madrid (España) bajo la dirección de los Dres. Rafael Rivilla y Marta Martín por convenio en el marco de la Red BIOFAG-CYTED

*al.*, 2002). Estos resultados contradicen nuestras observaciones de que los rizobios poseen escasa movilidad vertical en vermiculita a capacidad de campo (López García *et al.*, 2002) y que la cepa LP 3008 colonizó menos que la salvaje los tercios medio y apical de la raíz en estas mismas condiciones (Capítulo IV). Dado que se trata de dos sistemas experimentales diferentes, realizamos una estadía corta en el grupo del Dr. Rivilla con el objeto de repetir los experimentos de colonización radical empleando el sistema descrito por Martínez Granero *et al.* (2006) y comparar los resultados obtenidos en ambos sistemas experimentales. El sistema de las jarras de Leonard (o macetas Riviera) emplea perlita como sustrato y el riego es de abajo hacia arriba por capilaridad, a diferencia de nuestro sistema, que consta de macetas con vermiculita como sustrato y riego por la parte superior controlado por el operador. Así, en el sistema de jarras de Leonard la movilidad de las bacterias no se encontraría perturbada por una dispersión de las mismas en el sustrato causada por el riego externo. Para poder realizar los experimentos con nuestro par simbiótico se modificó el protocolo de Martínez Granero *et al.* (2006), adaptando el sistema de alfalfa a soja y los tiempos de *P. fluorescens* a *B. japonicum*. Se colocaron cuatro plantas por maceta con tres macetas por tratamiento. Los inóculos bacterianos se cultivaron en el medio de Götz hasta fase de crecimiento exponencial y fueron diluidos en FMS a fin de inocular cada plántula con  $1 \times 10^8$  UFC de cada cepa. Los inóculos consistieron en mezclas de la cepa salvaje LP 3004 y cada uno de los mutantes en proporción 1:1, de la siguiente manera: LP 3004 vs LP 6865 (tiene flagelo grueso), LP 3004 vs LP 5843 (tiene flagelo fino) y LP 3004 vs LP 6543 (no tiene flagelos). Luego de tres semanas en condiciones adecuadas de luz, temperatura y manteniendo el reservorio de riego con FMS, se recuperaron las bacterias que

**Tabla VI. 1** Colonización de la cepa salvaje LP 3004 y cada uno de sus mutantes: LP 6865 (tiene sólo flagelo grueso), LP 5843 (tiene sólo flagelo fino) y LP 6543 (no tiene flagelos).

Competición (UFC inoculadas)	Log bacterias totales /g de raíz*	
	salvaje	mutante
LP 3004 ( $9.2 \times 10^7$ ) vs LP 6865 ( $9.1 \times 10^7$ )	7.77 ± 0.61	8.10 ± 0.55
LP 3004 ( $4.6 \times 10^7$ ) vs LP 5843 ( $7.7 \times 10^7$ )	8.66 ± 0.16	6.96 ± 0.23
LP 3004 ( $4.7 \times 10^7$ ) vs LP 6543 ( $6.6 \times 10^7$ )	8.84 ± 0.10	7.47 ± 0.27

\* Medias de tres macetas ± desvío estándar.

colonizaban el centímetro apical de la raíz primaria de cada planta y de las secundarias. Los datos se agruparon por macetas y se calculó el número de bacterias totales por gramo de raíz. (Tabla VI.1). Los resultados indican que la pérdida del flagelo grueso o de ambos afectó la capacidad de *B. japonicum* para colonizar los ápices radicales, pero no así la pérdida del flagelo fino, con lo cual el flagelo grueso sería el único necesario para la colonización cuando los rizobios se inoculan sobre la semilla.

Este ensayo nos sirvió para analizar la función de cada uno de los flagelos en la colonización radical, sin afectar el proceso con el riego. Así, observamos que la falta del flagelo fino no mermó la capacidad competitiva de los rizobios, al contrario de lo que ocurrió con los mutantes que carecían del flagelo grueso o de ambos. Dado que en otros experimentos J.M. Covelli observó en nuestro laboratorio que el flagelo fino sería el más requerido para el *swarming*, podemos concluir que este tipo de movimiento no influyó sobre la competitividad para colonizar la rizósfera en estas condiciones.

Comparando este sistema con el nuestro, donde empleamos macetas con vermiculita regadas por la parte superior y mantenidas a capacidad de campo, notamos que las plantas y los rizobios dispusieron de mayor cantidad de agua, la que les fue proporcionada por capilaridad desde un reservorio inferior en el que se encontraba siempre disponible. De hecho, al desarmar las macetas para procesar las muestras, observamos que la perlita estaba muy húmeda, particularmente en la zona del fondo de la maceta, a diferencia de lo que ocurre en las macetas con vermiculita mantenida a capacidad de campo. Además, debe tenerse presente que los resultados de este experimento representan una colonización tardía de la raíz, ya que se obtuvieron luego de 20 días de incubación, cuando ya habían aparecido los primeros nódulos.

### VI.3 Competición para la nodulación

En este tipo de ensayos posicionamos a las bacterias en la vermiculita. Para ello los inóculos bacterianos crecidos hasta fase exponencial temprana en el medio de Götz se diluyeron hasta  $1 \times 10^6$  UFC  $\text{ml}^{-1}$  en FMS y con esta suspensión se regó las macetas que contenían vermiculita seca. Luego se permitió drenar el agua gravitacional hasta llegar a la capacidad de campo. A continuación se colocó una plántula de soja de 3-4 días por maceta, se tapó con un film transparente para evitar la evaporación de agua y se mantuvo por tres semanas en invernáculo. Para regar y permitir el crecimiento de la planta se realizaron orificios en el film, y la frecuencia de riego fue cada 3 o 4 días,



dependiendo del agua consumida. Las competencias planeadas fueron de nuevo la cepa LP 3004 frente a cada una de sus mutantes derivadas, LP 6865, LP 5843 y LP 6543 e incluimos en este caso la cepa LP 3008, también enfrentada a cada una de sus mutantes, LP 6866, LP 5844 y LP 6644. Luego de tres semanas de cultivo en el invernadero se recogieron las plantas, se sacaron los nódulos y se esterilizaron superficialmente. Para ver qué cepa ocupaba cada nódulo se homogeneizó a cada uno en forma individual con palillos estériles y los rizobios liberados en el homogenado se repicaron en cajas de Petri réplicas conteniendo antibióticos selectivos para las cepas ensayadas. Luego realizamos un análisis de  $\chi^2$  con dos hipótesis nulas alternativas. Según la primera, supusimos que un 20% de los nódulos estaban ocupados simultáneamente por rizobios salvajes y mutantes (doble ocupación). En este caso, la hipótesis nula prevé que el 60% de los nódulos van a llevar la marca selectiva del mutante (es decir 40% ocupados sólo por el mutante y 20% con doble ocupación) y el restante 40% de los nódulos van a llevar la marca de la cepa salvaje (que es compartida por el mutante) pero van a ser sensibles a la marca del mutante. Según la segunda hipótesis nula, supusimos que sólo el 10% de los nódulos presentaban doble ocupación. Haciendo el mismo razonamiento, previmos que si éste es el caso la hipótesis nula debe arrojar un 55% de nódulos con la marca del mutante y un 45% con la marca del salvaje. Los porcentajes de ocupación observados se muestran en la Tabla VI.2. Los resultados hallados indican que la capacidad competitiva de las cepas que no tienen flagelo fino (LP 6865 y LP 6866) no se vio afectada e incluso pudieron haber competido mejor, de acuerdo al porcentaje de doble ocupación que se estime. Contrariamente, las cepas que carecen de flagelo grueso (LP 5843 y LP 5844) resultaron menos competitivas que sus respectivas cepas salvajes. Por su parte, la mutante sin flagelos de LP 3004 (LP 6543) compitió menos que su cepa parental, mientras que en la mutante sin flagelos de LP 3008 (LP 6644) compitió igual que LP 3008. En coincidencia con el ensayo de la colonización radical en jarras de Leonard, el flagelo grueso de *B. japonicum* resultó necesario para la competición para la nodulación en vermiculita a capacidad de campo, observándose una menor ocupación de los nódulos por parte de los mutantes que carecían del mismo.

Los resultados precedentes indicaron una tendencia de algunos de los mutantes alterados en la movilidad a verse disminuidos en la competitividad para nodular. Sin embargo, ni aún los mutantes carentes de flagelos fueron desplazados completamente por la cepa parental, alcanzando alrededor de un 40-50% de ocupación de los nódulos, lo cual nuevamente señala una baja movilidad de la cepa salvaje en vermiculita a

Tabla VI.2 Competición para la nodulación en macetas con las cepas salvajes LP 3004 y LP 3008 y cada una de sus mutantes. LP 6865 y LP 6866 (tiene sólo flagelo grueso); LP 5843 y LP 5844 (tienen sólo flagelo fino); y LP 5443 y LP 5844 (no tienen flagelos).

Competición	Inóculos (10 <sup>6</sup> UFC ml <sup>-1</sup> )		Nódulos ocupados por salvaje : mutante <sup>a</sup> (%)	-log <sub>10</sub> (p) <sup>b</sup>	
	salvaje	mutante		χ <sup>2</sup> 40%:60%	χ <sup>2</sup> 45%:55%
LP 3004/LP 6865	3.55	3.72	28.9 : 71.1	1.30	2.70
LP 3008/LP 6866	2.00	2.02	34.3 : 65.7	1.30	>3
LP 3004/LP 5843	3.55	3.15	52.4 : 47.6	2.30	0.70
LP 3008/LP 5844	2.00	7.15	53.7 : 46.3	>3	2.00
LP 3004/LP 6543	3.55	3.68	49.4 : 50.6	>3	2.00
LP 3008/LP 6644	2.00	2.80	44.3 : 55.7	1.00	0.70

<sup>a</sup> el porcentaje ocupado por la mutante puede incluir la doble ocupación generada cuando ambas cepas ocupan el nódulo. Por ello se suponen las hipótesis nulas de 20 y 10% de doble ocupación.

<sup>b</sup> p es la mínima probabilidad de error de rechazar la hipótesis nula si es verdadera, obtenida por comparación del valor de χ<sup>2</sup> calculado con los valores de χ<sup>2</sup> tabulados para los distintos valores críticos de p. El valor -log<sub>10</sub>(p) = 1.30 corresponde a p = 0.05; valores más altos indican diferencias estadísticamente significativas.

capacidad de campo. Para ver cuál es la influencia del contenido hídrico de la vermiculita sobre la competición para la nodulación decidimos repetir el ensayo con diferentes niveles de riego.

Debido a la complejidad y al número de plantas, decidimos llevar a cabo el experimento sólo con LP 3004 (salvaje) y LP 6543 (mutante sin flagelos), en tres condiciones: macetas con riego normal (cada 3-4 días), o con riego al doble de frecuencia que el normal (día por medio), o inundadas.

La condición inundada se mantuvo de manera sencilla sin agujerear la base de la maceta, al contrario de como lo hacemos comúnmente para drenar el exceso de agua. Para las condiciones de riego normal y doble, las macetas se agujerearon en el fondo como habitualmente. El día 0 se regaron con el FMS conteniendo LP 3004 y LP 6543 hasta capacidad de campo. Luego se colocaron las plántulas y se taparon de la misma manera que antes. En cada riego pesamos las macetas dos veces: una inmediatamente antes y otra un tiempo suficiente después del riego como para permitir que toda el agua gravitacional haya abandonado la maceta y se haya alcanzado el 100% de la capacidad de campo. De esta manera, calculamos el agua retenida en cada maceta a lo largo del tiempo referida al momento inmediato antes del riego, independientemente del peso de

la planta, y lo expresamos como porcentaje de la capacidad de campo (Figura VI.1). Luego de tres semanas se retiraron las plantas y se procesaron los nódulos como en el experimento anterior.

Cuando obtuvimos los datos de ocupación de nódulos pudimos observar que cuanto mayor fue el contenido de agua en las macetas, más nódulos ocupaba la cepa salvaje. En la condición de riego normal los datos no se desviaron de la hipótesis nula, compitiendo ambas cepas de forma similar, mientras que a medida que aumentaba el contenido de agua de las macetas la ocupación de nódulos por parte de la mutante fue decayendo hasta verse casi completamente desplazada en la condición inundada, donde la cepa salvaje por sí sola ocupó más del 80% de los nódulos (Tabla VI.3). En este experimento pudimos comprobar que el efecto de las mutaciones en los flagelos tiene un componente que depende del agua disponible en las macetas, además del rol que cada uno de ellos pueda cumplir en la movilidad, la colonización y la infección de la raíz.

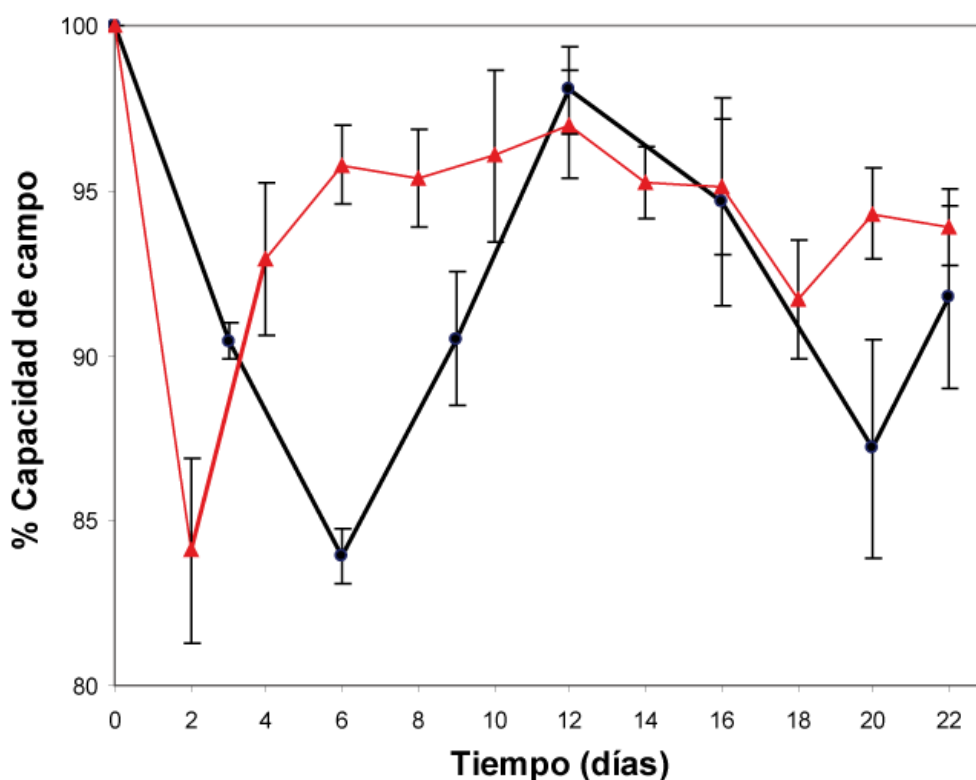


Figura VI.1 Cantidad de agua retenida en las macetas como % de la capacidad de campo  $\pm$  desvío estándar ( $n = 15$ ) en dos condiciones de riego: normal (círculos negros) y con doble frecuencia (triángulos rojos). Las determinaciones se realizaron inmediatamente antes de cada riego.

Tabla VI.3 Competición en macetas de la cepa salvaje LP 3004 y LP 6543 (sin flagelos) en diferentes condiciones de riego.

Riego	Inóculo (10 <sup>6</sup> UFC ml <sup>-1</sup> )		Nódulos ocupados por salvaje : mutante <sup>a</sup> (%)	-log <sub>10</sub> (p) <sup>b</sup>	
	LP 3004	LP 6543		χ <sup>2</sup> 40%:60%	χ <sup>2</sup> 45%:55%
Normal	12.0	2.5	46.9 : 53.1	0.50	0.30
Doble	12.0	2.5	55.7 : 44.3	>3	1.30
Inundada	12.0	2.5	83.7 : 16.3	>3	>3

<sup>a</sup> el porcentaje ocupado por la mutante puede incluir la doble ocupación generada cuando ambas cepas ocupan el nódulo. Por ello se suponen las hipótesis nulas de 20 y 10% de doble ocupación.

<sup>b</sup> *p* es la mínima probabilidad de error de rechazar la hipótesis nula si es verdadera, obtenida por comparación del valor de χ<sup>2</sup> calculado con los valores de χ<sup>2</sup> tabulados para los distintos valores críticos de *p*. El valor -log<sub>10</sub>(*p*) = 1.30 corresponde a *p* = 0.05; valores más altos indican diferencias estadísticamente significativas.

#### VI.4 Discusión

En este capítulo logramos apreciar el desplazamiento de las bacterias sobre la raíz en un medio poroso, empleando el sistema de las jarras de Leonard con perlita como sustrato. Vimos que en estas condiciones las bacterias se pueden desplazar por la raíz, quizás gracias a los canales de agua generados en el medio poroso donde el agua sube por capilaridad desde un reservorio situado en la parte inferior. Es probable que las partículas de perlita adheridas a la superficie de la raíz impidan o limiten en parte el movimiento, pero a pesar de ello, los rizobios pudieron llegar a la zona apical de la raíz luego de tres semanas. Analizando estos resultados podemos hipotetizar que el flagelo grueso de *B. japonicum* es el que realiza el mayor aporte a la colonización radical. De acuerdo a resultados de nuestro laboratorio (Althabegoiti *et al.*, enviado), ambos flagelos contribuirían a la natación pero el flagelo fino sería el que más contribuye al movimiento del *swarming*. Por lo tanto, el resultado de los ensayos de competición en jarras de Leonard indica que el movimiento de *swarming* no sería importante para la colonización de la superficie radical. La mayor contribución del movimiento de *swimming* podría estar relacionada con un cierto nivel de hidratación de la capa de mucigel sobre las raíces, lo que permitiría a las bacterias desplazarse de forma similar a como lo observamos en las cajas con agar blando.

En los ensayos de competición para la nodulación en macetas conteniendo vermiculita, en los cuales los rizobios fueron distribuidos en el sustrato, pudimos

detectar una leve disminución en la competitividad sólo en los mutantes que no tienen flagelos o que no tienen flagelo grueso, mientras que los mutantes desprovistos de flagelo fino no se vieron afectados. De este modo puede asignarse nuevamente una función preponderante al flagelo grueso, aunque en una condición diferente. Además, pudimos evidenciar que sólo en condiciones de saturación de agua el rol de los flagelos en la competición para la nodulación se manifestaba en un desplazamiento casi total de la cepa no móvil. Tomados en conjunto, estos resultados confirman la idea de que la movilidad en medios porosos a capacidad de campo es muy limitada y no tendría una influencia decisiva sobre la competitividad para colonizar la raíz y nodular. Los efectos observados por nuestro laboratorio en ensayos a campo (Althabegoiti *et al.*, 2008; López García *et al.*, 2009) reflejarían entonces la capacidad de los rizobios para desplazarse en periodos de saturación de agua, por ejemplo luego de las lluvias que pudieran ocurrir a la siembra. Por lo tanto, resulta importante utilizar un método de aplicación del inoculante que aproveche estos momentos en los cuales la mayor movilidad de las cepas mejoradas puede dar una diferencia de competitividad.

# Capítulo VII

## Discusión General

## VII Discusión

El cultivo de soja posee una gran demanda de varios nutrientes, especialmente N. Un 2,5 % p/p del grano de soja es N, el cual puede ser tomado del suelo o por fijación del N<sub>2</sub> atmosférico en la asociación simbiótica con *B. japonicum*. Por lo tanto, cualquier factor que afecte la capacidad de fijar N<sub>2</sub> implica un mayor consumo del N del suelo. Entre estos factores se encuentra la competencia que las poblaciones de rizobios residentes en el suelo pueden establecer con el inoculante para la ocupación de los nódulos en las raíces. Por esto, uno de nuestros principales objetivos fue contribuir al conocimiento de aspectos determinantes de la competitividad para nodular y con ello a la mejora de la asociación *B. japonicum*-soja. Dado que la movilidad de *B. japonicum* había sido reconocida previamente como un factor limitante en relación con la competencia para la nodulación por López García *et al.* (2002), procedimos a su estudio y mejoramiento. En las investigaciones previas acerca del rol de la movilidad en la interacción rizobio-leguminosa se habían estudiado y evaluado principalmente cepas defectivas en movilidad. Dado que nuestro interés era mejorar la competitividad a través de la movilidad, ejecutamos un protocolo para obtener mutantes con movilidad aumentada. Obtuvimos una cepa de mayor movilidad a la que llamamos *B. japonicum* LP 3008, la cual fue seleccionada sin emplear técnicas de ADN recombinante y mediante un método sencillo y reproducible. Obtuvimos a un fenotipo estable y robusto luego del pasaje por nódulos y su repique y conservación a -80 °C por más de seis años desde su obtención hasta la actualidad. Así, LP 3008 pudo utilizarse en ensayos a campo sin el riesgo asociado al empleo de microorganismos manipulados genéticamente. En estos ensayos LP 3008 resultó más competitiva para nodular que la cepa normalmente utilizada en los inoculantes, en presencia de una población residente de rizobios noduladores de soja de alrededor de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> rizobios g de suelo<sup>-1</sup>. Además, el aumento en la ocupación de los nódulos se reflejó en aumentos de rendimiento en grano (Althabegoiti *et al.*, 2008; López-García *et al.*, 2009). Estos resultados nos estimularon a realizar estudios más profundos de la cepa LP 3008.

La caracterización fisiológica y molecular de LP 3008 abrió nuevos caminos ya que nos permitió encontrar que *B. japonicum* tiene dos sistemas de flagelos, uno fino constituido por flagelinas de 37 kDa y otro grueso constituido por flagelinas de 65 kDa. Una de las características más visibles de LP 3008 es que en el medio líquido de Götz la

expresión del flagelo fino está desreprimida, mientras que para la cepa salvaje LP 3004 nunca se pudo evidenciar la presencia de este flagelo en dichas condiciones, aún empleando una técnica tan sensible como el Western blot. Sin embargo, en el medio líquido de Götz la cepa LP 3004 expresó el ARNm de los genes que codifican las flagelinas de 37 kDa, aunque en menor cantidad que LP 3008. Se sabe que la síntesis de flagelinas está controlada tanto a nivel transcripcional como traduccional (Chilcott & Hughes, 2000). En un intento por encontrar las modificaciones genéticas que presenta esta cepa secuenciamos los genes que codifican las flagelinas de bajo peso molecular, incluyendo más de 100 pares de bases corriente arriba de las zonas codificantes pero dichas secuencias resultaron idénticas a la cepa parental, tanto considerando posibles promotores como sitios de unión de ribosomas. Por lo tanto, hasta el momento desconocemos las modificaciones genéticas que tiene LP 3008. Un aspecto interesante encontrado en su caracterización fisiológica es que, además de ser más móvil que la cepa parental LP 3004, es más quimiotáctica, razón por la cual en el laboratorio se han iniciado estudios del sistema quimiotáctico de *B. japonicum*. Alternativamente, podría pensarse que LP 3008 presenta alteraciones en su metabolismo que finalmente conduzcan a este fenotipo. Si bien observamos que ni la velocidad de crecimiento ni la supervivencia en fase estacionaria se vieron afectadas en LP 3008, es factible que otros aspectos más relacionados con la eficiencia energética puedan encontrarse modificados. De hecho, la expresión y síntesis de los flagelos requiere un 2% de la energía celular y si tenemos en cuenta que LP 3008 crece igual que LP 3004 en medio mínimo debiendo sintetizar un flagelo adicional, es esperable que al menos sea más eficiente energéticamente.

Con estos resultados nos resultó atractivo evaluar el rol de cada uno de los flagelos en la competición para la nodulación. Para este segundo objetivo de la Tesis construimos mutantes por delección de los genes de flagelinas, tanto en el acervo de LP 3004 como en el de LP 3008. En primera instancia, realizamos ensayos *in vitro* a fin de evaluar si podíamos asignar a cada uno de los flagelos las funciones de *swimming* o *swarming* (los experimentos de *swarming* fueron realizados por J. M. Covelli). Encontramos que dependiendo de la condición, ambos flagelos aportaron a uno u otro movimiento, pero el flagelo grueso participaba más en el *swimming* y el fino en el *swarming*. En los ensayos con plantas estudiamos estos mutantes en sus capacidades de competir para la colonización radical y para la nodulación frente a la respectiva cepa parental. En ambos casos, las bacterias que carecían del flagelo fino no se vieron



afectadas en la interacción con la planta; más aún: en la nodulación parecieron estar favorecidas. Mientras tanto, aquellas mutantes que carecían del flagelo grueso estaban afectadas en su competición para la colonización radical y para la nodulación. Parece entonces que de acuerdo a los movimientos hipotetizados para cada uno de los flagelos, en estos experimentos el *swarming* sobre la raíz o el sustrato no jugó un papel relevante. Siendo que éste es el tipo de desplazamiento que se supone que ocurre preferencialmente sobre superficies sólidas, parecería que podría cumplir algún otro rol. En un análisis de la formación de biopelículas en *B. japonicum*, Pérez Giménez *et al.* dedujeron que estas estructuras podrían estar más relacionadas con la supervivencia en el suelo (entre ciclos de nodulación) que en el proceso simbiótico. Dado que se ha considerado al *swarming* como un biofilm en expansión (Braeken *et al.*, 2008; Daniels *et al.*, 2004), estas conclusiones podrían aplicarse también al *swarming*. Por otro lado, debe recordarse que las raíces se encuentran a menudo recubiertas de una capa de polímeros muy higroscópica llamada mucigel (Watt *et al.*, 2006) que por sus características podría perturbar el *swarming* y favorecer el *swimming* (en forma similar a como lo observamos en cajas de Petri con medio agarizado al 0,3 %) cuando se encuentre bien hidratada. En este sentido es interesante remarcar que la influencia de los flagelos sobre la competición para la nodulación se observó cuando el medio de enraizamiento se encontraba inundado pero no cuando se encontraba a capacidad de campo.

Como consecuencia de los resultados de los ensayos de competición, pensamos que, además de la movilidad, el flagelo fino puede tener otras actividades. Es sabido que los flagelos bacterianos pueden ser percibidos como patrones moleculares asociados a patógenos en plantas (Felix *et al.*, 1999). En particular el reconocimiento es a través de 22 aminoácidos que constituyen el epítipo flg22 conservado en la mayoría de las flagelinas bacterianas. Sin embargo esta secuencia no se encuentra en ninguna de las flagelinas de *B. japonicum* ni en las flagelinas de rizobios en general (Gomez-Gomez *et al.*, 1999). De todos modos, recientemente se iniciaron estudios acerca del comportamiento de los mutantes en las flagelinas en relación con las respuestas de defensa en soja. Resultados preliminares de experimentos realizados por Nacira Muñoz en el INTA-Córdoba indicaron que los mutantes que carecían de flagelo fino generaron menos ROS en la planta que la cepa salvaje y las mutantes en las otras flagelinas, en concordancia con el patrón hallado para la competitividad.

Otro rol asociado a los flagelos es su actividad como adhesinas, si bien existen resultados contradictorios en cuanto a si los flagelos de los rizobios cumplirían este papel (Caetano-Anolles *et al.*, 1988; Croess *et al.*, 1993; Smit *et al.*, 1989). Nosotros hemos observado que la cepa LP 3008 tenía una mayor adhesividad que LP 3004, aunque no hemos realizado competencias con preparaciones puras de flagelina para determinar si la mayor adhesividad se debía a esta molécula. Si este es el caso, podría en parte explicar la mayor infectividad de LP 3008.

En términos generales los resultados obtenidos en laboratorio y a campo parecen apuntar en dos direcciones. Mientras que en laboratorio la cepa LP 3008 no fue más competitiva que LP 3004 (Althabegoiti, 2004) y las cepas carentes del flagelo fino tampoco se vieron afectadas en su competitividad, en repetidos ensayos a campo en diversos suelos la cepa LP 3008 fue consistentemente más competitiva. Sin embargo, es difícil comparar ambos tipos de experimentos. En primer lugar, los ensayos a campo se realizaron dejando actuar toda la variabilidad del ambiente natural y precisamente, la obtención de resultados reproducibles en esas condiciones, habla de la robustez del efecto de la cepa LP 3008 pero oscurece la comparación con los experimentos realizados en condiciones controladas de laboratorio. En segundo lugar, el inoculante utilizado en los ensayos a campo fue preparado por una industria con un medio muy rico y el agregado de aditivos para luego ser almacenado por algunos días antes de su empleo, a diferencia de los rizobios empleados en el laboratorio, los cuales fueron inoculados inmediatamente después de ser diluidos de un cultivo en medio mínimo en fase exponencial. Dado que observamos diferencias en la expresión del flagelo fino inducidas por la fuente de C del medio, no sería sorprendente que la expresión de los flagelos y en general, de factores asociados a la interacción con soja, haya sido muy diferente en ambos casos. En tercer lugar, no debemos perder de vista que la cepa LP 3008 fue seleccionada por su mayor movilidad y puede haber adquirido una serie de alteraciones estables en su ADN que desconocemos, siendo la sobreexpresión de su flagelo fino más bien una consecuencia de estas modificaciones (por ejemplo la quimiotaxis constituye una de estas modificaciones que pudimos percibir). Por el contrario, las cepas utilizadas en los ensayos de laboratorio poseían mutaciones dirigidas que sólo alteraron las flagelinas que se deseaba estudiar.

En conclusión, hemos logrado obtener una cepa más móvil con buen comportamiento a campo y hemos obtenido evidencias de que el rol de los flagelos en la competitividad para colonizar las raíces y nodular estaría dado a través del *swimming*,

siempre y cuando el contenido hídrico del sustrato de enraizamiento sea muy alto. Nuestros experimentos fueron realizados aproximándonos lo más posible a las condiciones naturales, pero aún así, seguramente difieren mucho de las mismas. Debemos recordar que nuestras interpretaciones no son más que una abstracción que intenta entender lo que sucede en la naturaleza.

*“La naturaleza no nos engaña jamás, somos  
nosotros los que nos engañamos siempre”  
Jean-Jacques Rousseau*

# Capítulo VIII

Bibliografía

## VIII Bibliografía

- Adler, J. (1973). A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* **74**, 77-91.
- Aguilar, M. M., Ashby, A. M., Richards, J. M., Loake, G. J., Watson, M. D. & Shaw, C. H. (1988). Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes *Journal of General Microbiology* **134**, 2741-2746.
- Aizawa, S. I. (2001). Bacterial flagella and type III secretion systems. *FEMS Microbiol Lett* **202**, 157-164.
- Albareda, M., Dardanelli, M. S., Sousa, C., Megias, M., Temprano, F. & Rodriguez-Navarro, D. N. (2006). Factors affecting the attachment of rhizospheric bacteria to bean and soybean roots. *FEMS Microbiol Lett* **259**, 67-73.
- Aldridge, P. & Hughes, K. T. (2001). How and when are substrates selected for type III secretion? *Trends Microbiol* **9**, 209-214.
- Alexandre, G., Greer-Phillips, S. & Zhulin, I. B. (2004). Ecological role of energy taxis in microorganisms. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 113-126.
- Althabegoiti, M. J. (2004). Estudio de la relación entre la movilidad de *Bradyrhizobium japonicum* y su competitividad para nodular soja. Trabajo de Licenciatura. Universidad Nacional de Quilmes.
- Althabegoiti, M. J., López-García, S. L., Piccinetti, C., Mongiardini, E. J., Perez-Gimenez, J., Quelas, J. I., Peticari, A. & Lodeiro, A. R. (2008). Strain selection for improvement of *Bradyrhizobium japonicum* competitiveness for nodulation of soybean. *FEMS Microbiol Lett* **282**, 115-123.
- Ames, P. & Bergman, K. (1981). Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **148**, 728-908 p.
- Amor, B. B., Shaw, S. L., Oldroyd, G. E., Maillet, F., Penmetsa, R. V., Cook, D., Long, S. R., Denarie, J. & Gough, C. (2003). The NFP locus of *Medicago truncatula* controls an early step of Nod factor signal transduction upstream of a rapid calcium flux and root hair deformation. *Plant J* **34**, 495-506.
- Amsler, C. D., Cho, M. & Matsumura, P. (1993). Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *J Bacteriol* **175**, 6238-6244.
- Armitage, J. P., Gallagher, A. & Johnston, A. W. (1988). Comparison of the chemotactic behaviour of *Rhizobium leguminosarum* with and without the nodulation plasmid. *Mol Microbiol* **2**, 743-748.
- Atsumi, T., Maekawa, Y., Yamada, T., Kawagishi, I., Imae, Y. & Homma, M. (1996). Effect of viscosity on swimming by the lateral and polar flagella of *Vibrio alginolyticus*. *J Bacteriol* **178**, 5024-5026.
- Ausmees, N., Jacobsson, K. & Lindberg, M. (2001). A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin, RapA, belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* **147**, 549-559.
- Ausmees, N., Jonsson, H., Hoglund, S., Ljunggren, H. & Lindberg, M. (1999). Structural and putative regulatory genes involved in cellulose synthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii. *Microbiology* **145** ( Pt 5), 1253-1262.

- Ausmees, N., Kobayashi, H., Deakin, W. J., Marie, C., Krishnan, H. B., Broughton, W. J. & Perret, X. (2004). Characterization of NopP, a type III secreted effector of *Rhizobium sp.* strain NGR234. *J Bacteriol* **186**, 4774-4780.
- Baker, M. D., Wolanin, P. M. & Stock, J. B. (2006). Signal transduction in bacterial chemotaxis. *Bioessays* **28**, 9-22.
- Barahona, E., Navazo, A., Yousef-Coronado, F., Aguirre de Carcer, D., Martinez-Granero, F., Espinosa-Urgel, M., Martin, M. & Rivilla, R. (2010). Efficient rhizosphere colonization by *Pseudomonas fluorescens* fl13 mutants unable to form biofilms on abiotic surfaces. *Environ Microbiol*.
- Barbour, W. M., Hattermann, D. R. & Stacey, G. (1991). Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl Environ Microbiol* **57**, 2635-2639.
- Barcellos, F. G., Menna, P., da Silva Batista, J. S. & Hungria, M. (2007). Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Appl Environ Microbiol* **73**, 2635-2643.
- Barton, J. W. & Ford, R. M. (1995). Determination of Effective Transport Coefficients for Bacterial Migration in Sand Columns. *Appl Environ Microbiol* **61**, 3329-3335.
- Bartsev, A. V., Deakin, W. J., Boukli, N. M., McAlvin, C. B., Stacey, G., Malnoe, P., Broughton, W. J. & Staehelin, C. (2004). NopL, an effector protein of *Rhizobium sp.* NGR234, thwarts activation of plant defense reactions. *Plant Physiol* **134**, 871-879.
- Bauer, P., Crespi, M. D., Szecsi, J., Allison, L. A., Schultze, M., Ratet, P., Kondorosi, E. & Kondorosi, A. (1994). Alfalfa Enod12 genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and *Rhizobium* invasion. *Plant Physiol* **105**, 585-592.
- Becker, A., Berges, H., Krol, E., Bruand, C., Ruberg, S., Capela, D., Lauber, E., Meilhoc, E., Ampe, F., de Bruijn, F. J., Fourment, J., Francez-Charlot, A., Kahn, D., Kuster, H., Liebe, C., Puhler, A., Weidner, S. & Batut, J. (2004). Global changes in gene expression in *Sinorhizobium meliloti* 1021 under microoxic and symbiotic conditions. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 292-303.
- Bennett, J. C., Thomas, J., Fraser, G. M. & Hughes, C. (2001). Substrate complexes and domain organization of the Salmonella flagellar export chaperones FlgN and FliT. *Mol Microbiol* **39**, 781-791.
- Berg, H. C. (2000). Constraints on models for the flagellar rotary motor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**, 491-501.
- Berry, R. M. (2001). Bacterial Flagella: Flagellar Motor. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1-8.
- Bertin, C., Yang, X. & L.A., W. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and Soil* **256**, 67-83.
- Blair, D. F. (2009). Structure and mechanism of the flagellar rotary motor. En: Pili and Flagella. Current Research and Future Trends. Jarrel K.F (ed). Caister Academic Press. Trowbridge, Wiltshire, Gran Bretaña.
- Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3027-3030.
- Blume, H., Beier, H. & H.J, G. (1987). An improved method for silver staining of polypeptides in polyacrilamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.

- Braeken, K., Daniels, R., Vos, K., Fauvart, M., Bachaspatimayum, D., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2008). Genetic determinants of swarming in *Rhizobium etli*. *Microb Ecol* **55**, 54-64.
- Brechenmacher, L., Kim, M. Y., Benitez, M., Li, M., Joshi, T., Calla, B., Lee, M. P., Libault, M., Vodkin, L. O., Xu, D., Lee, S. H., Clough, S. J. & Stacey, G. (2008). Transcription profiling of soybean nodulation by *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 631-645.
- Brencic, A. & Winans, S. C. (2005). Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 155-194.
- Brill, L. M., Evans, C. J. & Hirsch, A. M. (2001). Expression of MsLEC1- and MsLEC2-antisense genes in alfalfa plant lines causes severe embryogenic, developmental and reproductive abnormalities. *Plant J* **25**, 453-461.
- Brown, J., Faulds-Pain A., & Aldridge, P. (2009). The coordination of flagellar gene expression and the flagellar assembly pathway. En: Pili and Flagella. Current Research and Future Trends. Jarrel K.F (ed). Caister Academic Press. Trowbridge, Wiltshire, Gran Bretaña.
- Caetano-Anollés & Favelukes, G. (1986b). Quantitation of adsorption of rhizobia in low numbers to small legume roots. *Appl Environ Microbiol* **52**, 371-376.
- Caetano-Anollés, G. & Favelukes, G. (1986a). Host-Symbiont Specificity Expressed during Early Adsorption of *Rhizobium meliloti* to the Root Surface of Alfalfa. *Applied and Environmental Microbiology* **52**, 377-382.
- Caetano-Anollés, G., Wall, L. G., De Micheli, A. T., Macchi, E. M., Bauer, W. D. & Favelukes, G. (1988). Role of Motility and Chemotaxis in Efficiency of Nodulation by *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **86**, 1228-1235.
- Cohen-Krausz, S. & Trachtenberg, S. (1998). Helical perturbations of the flagellar filament: *Rhizobium lupini* H13-3 at 13 Å resolution. *J Struct Biol* **122**, 267-282.
- Cooper, J. E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J Appl Microbiol* **103**, 1355-1365.
- Coronado, C., Zuanazzi, J., Sallaud, C., Quirion, J. C., Esnault, R., Husson, H. P., Kondorosi, A. & Ratet, P. (1995). Alfalfa Root Flavonoid Production Is Nitrogen Regulated. *Plant Physiol* **108**, 533-542.
- Crist, D. K., Wyza, R. E., Mills, K. K., Bauer, W. D. & Evans, W. R. (1984). Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in water. *Appl Environ Microbiol* **47**, 895-900.
- Croess, C., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J. & Michiels, K. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *Journal of General Microbiology* **139**, 2261-2269.
- Chilcott, G. S. & Hughes, K. T. (2000). Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar typhimurium and *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 694-708.
- Danhorn, T. & Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu Rev Microbiol* **61**, 401-422.
- Daniels, R., Vanderleyden, J. & Michiels, J. (2004). Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **28**, 261-289.

- Dazzo, F. B., Truchet, G. L., Sherwood, J. E., Hrabak, E. M., Abe, M. & Pankratz, S. H. (1984). Specific phases of root hair attachment in the *Rhizobium trifolii*-clover symbiosis. *Appl Environ Microbiol* **48**, 1140-1150.
- de Weert, S., Vermeiren, H., Mulders, I. H., Kuiper, I., Hendrickx, N., Bloemberg, G. V., Vanderleyden, J., De Mot, R. & Lugtenberg, B. J. (2002). Flagella-driven chemotaxis towards exudate components is an important trait for tomato root colonization by *Pseudomonas fluorescens*. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1173-1180.
- De Weger, L. A., van der Vlugt, C. I., Wijfjes, A. H., Bakker, P. A., Schippers, B. & Lugtenberg, B. (1987). Flagella of a plant-growth-stimulating *Pseudomonas fluorescens* strain are required for colonization of potato roots. *J Bacteriol* **169**, 2769-2773.
- Deakin, W. J., Marie, C., Saad, M. M., Krishnan, H. B. & Broughton, W. J. (2005). NopA is associated with cell surface appendages produced by the type III secretion system of *Rhizobium* sp. strain NGR234. *Mol Plant Microbe Interact* **18**, 499-507.
- Deakin, W. J., Parker, V. E., Wright, E. L., Ashcroft, K. J., Loake, G. J. & Shaw, C. H. (1999). *Agrobacterium tumefaciens* possesses a fourth flagelin gene located in a large gene cluster concerned with flagellar structure, assembly and motility. *Microbiology* **145** ( Pt 6), 1397-1407.
- Dénarié, J., Debelle, F. & Prome, J. C. (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu Rev Biochem* **65**, 503-535.
- Denison, R. F. (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist* **156**, 567-576.
- Dharmatilake, A. J. & Bauer, W. D. (1992). Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards Nodulation Gene-Inducing Compounds from Alfalfa Roots. *Appl Environ Microbiol* **58**, 1153-1158.
- Djordjevic, M. A. (2004). *Sinorhizobium meliloti* metabolism in the root nodule: a proteomic perspective. *Proteomics* **4**, 1859-1872.
- Esseling, J. J., Lhuissier, F. G. & Emons, A. M. (2003). Nod factor-induced root hair curling: continuous polar growth towards the point of nod factor application. *Plant Physiol* **132**, 1982-1988.
- Felix, G., Duran, J. D., Volko, S. & Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J* **18**, 265-276.
- Figurski, D. H. & Helinski, D. R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 1648-1652.
- Fischer, H. M. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol Rev* **58**, 352-386.
- Fraser, G. M., Bennett, J. C. & Hughes, C. (1999). Substrate-specific binding of hook-associated proteins by FlgN and FliT, putative chaperones for flagellum assembly. *Mol Microbiol* **32**, 569-580.
- Frayse, N., Couderc, F. & Poinso, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* **270**, 1365-1380.
- Fujishige, N. A., Kapadia, N. N., De Hoff, P. L. & Hirsch, A. M. (2006). Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* **56**, 195-206.



- Fujishige, N. A., Lum, M. R., De Hoff, P. L., Whitelegge, J. P., Faull, K. F. & Hirsch, A. M. (2008). *Rhizobium* common nod genes are required for biofilm formation. *Mol Microbiol* 67, 504-515.
- Furuno, M., Sato, K., Kawagishi, I. & Homma, M. (2000). Characterization of a flagellar sheath component, PF60, and its structural gene in marine *Vibrio*. *J Biochem* 127, 29-36.
- Gage, D. J. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68, 280-300.
- Gavin, R., Rabaan, A. A., Merino, S., Tomas, J. M., Gryllos, I. & Shaw, J. G. (2002). Lateral flagella of *Aeromonas* species are essential for epithelial cell adherence and biofilm formation. *Mol Microbiol* 43, 383-397.
- Giraud, E., Moulin, L., Vallenet, D., Barbe, V., Cytryn, E., Avarre, J. C., Jaubert, M., Simon, D., Cartieaux, F., Prin, Y., Bena, G., Hannibal, L., Fardoux, J., Kojadinovic, M., Vuillet, L., Lajus, A., Cruveiller, S., Rouy, Z., Mangenot, S., Segurens, B., Dossat, C., Franck, W. L., Chang, W. S., Saunders, E., Bruce, D., Richardson, P., Normand, P., Dreyfus, B., Pignol, D., Stacey, G., Emerich, D., Vermeglio, A., Medigue, C. & Sadowsky, M. (2007). Legumes symbioses: absence of Nod genes in photosynthetic bradyrhizobia. *Science* 316, 1307-1312.
- Gomez-Gomez, L., Felix, G. & Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 18, 277-284.
- Gonzalez, J. E. & Marketon, M. M. (2003). Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* 67, 574-592.
- Goormachtig, S., Capoen, W. & Holsters, M. (2004). *Rhizobium* infection: lessons from the versatile nodulation behaviour of water-tolerant legumes. *Trends Plant Sci* 9, 518-522.
- Götz, R., Limmer, N., Ober, K. & Schmitt, R. (1982). Motility and chemotaxis in 1 two strains of 2 *Rhizobium* with complex flagella. *J Gen Microbiol* 128, 789-798.
- Halbleib, C. M. & Ludden, P. W. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *J Nutr* 130, 1081-1084.
- Halverson, L. J. & Stacey, G. (1986). Effect of lectin on nodulation by wild-type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation-defective mutant. *Appl Environ Microbiol* 51, 753-760.
- Harshey, R. M. (1994). Bees aren't the only ones: swarming in gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 13, 389-394.
- Harshey, R. M. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annu Rev Microbiol* 57, 249-273.
- Hauser, F., Lindemann, A., Vuilleumier, S., Patrignani, A., Schlapbach, R., Fischer, H. M. & Hennecke, H. (2006). Design and validation of a partial-genome microarray for transcriptional profiling of the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region. *Mol Genet Genomics* 275, 55-67.
- Henrichsen, J. (1972). Bacterial surface translocation: a survey and a classification. *Bacteriol Rev* 36, 478-503.
- Hoben, P., Royal, N., Cheung, A., Yamao, F., Biemann, K. & Soll, D. (1982). *Escherichia coli* glutaminyl-tRNA synthetase. II. Characterization of the *glnS* gene product. *J Biol Chem* 257, 11644-11650.
- Homma, M., Fujita, H., Yamaguchi, S. & Iino, T. (1987). Regions of *Salmonella typhimurium* flagellin essential for its polymerization and excretion. *J Bacteriol* 169, 291-296.

- Horiuchi, J., Prithiviraj, B., Bais, H. P., Kimball, B. A. & Vivanco, J. M. (2005). Soil nematodes mediate positive interactions between legume plants and *Rhizobium* bacteria. *Planta* 222, 848-857.
- Jones, C. J., Homma, M. & Macnab, R. M. (1989). L-, P-, and M-ring proteins of the flagellar basal body of *Salmonella typhimurium*: gene sequences and deduced protein sequences. *J Bacteriol* 171, 3890-3900.
- Jones, K. M., Kobayashi, H., Davies, B. W., Taga, M. E. & Walker, G. C. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium-Medicago* model. *Nat Rev Microbiol* 5, 619-633.
- Joys, T. M. (1988). The flagellar filament protein. *Can J Microbiol* 34, 452-458.
- Kaiser, D. (2007). Bacterial swarming: a re-examination of cell-movement patterns. *Curr Biol* 17, R561-570.
- Kanbe, M., Yagasaki, J., Zehner, S., Gottfert, M. & Aizawa, S. (2007). Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 189, 1083-1089.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiyumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M. & Tabata, S. (2002). Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA Res* 9, 189-197.
- Kape, R., Parniske, M. & Werner, D. (1991). Chemotaxis and nod Gene Activity of *Bradyrhizobium japonicum* in Response to Hydroxycinnamic Acids and Isoflavonoids. *Appl Environ Microbiol* 57, 316-319.
- Karr, D. B., Liang, R. T., Reuhs, B. L. & Emerich, D. W. (2000). Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta* 211, 218-226.
- Kent, W. J. (2002). BLAT-the BLAST-like alignment tool. *Genome Res* 12, 656-664.
- Konkel, M. E., Klena, J. D., Rivera-Amill, V., Monteville, M. R., Biswas, D., Raphael, B. & Mickelson, J. (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol* 186, 3296-3303.
- Krupski, G., Gotz, R., Ober, K., Pleier, E. & Schmitt, R. (1985). Structure of complex flagellar filaments in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 162, 361-366.
- Kubori, T., Shimamoto, N., Yamaguchi, S., Namba, K. & Aizawa, S. (1992). Morphological pathway of flagellar assembly in *Salmonella typhimurium*. *J Mol Biol* 226, 433-446.
- Kubori, T., Yamaguchi, S. & Aizawa, S. (1997). Assembly of the switch complex onto the MS ring complex of *Salmonella typhimurium* does not require any other flagellar proteins. *J Bacteriol* 179, 813-817.
- Laus, M. C., van Brussel, A. A. & Kijne, J. W. (2005). Role of cellulose fibrils and exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* in attachment to and infection of *Vicia sativa* root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* 18, 533-538.
- Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. & Geurts, R. (2003). LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* 302, 630-633.
- Liu, R., Tran, V. M. & Schmidt, E. L. (1989). Nodulating Competitiveness of a Nonmotile Tn7 Mutant of *Bradyrhizobium japonicum* in Nonsterile Soil. *Appl Environ Microbiol* 55, 1895-1900.

- Lodeiro, A. R. & Favelukes, G. (1999). Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption *Soil Biology & Biochemistry* 31, 1405-1411
- Lodeiro, A. R., Lagares, A., Martinez, E. N. & Favelukes, G. (1995). Early Interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli and Bean Roots: Specificity in the Process of Adsorption and Its Requirement of Ca(sup2+) and Mg(sup2+) Ions. *Appl Environ Microbiol* 61, 1571-1579.
- Lodeiro, A. R., Lopez-Garcia, S. L., Vazquez, T. E. & Favelukes, G. (2000). Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin. *FEMS Microbiol Lett* 188, 177-184.
- Lodwig, E. & Poole, P. (2003). Metabolism of *Rhizobium* bacteroids. *Crit Rev Plant Sciencis* 2, 37-78.
- Loh, J. T., Ho, S. C., de Feijter, A. W., Wang, J. L. & Schindler, M. (1993). Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*: unipolar localization of the lectin BJ38 on the bacterial cell surface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 3033-3037.
- López-García, S. L., Peticari, A., Piccinetti, C., Ventimiglia, L., Arias, N., De Battista, J., Althabegoiti, M. J., Covelli, J., Lopez, M.F., Mongiardini, E. J., Pérez-Giménez, J., Quelas, J. I. & Lodeiro, A. R. (2009). In-Furrow Inoculation and Selection for Higher Motility Enhances the Efficacy of *Bradyrhizobium japonicum* Nodulation. *Agronomy Journal* 101, 1-7.
- López-García, S. L., Vazquez, T. E., Favelukes, G. & Lodeiro, A. R. (2001). Improved soybean root association of N-starved *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 183, 7241-7252.
- López-García, S. L., Vazquez, T. E., Favelukes, G. & Lodeiro, A. R. (2002). Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. *Environ Microbiol* 4, 216-224.
- López-García, S. L. (2004). Interacciones tempranas entre *Bradyrhizobium japonicum* y soja: efectos de la escasez de N y la distribución de los rizobios sobre la raíz. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Lugtenberg, B. J., Dekkers, L. & Bloemberg, G. V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* 39, 461-490.
- Macnab, R. M. (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57, 77-100.
- Macnab, R.M. (1996). Flagella and motility. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed, Vol. 1. Neidhardt, F.C., et al. (eds). American Society for Microbiology Press. Washington DC, EEUU.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J. (2003). A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *nature* 425, 637-640.
- Madsen, E. L. & Alexander, M. (1982). Transport of *Rhizobium* and *Pseudomonas* through soil. *Soil Science Society of América Journal* 46, 557-560.
- Maki-Yonekura, S., Yonekura, K. & Namba, K. (2003). Domain movements of HAP2 in the cap-filament complex formation and growth process of the bacterial flagellum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15528-15533.
- Marie, C., Deakin, W. J., Ojanen-Reuhs, T., Diallo, E., Reuhs, B., Broughton, W. J. & Perret, X. (2004). TtsI, a key regulator of *Rhizobium* species NGR234 is required for type III-

- dependent protein secretion and synthesis of rhamnose-rich polysaccharides. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 958-966.
- Martinez-Granero, F., Rivilla, R. & Martin, M. (2006). Rhizosphere selection of highly motile phenotypic variants of *Pseudomonas fluorescens* with enhanced competitive colonization ability. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3429-3434.
- Maruyama, M., Lodderstaedt, G. & Schmitt, R. (1978). Purification and biochemical properties of complex flagella isolated from *Rhizobium lupini* H13-3. *Biochim Biophys Acta* **535**, 110-124.
- Matamoros, M. A., Baird, L. M., Escuredo, P. R., Dalton, D. A., Minchin, F. R., Iturbe-Ormaetxe, I., Rubio, M. C., Moran, J. F., Gordon, A. J. & Becana, M. (1999). Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical, and structural alterations. *Plant Physiol* **121**, 97-112.
- Mathis, R., Van Gijsegem, F., De Rycke, R., D'Haese, W., Van Maelsaeke, E., Anthonio, E., Van Montagu, M., Holsters, M. & Vereecke, D. (2005). Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2655-2660.
- McCarter, L. (1999). The multiple identities of *Vibrio parahaemolyticus*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**, 51-57.
- McCarter, L. L. (2001). Polar flagellar motility of the *Vibrionaceae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **65**, 445-462, table of contents.
- McCarter, L. L. (2004). Dual flagellar systems enable motility under different circumstances. *J Mol Microbiol Biotechnol* **7**, 18-29.
- McClain, J., Rollo, D. R., Rushing, B. G. & Bauer, C. E. (2002). *Rhodospirillum centenum* utilizes separate motor and switch components to control lateral and polar flagellum rotation. *J Bacteriol* **184**, 2429-2438.
- McDermott, T. R. & Graham, P. H. (1989). *Bradyrhizobium japonicum* Inoculant Mobility, Nodule Occupancy, and Acetylene Reduction in the Soybean Root System. *Appl Environ Microbiol* **55**, 2493-2498.
- Meier, V. M. & Scharf, B. E. (2009). Cellular localization of predicted transmembrane and soluble chemoreceptors in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **191**, 5724-5733.
- Mellor, H. Y., Glenn A. R., Arwas, R. & Dilworth, M. J. (1987). Symbiotic and competitive properties of motility mutants of *Rhizobium trifolii* TAI *Archives of Microbiology* **148**, 34-39.
- Merino, S., Shaw, J. G. & Tomas, J. M. (2006). Bacterial lateral flagella: an inducible flagella system. *FEMS Microbiol Lett* **263**, 127-135.
- Michiels, K., Croes, C. & Vanderleyden, J. (1991). Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *Journal of General Microbiology* **137**, 224-2246.
- Miller, D. D., Leferink-ten Klooster, H. B. & Emons, A. M. (2000). Lipochito-oligosaccharide nodulation factors stimulate cytoplasmic polarity with longitudinal endoplasmic reticulum and vesicles at the tip in vetch root hairs. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1385-1390.
- Miller, L. D., Yost, C. K., Hynes, M. F. & Alexandre, G. (2007). The major chemotaxis gene cluster of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* is essential for competitive nodulation. *Mol Microbiol* **63**, 348-362.

- Moawad, H. A., Ellis, W. R. & Schmidt, E. L. (1984). Rhizosphere Response as a Factor in Competition Among Three Serogroups of Indigenous *Rhizobium japonicum* for Nodulation of Field-Grown Soybeans. *Appl Environ Microbiol* **47**, 607-612.
- Moens, S., Schloter, M. & Vanderleyden, J. (1996). Expression of the structural gene, *lafI*, encoding the flagellin of the lateral flagella in *Azospirillum brasilense* Sp7. *J Bacteriol* **178**, 5017-5019.
- Mongiardini, E. J. (2008). Estudio del Rol de las lectinas bacterianas en la simbiosis rizobio-leguminosa. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Mongiardini, E. J., Ausmees, N., Perez-Gimenez, J., Julia Althabegoiti, M., Ignacio Quelas, J., López-García, S. L. & Lodeiro, A. R. (2008). The rhizobial adhesion protein RapA1 is involved in adsorption of rhizobia to plant roots but not in nodulation. *FEMS Microbiol Ecol* **65**, 279-288.
- Mora, T., Yu, H., Sowa, Y. & Wingreen, N. S. (2009). Steps in the bacterial flagellar motor. *PLoS Comput Biol* **5**, e1000540.
- Morgan, D. G., Macnab, R. M., Francis, N. R. & DeRosier, D. J. (1993). Domain organization of the subunit of the *Salmonella typhimurium* flagellar hook. *J Mol Biol* **229**, 79-84.
- Morgan, J. A. W., Bending G. D. & J., W. P. (2005). Biological costs and benefits to plant-microbe interactions in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**, 1729-1739.
- Moron, B., Soria-Díaz, M. E., Ault, J., Verroios, G., Noreen, S., Rodríguez-Navarro, D. N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megias, M. & Sousa, C. (2005). Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem Biol* **12**, 1029-1040.
- Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J. & Imberty, A. (2006). LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* **16**, 801-809.
- Muller, J., Boller, T. & Wiemken, A. (2001). Trehalose becomes the most abundant non-structural carbohydrate during senescence of soybean nodules. *J Exp Bot* **52**, 943-947.
- Newton, S. M., Jacob, C. O. & Stocker, B. A. (1989). Immune response to cholera toxin epitope inserted in *Salmonella* flagellin. *Science* **244**, 70-72.
- Niehaus, K., Kapp, D. & Pühler, A. (1993). Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPS-I)-deficient *Rhizobium meliloti* mutant. *Planta* **190**, 415-525.
- Niehus, E., Ye, F., Suerbaum, S. & Josenhans, C. (2002). Growth phase-dependent and differential transcriptional control of flagellar genes in *Helicobacter pylori*. *Microbiology* **148**, 3827-3837.
- Oldroyd, G. E. (2007). Plant science. Nodules and hormones. *Science* **315**, 52-53.
- Oldroyd, G. E. & Downie, J. A. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu Rev Plant Biol* **59**, 519-546.
- Pandya, S., Iyer, P., Gaitonde, V., Parekh, T. & Desai, A. (1999). Chemotaxis of *Rhizobium* sp.S2 towards *Cajanus cajan* root exudate and its major components. *Curr Microbiol* **38**, 205-209.
- Parkinson, J. S., Ames, P. & Studdert, C. A. (2005). Collaborative signaling by bacterial chemoreceptors. *Curr Opin Microbiol* **8**, 116-121.

- Parniske, M., Schmidt, P. E., Kosch, K. & Müller, P. (1994). Plant defense response of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7, 631-638.
- Patrick, H. N. & Lowther, W. L. (1993). Spread of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* in soil. *Soil Biology Biochemistry* 25, 607-612.
- Perez-Gimenez, J., Mongiardini, E. J., Althabegoiti, M. J., Covelli, J., Quelas, J. I., Lopez-Garcia, S. L. & Lodeiro, A. R. (2009). Soybean Lectin Enhances Biofilm Formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the Absence of Plants. *Int J Microbiol* 2009, 719367.
- Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 180-201.
- Pessi, G., Ahrens, C. H., Rehrauer, H., Lindemann, A., Hauser, F., Fischer, H. M. & Hennecke, H. (2007). Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 20, 1353-1363.
- Pladys, D., Dimitrijevic, L. & Rigaud, J. (1991). Localization of a protease in protoplast preparations in infected cells of French bean nodules. *Plant Physiol* 97, 1174-1180.
- Pleier, E. & Schmitt, R. (1989). Identification and sequence analysis of two related flagellin genes in *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 171, 1467-1475.
- Preisig, O., Zufferey, R., Thony-Meyer, L., Appleby, C. A. & Hennecke, H. (1996). A high-affinity *cbb3*-type cytochrome oxidase terminates the symbiosis-specific respiratory chain of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* 178, 1532-1538.
- Quelas, J. I. (2009). Biosíntesis de exopolisacáridos y polihidroxiobutirato y su relación con la simbiosis *Bradyrhizobium japonicum* - soja. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Quelas, J. I., Lopez-Garcia, S. L., Casabuono, A., Althabegoiti, M. J., Mongiardini, E. J., Perez-Gimenez, J., Couto, A. & Lodeiro, A. R. (2006). Effects of N-starvation and C-source on *Bradyrhizobium japonicum* exopolysaccharide production and composition, and bacterial infectivity to soybean roots. *Arch Microbiol* 186, 119-128.
- Quelas, J. I., Mongiardini, E. J., Casabuono, A., López-García, S. L., Althabegoiti, M. J., Covelli, J. M., Perez-Gimenez, J., Couto, A. & Lodeiro, A. R. (2010). Lack of galactose or galacturonic acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 exopolysaccharide leads to different symbiotic responses in soybean. *Mol Plant Microbe Interact*.
- Radutoiu, S., Madsen, L. H., Madsen, E. B., Felle, H. H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J. (2003). Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *nature* 425, 585-592.
- Ramos, J. L., (2004). Life in the rhizosphere. Pseudomonas, Genomics, Life Style and Molecular Architecture. Kluwer Academic Plenum Publishers. New York. EEUU
- Rathbun, E. A., Naldrett, M. J. & Brewin, N. J. (2002). Identification of a family of extensin-like glycoproteins in the lumen of *Rhizobium*-induced infection threads in pea root nodules. *Mol Plant Microbe Interact* 15, 350-359.
- Redondo-Nieto, M., Lloret, J., Larenas, J., Barahona, E., Navazo, A., Martinez-Granero, F., Capdevila, S., Rivilla, R. & Martin, M. (2008). Transcriptional organization of the region encoding the synthesis of the flagellar filament in *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 190, 4106-4109.
- Reid, S. W., Leake, M. C., Chandler, J. H., Lo, C. J., Armitage, J. P. & Berry, R. M. (2006). The maximum number of torque-generating units in the flagellar motor of *Escherichia coli* is at least 11. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8066-8071.

- Robledo, M., Jimenez-Zurdo, J. I., Velazquez, E., Trujillo, M. E., Zurdo-Pineiro, J. L., Ramirez-Bahena, M. H., Ramos, B., Diaz-Minguez, J. M., Dazzo, F., Martinez-Molina, E. & Mateos, P. F. (2008). *Rhizobium* cellulase CelC2 is essential for primary symbiotic infection of legume host roots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7064-7069.
- Rodrigues, J. A., Lopez-Baena, F. J., Ollero, F. J., Vinardell, J. M., Espuny Mdel, R., Bellogin, R. A., Ruiz-Sainz, J. E., Thomas, J. R., Sumpton, D., Ault, J. & Thomas-Oates, J. (2007). NopM and NopD are rhizobial nodulation outer proteins: identification using LC-MALDI and LC-ESI with a monolithic capillary column. *J Proteome Res* **6**, 1029-1037.
- Rudrappa, T., Biedrzycki, M. L. & Bais, H. P. (2008). Causes and consequences of plant-associated biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* **64**, 153-166.
- Russo, D. M., Williams, A., Edwards, A., Posadas, D. M., Finnie, C., Dankert, M., Downie, J. A. & Zorreguieta, A. (2006). Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. *J Bacteriol* **188**, 4474-4486.
- Saad, M. M., Kobayashi, H., Marie, C., Brown, I. R., Mansfield, J. W., Broughton, W. J. & Deakin, W. J. (2005). NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. *J Bacteriol* **187**, 1173-1181.
- Sadowski, M.J. y P. Graham (1998) Soil Biology of the *Rhizobiaceae*. p 155-172 En: H.P. Spaink, A. Kondorosi y P.J.J. Hooykaas (eds.). The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Samatey, F. A. (2009). Flagellum structure. En: Pili and Flagella. Current Research and Future Trends. Jarrel K.F (ed). Caister Academic Press. Trowbridge, Wiltshire, Gran Bretaña.
- Sambroock, J., Fritsch EF y T Maniatis., (ed) (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 3ed. 3ed. New York. New York. EEUU.
- Santos, R., Hérouart, D., Sigaud, S., Touati, D. & A., P. (2001). Oxidative Burst in Alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* Symbiotic Interaction. *Molecular Plant Microbe Interactions* **14**, 86-89.
- Sawada, H., Kuykendall, L. D. & Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol* **49**, 155-179.
- Scharf, B., Schuster-Wolff-Buhring, H., Rachel, R. & Schmitt, R. (2001). Mutational analysis of the *Rhizobium lupini* H13-3 and *Sinorhizobium meliloti* flagellin genes: importance of flagellin A for flagellar filament structure and transcriptional regulation. *J Bacteriol* **183**, 5334-5342.
- Schmitt, R. (2002). Sinorhizobial chemotaxis: a departure from the enterobacterial paradigm. *Microbiology* **148**, 627-631.
- Schmitt, R., Raska, I. & Mayer, F. (1974). Plain and complex flagella of *Pseudomonas rhodos*: analysis of fine structure and composition. *J Bacteriol* **117**, 844-857.
- Seneviratne, G. & Jayasinghearachchi, H. S. (2003). Mycelial colonization by *Bradyrhizobia* and *Azorhizobia*. *J Biosci* **28**, 243-247.
- Shah, V. K. & Brill, W. J. (1977). Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 3249-3253.
- Simon, R., Priefer, U. & Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Bio/Technology* **1**, 784-791.
- Simon, R., Quandt, J. & Klipp, W. (1989). New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene* **80**, 161-169.

- Skorpil, P., Saad, M. M., Boukli, N. M., Kobayashi, H., Ares-Orpel, F., Broughton, W. J. & Deakin, W. J. (2005). NopP, a phosphorylated effector of *Rhizobium* sp. strain NGR234, is a major determinant of nodulation of the tropical legumes *Flemingia congesta* and *Tephrosia vogelii*. *Mol Microbiol* **57**, 1304-1317.
- Skorupska, A., Janczarek, M., Marczak, M., Mazur, A. & Krol, J. (2006). Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb Cell Fact* **5**, 7.
- Smit, G., Kijne, J. W. & Lugtenberg, B. J. (1989a). Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* to pea root hair tips. *J Bacteriol* **171**, 569-572.
- Smit, G., Logman, T. J., Boerrigter, M. E., Kijne, J. W. & Lugtenberg, B. J. (1989b). Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* bv *viciae* Ca<sup>2+</sup>-dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. *J Bacteriol* **171**, 4054-4062.
- Smit, G., Swart, S., Lugtenberg, B. J. & Kijne, J. W. (1992). Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. *Mol Microbiol* **6**, 2897-2903.
- Smit, P., Limpens, E., Geurts, R., Fedorova, E., Dolgikh, E., Gough, C. & Bisseling, T. (2007). Medicago LYK3, an entry receptor in rhizobial nodulation factor signaling. *Plant Physiol* **145**, 183-191.
- Soto, M. J., Dominguez-Ferreras, A., Perez-Mendoza, D., Sanjuan, J. & Olivares, J. (2008). Mutualism versus pathogenesis: The give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell Microbiol*.
- Sourjik, V., Sterr, W., Platzer, J., Bos, I., Haslbeck, M. & Schmitt, R. (1998). Mapping of 41 chemotaxis, flagellar and motility genes to a single region of the *Sinorhizobium meliloti* chromosome. *Gene* **223**, 283-290.
- Soutourina, O. A. & Bertin, P. N. (2003). Regulation cascade of flagellar expression in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 505-523.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**, 187-209.
- Sun, J., Cardoza, V., Mitchell, D. M., Bright, L., Oldroyd, G. & Harris, J. M. (2006). Crosstalk between jasmonic acid, ethylene and Nod factor signaling allows integration of diverse inputs for regulation of nodulation. *Plant J* **46**, 961-970.
- Suss, C., Hempel, J., Zehner, S., Krause, A., Patschkowski, T. & Gottfert, M. (2006). Identification of genistein-inducible and type III-secreted proteins of *Bradyrhizobium japonicum*. *J Biotechnol* **126**, 69-77.
- Szurmant, H. & Ordal, G. W. (2004). Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 301-319.
- Tambalo, D. D., Bustard, D. E., Del Bel, K. L., Koval, S. F., Khan, M. F. & Hynes, M. F. (2010a). Characterization and functional analysis of seven flagellin genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *BMC Microbiol* **10**, 219.
- Tambalo, D. D., Del Bel, K. L., Bustard, D. E., Greenwood, P. R., Steedman, A. E. & Hynes, M. F. (2010b). Regulation of flagellar, motility and chemotaxis genes in *Rhizobium leguminosarum* by the VisN/R-Rem cascade. *Microbiology* **156**, 1673-1685.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-4680.



- Toro, N. (1996). Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **12**, 157-162.
- Trachtenberg, S., DeRosier, D. J., Aizawa, S. & Macnab, R. M. (1986). Pairwise perturbation of flagellin subunits. The structural basis for the differences between plain and complex bacterial flagellar filaments. *J Mol Biol* **190**, 569-576.
- Triplett, E. W. & Sadowsky, M. J. (1992). Genetics of competition for nodulation of legumes. *Annu Rev Microbiol* **46**, 399-428.
- Troisfontaines, P. & Cornelis, G. R. (2005). Type III secretion: more systems than you think. *Physiology (Bethesda)* **20**, 326-339.
- Tung, W. L. & Chow, K. C. (1995). A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. *Trends Genet* **11**, 128-129.
- Turner, S. L. & Young, J. P. (2000). The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Mol Biol Evol* **17**, 309-319.
- van Rhijn, P., Goldberg, R. B. & Hirsch, A. M. (1998). *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene. *Plant Cell* **10**, 1233-1250.
- Vanderlinde, E. M., Harrison, J. J., Muszynski, A., Carlson, R. W., Turner, R. J. & Yost, C. K. (2010). Identification of a novel ABC transporter required for desiccation tolerance, and biofilm formation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* 3841. *FEMS Microbiol Ecol* **71**, 327-340.
- Verma, A., Schirm, M., Arora, S. K., Thibault, P., Logan, S. M. & Ramphal, R. (2006). Glycosylation of b-Type flagellin of *Pseudomonas aeruginosa*: structural and genetic basis. *J Bacteriol* **188**, 4395-4403.
- Vesper, S. J. & Bauer, W. D. (1986). Role of Pili (Fimbriae) in Attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to Soybean Roots. *Appl Environ Microbiol* **52**, 134-141.
- Vincent, J., (1970). A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook No 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Walker, S. A., Viprey, V. & Downie, J. A. (2000). Dissection of nodulation signaling using pea mutants defective for calcium spiking induced by nod factors and chitin oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13413-13418.
- Wall, L. G. & Favelukes, G. (1991). Early recognition in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: root exudate factor stimulates root adsorption of homologous rhizobia. *J Bacteriol* **173**, 3492-3499.
- Watt, M., Silk, W. K. & Passioura, J. B. (2006). Rates of root and organism growth, soil conditions, and temporal and spatial development of the rhizosphere. *Ann Bot* **97**, 839-855.
- Wilson, D. R. & Beveridge, T. J. (1993). Bacterial flagellar filaments and their component flagellins. *Can J Microbiol* **39**, 451-472.
- Winstanley, C. & Morgan, J. A. (1997). The bacterial flagellin gene as a biomarker for detection, population genetics and epidemiological analysis. *Microbiology* **143** ( Pt 10), 3071-3084.
- Wolfe, A. J. & Berg, H. C. (1989). Migration of bacteria in semisolid agar. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 6973-6977.

Yost, C. K., Clark, K. T., Del Bel, K. L. & Hynes, M. F. (2003). Characterization of the nodulation plasmid encoded chemoreceptor gene mcpG from *Rhizobium leguminosarum*. *BMC Microbiol* 3, 1.