



Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Exactas

**LA ASOCIACION SIMBIOTICA
DE RIZOBIOS Y LEGUMINOSAS: ESTUDIOS
SOBRE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA
PREINFECCION.**

Luis Gabriel Wall

Tesis

Doc. Autor...
17-VI-91
Inv. 73.246.....53686

La Plata, 1990

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas ha sido realizado en el Laboratorio del Area de Química Biológica I de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata con la dirección del Profesor Doctor Gabriel Favelukes.

*para Ana,
y para nuestros hijos,
Clarita,
Joaquín y
Felipe.*

"De modo que las ideas, que antes había utilizado para imaginar un caballo que aún no había visto, eran puros signos, como eran signos de la idea de caballo las huellas sobre la nieve: cuando no poseemos las cosas, usamos signos y signos de signos."

Umberto Eco (en "El nombre de la rosa")

Mi reconocimiento:

A la Facultad de Ciencias Exactas por permitirme el uso de sus equipos e instalaciones.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por las becas que me otorgaron para realizar este trabajo.

A la Swedish Agency for Research Cooperation (SAREC), por la financiación de mi asistencia al 7th International Congress in Nitrogen Fixation (Colonia, Alemania) y mi estadía en el Departamento de Microbiología de la Universidad Sueca de Ciencias Agrícolas, Uppsala, Suecia.

Mi agradecimiento:

Al Profesor Gabriel Favelukes, por el estímulo y entusiasmo que supo darme desde un principio para encarar la aventura del trabajo científico, por sus enseñanzas para crecer en espíritu crítico, y por su gran afecto y amistad;

a Alberto Sarachu, en memoria, ante todo por la sincera amistad que me brindó, por sus valiosos consejos y críticas en el trabajo;

a mis compañeros de laboratorio del grupo "Rhizobium", los que hoy están y los que pasaron: Nora Martínez, Antonio Lagares, Daniel Grasso, Delia Sorgentini, Aníbal Sanchez Caro, Adriana Mesa, Aníbal Lodeiro, Ramón González y Carolina Barrio;

en especial: a Nora, por todo lo que de ella pude aprender en estos años; a Tony y a Daniel, por la amistad, el apoyo y la colaboración en el laboratorio;

a Marcelo Giménez, por su ayuda en la realización de los últimos experimentos;

a Aldo Campana, por su inestimable y generosa asistencia técnica;

a toda la gente del laboratorio de Química Biológica, con quienes he compartido también mucho tiempo de laboratorio y gratos momentos de cocina y pasillo, por el afecto y apoyo que también me brindaron; en especial a Daniel Ghiringhelli y a Laura García;

a Gustavo Caetano Anollés, por su desinteresada guía en mis comienzos en el laboratorio y su confianza;

al Dr. Hans Ljunggren, por el interés que manifestó por mi trabajo y por la enorme y hermosa hospitalidad que me brindó en mi paso por Uppsala;

a la Dra. Anna Martensson, por su cálida atención y colaboración durante mi estadía en Uppsala;

a Mario Aguilar, por sus generosas críticas en el trabajo y sus valiosos consejos dentro del laboratorio y fuera de él;

a Jacques Vasse, por su amistad, tan abierta y generosa; y sus palabras de aliento;

a los Dres. George Truchet y Jean Dénarié, por sus enriquecedoras opiniones;

a los Dres. Oscar Grau y Victor Romanowski, por el apoyo y el estímulo que me brindaron, y por permitirme el uso de las computadoras;

a Silvia Moya, por sus consejos sobre el manejo del procesador de palabras en la etapa de impresión de esta tesis.

A mi familia toda,

y en forma muy especial a mis Padres.

Este trabajo de tesis ha formado parte de un periodo muy importante de mi vida. Muchas cosas sucedieron en estos años, momentos hermosos, felices, y momentos difíciles o tristes (life is what is passing, while you are busy making plans, dijo Lennon). Mi vida pasó mezclándose muchas veces con el laboratorio, en un trabajo absorbente, aparentemente desordenado y sin horarios fijos. Hace poco, estudiando una revisión sobre lectinas me encontré leyendo la palabra "reconocimiento" y me di cuenta que en todos estos años en forma paralela a mi estudio sobre el reconocimiento entre rizobios y raíces, mi vocación científica me había empujado a un proceso de reconocimiento interior, que me hizo crecer y que hoy me hace sentir feliz... y aquí estoy, terminando de compaginar el volumen de esta tesis y con muchas ganas de seguir.

L.G.W., La Plata, noviembre 1990.

*"Lo que uno ama: la verdad es lo más intranquilo"
Luis Alberto Spinetta*

ABREVIATURAS

A	Adhesividad.
cm	Centímetro.
CPS	Polisacárido capsular.
DO	Densidad óptica.
EPS	Exopolisacárido.
ER	Exudado radicular dializado.
ERH	Zona de pelos radiculares emergentes.
ETM	Error típico de la media aritmética.
fg	Femtogramo.
g	Aceleración de la gravedad.
kDa	Kilodalton.
L	Litro.
LPS	Lipopolisacárido.
M	Molar.
mg	miligramo.
ml	mililitro.
mM	milimolar.
mm	Milimetro.
MF	Medio de Fahraeus.
μg	Microgramo.
ng	Nanogramo.
rpm	Revoluciones por minuto.
r	Resistente.
R.	<i>Rhizobium</i> .
Rif	Rifampicina.
RU	Unidad de distancia radicular.
RT	Apice radicular "root tip".
s	Sensible.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
Str	Estreptomycin.
Trm	Trimetoprima.
UV	Ultravioleta.
YEM	Medio de extracto levadura - manitol.

INDICE

PRIMERA PARTE

CAPITULO 1

LAS INTERACCIONES <i>Rhizobium</i> -LEGUMINOSAS EN LOS SISTEMAS SIMBIOTICOS FIJADORES DE NITROGENO.....	2
1.1.- Algunas consideraciones generales y reflexiones sobre el proceso de fijación biológica de nitrógeno.....	3
1.2.- Sistemas fijadores de nitrógeno.....	5
1.3.- Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	6
1.3.1.- La preinfección.....	7
1.3.2.- La infección y desarrollo del nódulo.....	7
1.3.3.- Funcionamiento del nódulo.....	9
1.4.- Especificidad para el hospedante.....	10
1.5.- Genética de los rizobios relacionada a la simbiosis.....	12
1.6.- La rizosfera.....	20
1.7.- La diferenciación radicular y su importancia en el establecimiento de la simbiosis.....	21
1.7.1.- La zona del ápice radicular y la zona de elongación.....	21
1.7.2.- La zona de pelos radiculares.....	22
1.8.- El exudado radicular.....	22
1.9. Quimiotaxis de los rizobios hacia la raíz.....	24
1.10.- La colonización rizosférica.....	27
1.11.- Compuestos de la planta que participan en la regulación de la expresión de los genes <i>nod</i> de los rizobios.....	28
1.12.- Actividades glicosidásicas presentes en el exudado radicular.....	32

1.13.- Las lectinas y el proceso de reconocimiento.....	33
1.14.- Otros componentes macromoleculares del exudado radicular que interaccionan con los rizobios.....	38
1.15.- Polisacaridos de los rizobios.....	39
1.16.- La adsorción de los rizobios a la superficie radicular.....	43
1.17.- Factores que regulan el proceso de asociación simbiótica.....	47
1.17.1.- Factores de regulación propios de los simbioses.....	48
1.17.2.- Factores externos.....	50
1.18.- Conclusiones: La simbiosis fijadora de nitrógeno como un sistema de intercambio de señales entre la bacteria y la planta.....	52
1.19.- Objetivos de esta tesis.....	56

SEGUNDA PARTE

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS.....	58
2.1.- Medios de mantenimiento y cultivo de cepas y de incubación de bacterias y plantas.....	59
2.2.- Bacterias.....	60
2.3.- Leguminosas, esterilización y germinación de semillas.....	60
2.4.- Obtención del exudado radicular.....	61
2.5.- Preparación de aglutinina de semilla.....	63
2.5.1 - Ensayo de aglutinación de bacterias.....	63
2.6 - Ensayo de adsorción bacteriana a las raíces.....	64
2.6.1 - Adsorción total.....	64
2.6.2 - Adsorción específica.....	65
2.7 - Ensayos de nodulación.....	66

2.8 - Preincubación de las bacterias.....	67
2.8.1 - Preincubación de los rizobios en medio mineral.....	68
2.8.2 - Preincubación de los rizobios en exudado radicular.....	68
2.8.2.1 - Determinación del efecto de preincubación de los rizobios sobre su posterior adsorción a las raíces.....	68
2.8.2.2 - Determinación del efecto de preincubación de los rizobios sobre el comportamiento de los mismos en la nodulación de raíces de alfalfa.....	69
2.8.3 - Preincubación de los rizobios con aglutinina de semilla y determinación de su efecto sobre la adsorción de los rizobios a las raíces y nodulación de las mismas.....	69
2.9 - Pretratamiento del exudado radicular con rizobios.....	70
2.10 - Procedimientos de caracterización de la actividad biológica estimulante de la adsorción de los rizobios a las raíces.....	70
2.10.1 - Tratamientos térmicos.....	70
2.10.2 - Tratamiento con tripsina.....	71
2.10.3 - Tratamientos con resinas intercambiadoras de iones.....	71
2.10.4 - Análisis de proteínas en el exudado radicular y métodos de concentración.....	73
2.10.5 - Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	73

TERCERA PARTE

ESTUDIO DE INTERACCIONES TEMPRANAS ENTRE *Rhizobium meliloti* Y LAS RAICES DE ALFALFA.

CAPITULO 3

CURSO TEMPORAL DE LA ADSORCION DE LOS RIZOBIOS A LAS RAICES.....	78
--	----

CAPITULO 4

PREINCUBACION DE LOS SIMBIOTES EN MEDIO MINERAL. EFECTOS SOBRE LA POSTERIOR ADSORCION DE <i>Rhizobium meliloti</i> A LAS RAICES DE ALFALFA.....	82
4.1 - Intentos de acondicionamiento del microsimbionte.....	83
4.2 - Pretratamiento de las raíces.....	86

CAPITULO 5

PREINCUBACION DE <i>Rhizobium meliloti</i> CON EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA: EFECTOS SOBRE LA INTERACCION DE LOS RIZOBIOS CON LAS RAICES.....	88
5.1 - Estudio del efecto de preincubación de <i>R. meliloti</i> con exudado radicular de alfalfa sobre la posterior adsorción de los rizobios a las raíces.....	89
5.2 - Eliminación de la actividad estimuladora presente en el exudado radicular de alfalfa, por pretratamiento del mismo con rizobios.....	100
5.3 - Influencia del estado de crecimiento de los rizobios en la interacción de <i>R. meliloti</i> con el exudado radicular de alfalfa.....	103
5.4 - Preincubación de <i>R. meliloti</i> L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa: Efectos sobre la nodulación temprana de raíces de alfalfa.....	107

CAPITULO 6

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA ENCONTRADA EN EL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA.....	114
6.1 - Caracterización bioquímica del factor activo.....	115
6.1.1 - Diálisis.....	115
6.1.2 - Tratamientos térmicos.....	115
6.1.3 - Determinación de la naturaleza proteica del factor activo: tratamiento con tripsina.....	118
6.1.4 - Concentración y purificación del factor activo.....	122
6.2 - Efecto del agregado de NO_3^- al medio de crecimiento de las plantas sobre la actividad estimuladora del exudado radicular.....	129

CAPITULO 7

LA INTERACCION <i>Rhizobium meliloti</i> - FACTOR PROTEICO DEL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA COMO UN EVENTO MUY TEMPRANO DE RECONOCIMIENTO ENTRE LOS SIMBIONTES.....	132
7.1 - Expresión de la especificidad simbiótica en la interacción entre el exudado radicular dializado de alfalfa y <i>R. meliloti</i>	133
7.2 - Participación de la interacción entre <i>R. meliloti</i> y la proteína del exudado radicular de alfalfa en los procesos que determinan el modo de adsorción específica de <i>R. meliloti</i> a las raíces de alfalfa.....	138

CAPITULO 8

REQUERIMIENTOS GENETICOS DE <i>Rhizobium meliloti</i> PARA INTERACTUAR CON EL FACTOR PROTEICO DEL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA.....	144
8.1 - Estudio del comportamiento de diferentes mutantes de nodulación de <i>R. meliloti</i> en su interacción con el factor proteico del exudado radicular de alfalfa.....	145
8.2 - Comportamiento de mutantes de movilidad alterada.	156

CAPITULO 9

PREINCUBACION DE <i>R. meliloti</i> L5-30 CON AGLUTININA DE SEMILLAS DE ALFALFA. EFECTOS SOBRE LA ADSORCION DE LOS RIZOBIOS A LAS RAICES Y LA NODULACION DE LAS MISMAS.....	163
---	-----

CUARTA PARTE**CAPITULO 10**

CONCLUSIONES FINALES.....	172
APENDICE.....	180
BIBLIOGRAFIA.....	184

INDICE DE TABLAS

1. Preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa: Efecto sobre la posterior adsorción de los rizobios a las raíces de alfalfa.....95
2. Estimulación de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a raíces por preincubación de los rizobios con exudado radicular dializado de alfalfa: concentración limitante del factor en las preparaciones de exudado radicular.....98
3. Efecto de la preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa, sobre la formación de nódulos precoces.....109
4. Preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado de semillas de alfalfa o con luteolina: efectos sobre su posterior adsorción a las raíces.....121
5. Efecto del estado de nutrición nitrogenada de las plantas sobre la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa.....130
6. Estudio de la especificidad de la actividad estimuladora del exudado radicular sobre la adsorción de los rizobios utilizando dos sistemas simbióticos no compatibles, en forma cruzada.....134
7. Actividad estimuladora remanente en el exudado radicular dializado de alfalfa luego de su pretratamiento con diferentes especies de rizobios.....136
8. Preincubación de *R. meliloti* L5-30-1 (Rif^r) con exudado radicular dializado de alfalfa: Efecto sobre la posterior adsorción de los rizobios a las raíces de alfalfa, en presencia de concentraciones saturantes de rizobios homólogos y heterólogos.....139
9. Cepas y plásmidos utilizados en los ensayos de caracterización de los requerimientos genéticos de *R. meliloti* para su interacción con el factor del exudado radicular de alfalfa que estimula la adsorción rizobiana a las raíces.....146
10. Efectos de la preincubación de diferentes mutantes de *R. meliloti* con exudado radicular dializado de alfalfa sobre su posterior adsorción a raíces.....148
11. Eliminación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa por pretratamiento del mismo con una suspensión de bacterias. Comportamiento de diferentes mutantes de *R. meliloti*.....149
12. Preincubación de *Agrobacterium tumefaciens* -conteniendo genes del pSym de *R. meliloti*- con exudado radicular dializado de alfalfa: efectos sobre su posterior adsorción a las raíces.....151

13. Eliminación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa por pretratamiento del mismo con una suspensión de bacterias. Comportamiento de *Agrobacterium tumefaciens* complementada con genes del pSym de *R. meliloti*.....152
14. Efectos de la preincubación de diferentes mutantes de movilidad de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa sobre su posterior adsorción a raíces.....159
15. Efectos de la preincubación de un mutante no flagelado de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa sobre su posterior adsorción a raíces, para incubaciones finales con las plantas más prolongadas.....161
16. Efecto de la preincubación de *R. meliloti* L5-30 con aglutinina de semillas de alfalfa sobre su posterior adsorción a las raíces y sobre la formación de nódulos precoces.....166

INDICE DE FIGURAS

1. Curso temporal de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a la superficie radicular de alfalfa.....80
2. Preincubación de *R. meliloti* L5-30 en medio de Fahraeus: efectos sobre su posterior adsorción a las raíces de alfalfa.....84
3. Preincubación de *R. meliloti* L5-30 en medio de Fahraeus y efectos sobre su posterior adsorción a las raíces de alfalfa: comportamiento de bacterias previamente lavadas.....85
4. Preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular crudo de alfalfa: efectos sobre su posterior adsorción a las raíces.....91
5. Curso temporal de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a la superficie radicular de alfalfa: efecto de la preincubación de los rizobios con exudado radicular dializado de alfalfa.....97
6. Eliminación de la actividad estimuladora presente en el exudado radicular de alfalfa por su pretratamiento con *R. meliloti*: dependencia con la concentración de los rizobios.....102
7. Efecto de la edad del cultivo en la estimulación de la adsorción de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa por preincubación de los rizobios con exudado radicular.....104
8. Eliminación de la actividad estimuladora presente en el exudado radicular de alfalfa por su pretratamiento con *R. meliloti*: influencia de la edad del cultivo de los rizobios.....106

9. Perfiles de nodulación de raíces de alfalfa inoculadas con *R. meliloti* L5-30. Efectos de la preincubación de los rizobios con exudado radicular.....112
10. Efecto de la diálisis del exudado radicular de alfalfa sobre su actividad estimuladora de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a las raíces.....116
11. Diferentes tratamientos térmicos del exudado radicular dializado de alfalfa: efectos sobre su actividad estimuladora de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a las raíces.....117
12. Eliminación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa por pretratamiento con tripsina.....120
13. Análisis de una muestra concentrada de exudado radicular de alfalfa por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....123
14. Separación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa utilizando resinas de intercambio iónico, recuperación de la actividad.....125
15. Separación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa por tratamiento en batch con S-Sepharosa y elución posterior con un gradiente salino.....127
16. Eliminación de la actividad estimuladora presente en el exudado radicular de alfalfa por su pretratamiento con *R. meliloti*, comparación con la inhibición de la adsorción de *R. meliloti* a raíces de alfalfa por competición con una cepa homóloga.....140
17. Adsorción de *R. meliloti* L5-30-1 preincubada con exudado radicular de alfalfa a raíces homólogas o heterólogas competida por la presencia de una cepa homóloga.....143
18. Curso temporal de la adsorción específica de mutantes con la movilidad alterada de *R. meliloti* a la superficie radicular de alfalfa.....157
19. Perfiles de nodulación de raíces de alfalfa inoculadas con *R. meliloti* L5-30. Efectos de la preincubación de los rizobios con aglutinina de semillas de alfalfa.....167
20. Análisis de la preparación de aglutinina de semillas de alfalfa por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.....169

PRIMERA PARTE

CAPITULO 1

LAS INTERACCIONES BACTERIA - PLANTA EN LOS SISTEMAS SIMBIOTICOS FIJADORES DE NITROGENO Rhizobium-LEGUMINOSAS.

1.1. - ALGUNAS CONSIDERACIONES GENERALES Y REFLEXIONES SOBRE EL PROCESO DE FIJACION BIOLÓGICA DE NITRÓGENO.

En el ciclo biológico del nitrógeno actúan entre otros, diversos procesos bióticos y abióticos de fijación del nitrógeno molecular proveniente de la atmósfera que producen formas asimilables de N utilizadas por las plantas y microorganismos, y a través de ellos, por otros organismos. Dentro de estos procesos, la fijación biológica del nitrógeno atmosférico llevada a cabo por diferentes microorganismos de vida libre o asociada a ciertas plantas -principalmente de la familia de las *Leguminosae*-, cumple un papel preponderante.

El ciclo del nitrógeno se cierra con diferentes formas de eliminación y desasimilación del nitrógeno combinado en los constituyente de los organismos vivos. Estos otros procesos llevan por último a restituir el nitrógeno molecular.

Es una situación paradójica para el punto de vista humano utilitario, que el nitrógeno, uno de los elementos más abundantes de la biosfera, sea tan inaccesible o complicado de asimilar por los organismos vivos. Aparece así la fijación biológica de nitrógeno como un importante objeto de reconocimiento y estudio.

Este reconocimiento puede remontarse a 300 años A.C. cuando los Romanos utilizaban la rotación de cultivos con leguminosas en sus prácticas agrícolas, una técnica aún hoy utilizada para una mejor reposición de la fertilidad de los suelos, si bien con mayores fundamentos teóricos que en la antigüedad.

Descubierto el gas nitrógeno por Daniel Rutherford en 1772, en 1838 Boussingault determinó que las leguminosas aumentan su cosecha a expensas del nitrógeno atmosférico. En 1878 Bary introdujo el término simbiosis y en 1885 el mismo es utilizado por Schindler para referirse particularmente a los nódulos de las raíces de las leguminosas, como una simbiosis entre las bacterias que se observan dentro de los nódulos y la planta. Fue en 1888 cuando dos descubrimientos marcaron un hito en la historia de la fijación biológica de nitrógeno: por una parte Hellriegel y Wilfarth demostraron que la fijación del N_2 por las leguminosas depende de las bacterias contenidas en los nódulos; independientemente, Beyerinck

consiguió aislar y cultivar bacterias de los nódulos de raíces de leguminosas y mostrar que estas bacterias poseían la capacidad de producir nódulos radiculares en nuevas plantas. En 1890 Prazmowski describió por primera vez las bacterias dispuestas sobre un pelo radicular, formando colonias distinguibles. Este autor observó además que esas regiones de los pelos radiculares se deformaban como un tirabuzón en el que eran atrapadas las bacterias, deformación hoy denominada como estructura en cayado de pastor o rulo. En la misma época se introdujo el concepto de especificidad en la formación de nódulos de leguminosas, por las bacterias: ya en 1892 Hellriegel en una carta a beyerinck (citada por este en 1918; véase Gallon y Chaplin, 1987; Quispel, 1988) daba resultados en apoyo de esta idea.

A más de un siglo de los principales descubrimientos, en la actualidad los resultados de los estudios básicos sobre la fijación simbiótica de nitrógeno constituyen un mosaico cuyas diferentes piezas tratan de describir, en términos de fenómenos moleculares y citológicos, los mecanismos de la asociación selectiva entre los simbioses y las diferentes etapas en que ésta se desarrolla para culminar en la formación del nódulo fijador de nitrógeno.

De acuerdo a los datos históricos surge que antes de la década del 1880 la fijación biológica del nitrógeno se presentaba como un área de estudio con estructura preparadigmática, dentro de la biología. Los hechos que se produjeron en la década de 1880 dieron lugar a la instauración del paradigma de la Fijación Biológica de Nitrógeno.

Un paradigma se constituye por las realizaciones científicas que carecen suficientemente de precedentes como para poder atraer a un grupo de partidarios, y que son lo bastante incompletas para dejar muchos enigmas por resolver. Una vez aceptado un paradigma, la resolución de enigmas dentro del mismo constituye una empresa acumulativa tanto en alcance como en la precisión de los conocimientos.

Para Kuhn, ciencia normal es investigación científica basada firmemente en una o más realizaciones científicas pasadas, que alguna comunidad científica reconoce durante un cierto tiempo como fundamento para su práctica posterior. Esta ciencia normal no tiende hacia novedades fácticas o teóricas. Su éxito radicaría en no descubrir ninguna. Sin embargo la investigación científica produce descubrimientos que significan la

percepción de anomalías en el paradigma. El gradual y simultáneo reconocimiento de estas anomalías, tanto conceptuales como observacionales y el cambio consiguiente de las categorías y procedimientos del paradigma, van acompañados a menudo por resistencia. Es importante indicar que existirían en este proceso de descubrimiento características propias de la percepción psicológica del hombre. Cuando estas anomalías son muy importantes pueden llevar a una crisis dentro de la ciencia normal, la cual finalmente se resuelve cuando en forma no acumulativa un antiguo paradigma es reemplazado completamente o en parte por otro nuevo e incompatible, constituyendo este hecho histórico una revolución científica (Kuhn, 1971). En el caso de la fijación biológica del nitrógeno es difícil reconocer cual haya sido el paradigma anterior que resultó reemplazado por el nuevo. Justamente la falta de ese paradigma anterior es lo que me lleva a considerar estos hechos históricos como constituyentes de una particular revolución científica en el terreno de las ciencias biológicas.

1.2. - SISTEMAS FIJADORES DE NITROGENO.

La fijación biológica de nitrógeno es una actividad propia del reino de los procariotes. Los organismos fijadores de nitrógeno o diazotróficos tienen en común sólo el ser procariotes y poseer el sistema enzimático de la nitrogenasa. Entre los géneros de bacterias diazotróficas (*Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Acetobacter*, *Derxia*, *Beijerinckia*, *Rhodospirillum*, *Rhodopseudomonas*, *Thiobacillus*, *Methylosinus*, *Xanthobacter*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium*, entre otros) se encuentran los más diversos tipos de formas metabólicas, desde anaerobios estrictos hasta aerobios obligados, fototróficos, quimiotróficos y heterotróficos. También existe entre estos microorganismos una amplia variedad de formas de vida en las que tiene lugar la fijación de nitrógeno. Existen fijadores de vida libre (ej: *Klebsiella*); fijadores que aparecen en la rizosfera de las plantas o en la superficie de las hojas en asociaciones que pueden ser laxas e inespecíficas o presentar una cierta especificidad o selección, llamadas simbiosis asociativas o biocoenosis (ej: *Azospirillum* en la rizosfera de algunos cereales); y finalmente los fijadores simbióticos, donde ambos asociados

(planta y microorganismo) contribuyen al proceso de fijación de nitrógeno, involucrando considerables diferenciaciones morfológicas y bioquímicas en ambos simbioses (ej: nódulos radiculares en las simbiosis rizobio-leguminosa o Frankia-otras plantas) (Gallon y Chaplin, 1987).

Los sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno resultan de suma importancia en el campo de la agricultura, pues las leguminosas son fuente de proteínas vegetales para la alimentación humana (ej: soja, porotos, arvejas, lentejas, etc) y se utilizan como forraje para la alimentación animal (ej: soja, trébol, alfalfa). En los sistemas simbióticos se pueden reconocer entre otros los siguientes tipos: aquéllos que involucran asociaciones entre bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* y leguminosas (aunque se han descrito asociaciones de rizobios con la no-leguminosa *Parasponia*); asociaciones que involucran al actinomicete *Frankia* spp y angiospermas no-leguminosas; y La asociación *Anabaena* - *Azolla*. Un aspecto común a estos diferentes tipos de simbiosis es la formación de estructuras especializadas, como las que ocurren en la raíz (y excepcionalmente en el tallo) de las leguminosas, llamadas nódulos.

1.3. - ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS RIZOBIO-LEGUMINOSA.

En las simbiosis rizobio-leguminosa el nódulo fijador de nitrógeno es la expresión fenotípica de la asociación de los dos genomas. La bacteria y la planta se influyen recíprocamente a lo largo de una serie de complejos pasos de desarrollo, en actividades fundamentales como la división celular, expresión de genes, funciones metabólicas y morfogénesis celular (Long, 1989a).

El comienzo de la asociación debe buscarse en la situación que presenta a los simbioses en vida libre, siendo su culminación el nódulo activo. El proceso de asociación puede interpretarse como una serie de múltiples eventos o etapas, cuya complejidad permite muchas posibilidades de regulación del sistema. Estas etapas estarían caracterizadas por interacciones entre ambos simbioses a través del intercambio de señales moleculares que permitirían el reconocimiento celular y conducirían a las diferenciaciones necesarias para la exitosa formación del nódulo (Bauer, 1981; Halverson y Stacey, 1986b).

Esquemático en su forma más simple, el curso de la asociación simbiótica puede dividirse arbitrariamente en 3 etapas: 1) preinfección, 2) infección y desarrollo del nódulo, y 3) funcionamiento del nódulo.

1.3.1. - LA PREINFECCION.

Esta etapa incluye los fenómenos reconocidos de: colonización rizosférica con la concomitante multiplicación de los rizobios en la superficie radicular; quimiotaxis hacia determinadas zonas de la raíz; adsorción a la superficie radicular y a los pelos radiculares; deformación, ramificación y marcado enrulado de pelos radiculares (Vincent, 1980). Se puede incluir dentro de esta etapa la rediferenciación celular de las células corticales de la raíz que conducen a la organogénesis nodular.

Las características de estos eventos serán consideradas con más extensión en los puntos 1.7. a 1.17.

1.3.2. - LA INFECCION Y DESARROLLO DEL NODULO.

El proceso de penetración de los rizobios en la raíz y el desarrollo del nódulo parecen comenzar en forma simultánea y citológicamente se presentan como procesos concurrentes.

Los diversos estudios realizados en sistemas fijadores de nitrógeno muestran que existen diferentes mecanismos de infección y diferentes tipos histológicos de nódulos. De todos modos, pueden considerarse dos grandes grupos: la nodulación de leguminosas de clima templado (alfalfa, trébol, arveja) que conduce a la formación de nódulos llamados de crecimiento indeterminado, con un sistema vascular abierto y la existencia de una zona meristemática apical de células en división; y la nodulación de leguminosas de climas tropicales (poroto, soja) que produce nódulos de crecimiento determinado, con un sistema vascular cerrado y la ausencia de una zona meristemática (Sprent, 1979; Rolfe y Shine, 1984). La siguiente es una descripción del proceso de infección y nodulación de una planta de clima templado, que forma nódulos de crecimiento indeterminado.

Los rizobios atrapados en el rulo (la axila del cayado de pastor) del pelo radicular penetran en la raíz mediante la formación de una

estructura llamada hilo de infección en la que se alojan, la cual avanza hacia el interior de la célula del pelo radicular siguiendo al núcleo de la misma, para luego atravesar su base y continuar su penetración a través de las capas corticales de la raíz a la vez que se va ramificando.

En forma previa a estos procesos, e inducido por los rizobios aún fuera de la raíz, un núcleo de rediferenciación celular con activa mitosis, se ha originado en el cortex interno de la raíz. Este nuevo tejido meristemático crece hasta ser invadido por el hilo de infección. En estas células rediferenciadas y especializadas (probablemente relacionadas con la síntesis de las nodulinas tempranas, ver sección 1.17.) los rizobios son liberados al citoplasma rodeados de una membrana de origen vegetal que constituirá la membrana peribacteroidea. De este modo se origina la zona de tejido simbiótico del nódulo (Vincent, 1980; Dudley et al, 1987; Kondorosi y Kondorosi, 1986).

La inducción por los rizobios de la división celular en la raíz (que depende de los genes bacterianos -ver más adelante sección 1.5-), sería causada por un "principio inductor del nódulo" difusible, según lo indican estudios citológicos realizados con mutantes de *R. meliloti* incapaces de formar el hilo de infección o de ser liberados dentro de las células huésped (Truchet et al, 1980; Finan et al, 1985). Este principio inductor pudo ser reemplazado con la producción de citoquininas -zeatina- en un mutante no nodulante de *R. meliloti* (Long y Cooper, 1988). Esta última observación apoya la hipótesis de la existencia de una señal difusible que puede ser producida por los rizobios libres, aún fuera de la planta, capaz de inducir a distancia los centros de división celular en el cortex interno de la raíz.

Es importante destacar que como ha sido encontrado por Truchet et al (1988), la planta puede por sí sola inducir la formación de estructuras radiculares similares a los nódulos en total ausencia de bacterias, en un lapso de dos meses. Estos resultados llevaron a determinar que la planta posee toda la información necesaria para formar estas estructuras, proceso que es obviamente inducido con mayor eficiencia y rapidez por la acción de rizobios infectivos (Truchet et al, 1989). Estas estructuras no infectadas por bacterias, y que son similares a los nódulos verdaderos, pueden ser inducidas también por mutantes no infectivos de *Rhizobium* y han sido referidos con el término de falsos nódulos, pseudonódulos o nódulos vacíos.

La forma de penetración de los rizobios estaría determinada por el huésped; puede ocurrir a través de los pelos radiculares, pero en ciertos casos como en el maní y de *Stylosanthes* puede suceder por espacios intersticiales entre células epidérmicas (Rolfe y Shine, 1984).

La biogénesis del hilo de infección fue originalmente explicada como un proceso de invaginación de la pared celular cuyo crecimiento hacia adentro estaría dirigido por el rizobio (Dart, 1974). Actualmente este proceso se interpreta como una penetración de los rizobios a través del hilo de infección por degradación localizada de la pared celular y subsiguiente redeposición de material de pared celular por parte de la célula invadida cerca de la zona afectada (Bakhuizen et al, 1988). En este proceso de infección a través de los pelos radiculares participarían pectinasas capaces de degradar la pared celular de la célula vegetal. Estas pectinasas, más específicamente poligalacturonasas, serían producidas ya sea por la planta inducidas por la presencia del rizobio infectivo (Ljunggren, 1969), o bien por los mismos rizobios (en cuyos cultivos puros han sido detectadas estas enzimas, Lopez y Signer, 1986; Ljunggren, comunicación personal).

1.3.3. - FUNCIONAMIENTO DEL NODULO.

El funcionamiento del nódulo depende de la correcta expresión de las baterías de enzimas que le son propias: el complejo enzimático de la nitrogenasa y otras modificaciones en los bacteroides, los sistemas de transporte de oxígeno (leghemoglobina), los sistemas de asimilación y transporte del nitrógeno fijado, y los sistemas que involucran la translocación de fotosintatos y disponibilidad de nutrientes carbonados provenientes de la hoja. Varias enzimas involucradas en la biogénesis de amidas y ureídos y utilización de carbohidratos han sido detectadas en los nódulos. Muchas de estas proteínas son propias de los nódulos y por eso se las ha llamado nodulinas. Otras son comunes a otras partes de la planta pero son más abundantes en los nódulos (Verma y Nadler, 1984). La razón de la existencia de actividades enzimáticas propias de los nódulos puede buscarse en que este tejido funciona con pH elevado y bajas concentraciones de oxígeno, necesitando entonces sistemas adaptados a estas condiciones únicas o propias del ambiente del nódulo (Verma et al, 1988).

La asparagina y la glutamina constituyen la base del transporte xilemático del nitrógeno fijado en plantas de climas templados. En las plantas tropicales, en cambio, se utilizan los ureídos.

El funcionamiento del nódulo implica muchas veces la expresión coordinada de genes de la planta y de la bacteria. Un ejemplo lo constituye la producción de leghemoglobina. La apoproteína que participa en la formación de la leghemoglobina es una nodulina suministrada por la planta (Legocki y Verma, 1980), mientras que el grupo hemo es sintetizado por la bacteria (Dilworth y Appleby, 1979; Leong *et al*, 1982) (para una mayor discusión sobre las nodulinas ver sección 1.17.1.).

1.4. - ESPECIFICIDAD PARA EL HOSPEDANTE.

La especificidad en la infección de leguminosas por rizobios fue sugerida por Hellriegel en una carta a Beyerinck, citada por éste en 1918 (Quispel, 1988). En 1927, Baldwin se preguntaba por qué los organismos responsables de nodular *Phaseolus lunatus* podían infectar *Vigna unguiculata* y no podían hacerlo los de *Phaseolus vulgaris*, y se respondía que las causas deberían estar en las diferencias entre las plantas y entre las cepas de microorganismos. Existe una anécdota anterior sobre el problema de la especificidad. En 1897 F. Nobbe y L. Hiltner que habían demostrado que los bacteroides de los nódulos eran responsables de fijar el nitrógeno, patentaron la "Nitragina", precursor de los inoculantes, para aumentar el rendimiento de las cosechas. La falta de conocimientos sobre la especificidad para el huésped en las simbiosis rizobio-leguminosas y la falta de experiencia en la técnica de inoculación, llevó a la suspensión del negocio en menos de tres años (Heuman, 1983).

El concepto actual de especificidad en el rango de hospedante de los sistemas *Rhizobium*-leguminosas reconoce diferentes niveles. Primero las bacterias de los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* de la familia de las *Rhizobiaceae* infectan sólo una familia de plantas, las *Leguminosae*, con la excepción hoy conocida de la no leguminosa *Parasponia* (una *Ulmacea*), que es también nodulada por rizobios. Segundo, existen grupos de inoculación cruzada de rizobios y plantas, constituídos por conjuntos de cepas bacterianas (formalmente considerados especies) que nodulan

típicamente a los diversos miembros de un conjunto correspondiente de plantas. Por ejemplo *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* nodula arveja, vicia y lentejas pero no infecta trébol ni alfalfa; *R. leguminosarum* biovar *trifolii* nodula trébol pero no alfalfa ni arveja y *R. meliloti* nodula alfalfa pero no trébol ni arveja. Finalmente existe una estructura fina para el rango de nodulación, tal que determinadas cepas de una especie bacteriana pueden nodular sólo a algunos de los genotipos de su especie hospedante habitual (Long y Erhardt, 1989).

La especificidad simbiótica implica un reconocimiento entre los organismos asociados. El término reconocimiento resulta apropiado cuando una célula u organismo manifiesta una respuesta selectiva o específica a otra célula u organismo, como ocurre en las interacciones entre los rizobios y las raíces de leguminosas (Bauer, 1981).

La especificidad de grupo se manifiesta absolutamente en el proceso de infección y desarrollo del nódulo; sin embargo se cree que el reconocimiento entre simbioses ocurriría ya en etapas previas, dentro del proceso de preinfección, donde ambas partes serían responsables del reconocimiento específico. Es importante tener en cuenta la posibilidad de que los determinantes de especificidad no ocurran necesariamente en igual forma y en los mismos niveles en todos los sistemas rizobio-leguminosa, sino que podrían encontrarse diferencias entre sistemas de otra manera muy relacionados. Por ejemplo, el enrulado marcado del pelo radicular es un síntoma de especificidad en la asociación *R. meliloti*-alfalfa, pero no revela diferencias de especificidad de grupo entre *R. trifolii* y *R. leguminosarum* - actualmente considerados dos biovars diferentes de la misma especie *leguminosarum* con los respectivos nombres *R. leguminosarum* biovar *trifolii* y *R. leguminosarum* biovar *viciae* - ya que ambos producen el enrulado de pelos de trébol (Vincent, 1974).

La expresión de la especificidad en los comienzos de la asociación simbiótica se ha estudiado en las diferentes etapas reconocidas dentro de la preinfección: colonización de la rizosfera; quimiotaxis hacia la raíz; adsorción de los rizobios a la superficie radicular o pelos radiculares; deformación, ramificación y enrulado de los pelos radiculares; e interacciones de los rizobios con diferentes sustancias presentes en el

exudado radicular -entre otros, compuestos flavonoides, enzimas, lectinas-. Estas etapas son discutidas en las secciones siguientes de este capítulo.

Un enfoque que ha dado resultados muy interesantes es el realizado a través del estudio de los genes de nodulación (*nod*) del rizobio. Estos resultados han permitido describir al menos dos mecanismos de reconocimiento específico que involucran a estos genes (ver sección siguiente).

1.5. - GENETICA DE LOS RIZOBIOS RELACIONADA A LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA SIMBIOSIS.

La genética de los rizobios ha avanzado mucho a través de experimentos de mutagénesis con transposon, clonado de recombinantes, transferencia de plásmidos y experimentos de complementación.

Las especies de *Rhizobium* de crecimiento rápido tienen típicamente plásmidos grandes, uno de los cuales lleva la mayoría de los genes simbióticos y es comúnmente designado pSym. El tamaño de éstos varía de 200-300 kb en *R. leguminosarum* a 1200-1500 kb para *R. meliloti*. *R. meliloti* posee dos megaplásmidos, el llamado pSyma y el pSymb (Banfalvi *et al*, 1985); el pSyma lleva los genes *nod*, *fix* y *nif* (Long, 1989a) y el pSymb los genes *exo*, *dct* y de la biosíntesis de tiamina (Trevor y Finan, 1990). Recientes estudios sobre la cepa VF39 de *R. leguminosarum*, curada selectivamente de sus plásmidos, indican que se necesitan al menos tres de los seis plásmidos que posee esta cepa para la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en arveja (Hynes *et al*, 1990). En cambio, en *Bradyrhizobium* los genes simbióticos son aparentemente cromosomales.

Varios grupos de genes simbióticos han sido definidos (Long, 1989a):

nod, genes que determinan la capacidad de las bacterias para producir la nodulación de las raíces en la planta hospedante correcta;

nif, genes de fijación de nitrógeno similares a los encontrados en bacterias fijadoras de vida libre;

fix, genes de fijación simbiótica de nitrógeno, de los que no se conoce análogos en bacterias fijadoras de vida libre;

exo, genes involucrados en la síntesis de polisacárido extracelular o capsular;

dct, genes relacionados con el transporte de ácidos dicarboxílicos en el nódulo;

ndv, genes de localización cromosomal, esenciales para la producción del β -1,2-glucano, polisacárido cíclico;

lps, genes involucrados en la biosíntesis de los lipopolisacáridos, también de localización cromosomal y recientemente clonados (Clover *et al*, 1989; Priefer *et al*, 1989).

Existe un mutante de nodulación de *R. meliloti*, cepa 1028 - derivada de la cepa salvaje 1021-, obtenido por mutación con transposon Tn5, con localización cromosomal, que no corresponde a ninguno de los grupos anteriormente nombrados (Buikema *et al*, 1983). Este mutante produce escasos nódulos vacíos no efectivos en raíces de alfalfa, y presenta un fenotipo de auxotrofia para isoleucina y valina.

Dentro de estos genes simbióticos, los genes *nod* serían los que participan en las etapas más tempranas de las interacciones rizobio-leguminosa, es decir en los eventos del proceso de la preinfección (Rolfe y Greshoff, 1988; Long, 1989a). El otro grupo de genes estudiados que participan también en etapas tempranas, son los relacionados a la síntesis de polisacáridos, los genes *exo* y *lps*. Si bien los productos de estos genes -los EPS y LPS- podrían estar involucrados en las etapas tempranas de reconocimiento (Truchet y Dazzo, 1983, Lagares 1989), el comportamiento de los mutantes *exo* y *lps* se encuentra afectado en el proceso más tardío de la infección del pelo radicular (Long, 1989a) (ver sección 1.15.).

Los genes de nodulación, *nod*, de *Rhizobium* se han definido por secuenciamiento, mutagénesis con transposón y en algunos casos por análisis de proteínas (Long, 1989a). Muchas definiciones surgen de estudios realizados en *R. meliloti*, *R. leguminosarum* y *R. trifolii* (Figura 1). Los diversos genes *nod* difieren en el grado de severidad con que sus mutaciones afectan al proceso simbiótico.

Así, mutantes en los genes *nodABC* son completamente Nod⁻ (no se forma el nódulo), mientras que mutaciones en los otros genes *nod* producen lesiones más leves como el retardamiento en la nodulación o la alteración del rango de hospedante.

Los genes *nod* se encuentran sometidos a regulación y son inducidos -o estimulada su expresión- por moléculas de tipo flavonoide, provenientes

de la planta, a través de la interacción de las mismas con el producto del gen *nodD* (Mulligan y Long, 1985). Estos genes se caracterizan por presentar una secuencia de consenso en su promotor llamada "*nod box*" (Rostas et al, 1986).

Al gen *nodD* se lo considera constitutivo por no depender su expresión de la presencia de flavonas y ser autorregulado (Rossen et al, 1985). En *R. meliloti* existen tres copias de este gen llamadas D₁, D₂ y D₃ (Honma y Ausubel, 1987, Györgypal et al, 1988). Recientemente se ha descrito en *R. meliloti* a los genes activadores de los genes *nod* como una familia en la que participarían además de los genes *nodD*, otros genes como el *Syrm* (Mulligan y Long, 1989)

No es muy claro el rol de las flavonas en la inducción de genes *nod* vía *nodD*. su presencia es necesaria para producir la estimulación de la expresión de los genes *nod*, pero se desconoce aún su mecanismo de acción. Se ha descrito que un inductor de genes *nod* de *R. leguminosarum*, la naringenina, se acumula en la membrana citoplasmática del rizobio, en una forma independiente del metabolismo celular, pero dependiente del pH. De estos resultados surge un modelo de acción del inductor que se acumula en su forma no iónica en la membrana, donde se encuentra localizado el producto del gen *nodD* que sería de algún modo activado por la sustancia proveniente de la planta (Recourt et al, 1989).

En relación al modo de participación del gen *nodD*, un análisis de su secuencia ha revelado la existencia de una secuencia de aminoácidos característica de los dominios que presentan las proteínas que se unen a ADN (Shearman et al, 1986). Posteriormente fue efectivamente demostrado que el producto del gen *nodD* interacciona con el promotor de los otros genes *nod*, en ausencia del inductor (Fisher et al, 1988).

Un descubrimiento importante es que el gen *nodD* actuaría también como factor determinante en el reconocimiento simbiótico a través de su interacción específica con los compuestos liberados por la planta. Los alelos del gen *nodD* de diferentes especies responden en forma diferencial a diferentes conjuntos de flavonoides y exudados radiculares (Horvath et al, 1987; Spaink et al, 1987). Estudios utilizando exudados crudos de semillas de diferentes especies, todas ellas capaces de ser noduladas por *R. meliloti*, determinaron que existen factores específicos de especie que

interaccionan en forma diferencial con los distintos alelos *nodD*₁, *nodD*₂ y *nodD*₃ (Györgypal *et al*, 1988). Trabajos posteriores encontraron que los diferentes alelos *nodD*₁ y *nodD*₂ responden en forma diferencial a las diferentes sustancias inductoras de los genes *nod* liberadas por las semillas y las raíces de alfalfa (Hartwig *et al*, 1990a, Maxwell *et al*, 1990): mientras *nodD*₁ produce la inducción de genes *nod* por acción de todas las sustancias identificadas en exudados de raíz o semilla, el gen *nodD*₂ interactúa principalmente con sólo una de ellas (ver sección 1.11.).

Los genes *nodABC* se requieren para que los rizobios induzcan en la raíz la división celular (Dudley *et al*, 1986) y la deformación de pelos radicales (Djordjevic *et al*, 1985; Kondorosi *et al*, 1984; Rossen *et al*, 1984; Bender *et al*, 1987). Justamente la mutación en estos genes produce la ausencia de la deformación y el enrulado de los pelos y el no inicio de la división celular en la corteza interna de la raíz, cuando se estudia las respuestas de raíces inoculadas con estos mutantes. Ahora si bien estos eventos son específicos para el hospedante, los genes *nod ABC* resultan ser intercambiables entre diferentes especies de rizobios. Una explicación para esta paradoja es que estos genes podrían codificar para la producción de una señal básica, común a las diferentes especies de rizobios, que sería luego modificada para convertirse en una señal específica. Un caso en que esta hipótesis ha sido demostrada es el descubrimiento de la señal deformadora de pelos radicales específica para alfalfa producida por *R. meliloti*, encontrada por el grupo de Dénarié y col. (Faucher *et al*, 1988) (ver más adelante).

Los productos de los genes *nodA* y *nodB* son proteínas citosólicas de 21 kDa y 23.8 kDa respectivamente (Egelhoff y Long, 1985; Schmidt *et al*, 1988). En comparación con los productos de *nodA* y *nodC*, el producto del gen *nodB* se sintetiza en cantidad muchas veces menor. Las proteínas de *nodA* y *nod B* estarían involucradas en la producción de una sustancia pequeña, termoestable, que estimula la mitosis de protoplastos de la planta (Schmidt *et al*, 1988), propiedades que permiten suponer una relación con el principio inductor de la división celular en el meristema radicular.

La proteína de 46.8 kDa codificada por el gen *nodC* posee localización transmembranal, presentando un dominio hidrofóbico cerca del extremo C-terminal, y una extensa región extracelular que posee el N-

terminal, con un sector rico en cisteínas (John et al, 1988). Esta proteína que existiría en la membrana como dímero, es esencial para la nodulación. El agregado de anticuerpos obtenidos contra una proteína de fusión del *nodC* con el represor cI de fago lambda, al medio de crecimiento de las raíces o al inóculo, inhibe fuertemente la nodulación por los rizobios. Un análisis de la secuencia del gen *nodC*, muestra grandes similitudes con receptores de superficie. Esta proteína sería procesada dentro del nódulo, pues se han encontrado formas truncadas de la misma, asociadas a bacteroides (John et al, 1988).

A diferencia de los genes *nodABC*, los operones *nodH* y *nodFEG* de *R. meliloti*, y los *nodFE* y *nodLMN* de *R. leguminosarum* están involucrados en la especificidad de hospedante y se los ha denominado genes *nod* específicos o *hsn* (host specific nodulation).

Bacterias con mutaciones (inserciones) en los genes *nodFEG* y *nodH* en *R. meliloti* producen reacciones anómalas en los pelos radiculares de su hospedante alfalfa y deformaciones y hasta marcado enrulado de los pelos en el hospedante heterólogo trébol blanco. (Debelle et al, 1986; Horvath et al, 1986). Similares resultados se encontraron con las mutaciones en los llamados *nodLMN* en *R. leguminosarum* o *R. trifolii* (Djordjevic et al 1987). Este tipo de genes no son conservados dado que alelos de diferentes especies no pueden ser intercambiados sin alterar el rango de hospedante. Las funciones de estos genes son todavía poco conocidas. Dado que en algunos casos la mutación de estos genes amplía o modifica el rango de hospedante, algunos autores consideran a los mismos como genes de avirulencia para hospedantes heterólogos (Debellé et al, 1986; Faucher et al, 1989). Por estas razones se los ha llamado a estos genes *nod* específicos o *hsn* (host specific nodulation).

El producto del gen *nodF* de *R. leguminosarum* codificaría para una proteína transportadora de grupos acilos, según se deduce del análisis y comparación de la secuencia de nucleótidos (Shearman et al 1986).

Se ha podido demostrar que los genes *nodFE* de *R. trifolii* determinan la producción de polisacáridos de superficie específicos, capaces de interaccionar con la lectina trifollina A presente en la superficie de los pelos radiculares de trébol (Philip-Hollingsworth et al, 1989).

Otro gen de especificidad se ha encontrado en *R. leguminosarum* cepa TOM que se caracteriza por nodular una variedad de arveja primitiva, llamada Afghanistan. El gen responsable de conferir esta propiedad a los rizobios se ha denominado *nodX* (Davis *et al*, 1988). Este gen codifica para una proteína muy hidrofóbica. Es interesante que su ausencia o mutación no altera la capacidad de *Rhizobium leguminosarum* de nodular variedades comerciales de arveja; únicamente modifica el rango de hospedante excluyendo a la variedad primitiva de arveja.

En el genoma de *R. meliloti* entre los grupos de genes *nodABC* y los genes de especificidad se encuentran interacladas dos regiones llamadas IIa y IIb cuyas mutaciones producen fenotipos de nodulación retardada acompañada de un profuso enrollado de pelos y producción de hilos de infección (Debellé *et al*, 1986).

En la región IIa se han encontrado dos marcos de lectura abiertos que se han denominado *nodI* y *nodJ*. Estos genes que se encuentran a la derecha del gen *nodC* se han hallado en *R. meliloti* y en *R. leguminosarum*. El análisis de secuencia de los genes *nodI* y *nodJ* de *R. leguminosarum* sugiere que el producto del gen *nodI* estaría relacionado a proteínas que unen ATP, del tipo de las que participan en los procesos de transporte activo en bacterias. El producto del gen *nodJ* resultaría ser una proteína muy hidrofóbica, probablemente interna de membrana (Evans y Downie 1986).

La región IIb presenta dos marcos de lectura abiertos denominados *nodP* y *nodQ*. Esta región IIb es necesaria para poder transferir a *R. trifolii* la habilidad de enrollar pelos radiculares de alfalfa; una mutación en esta región extiende el rango de huésped de *R. meliloti* a *Vicia sativa*; y también esta región se encuentra involucrada en la dominancia de los genes *nod* de *R. meliloti* sobre los de *R. leguminosarum* (Cervantes *et al*, 1989). El análisis de la secuencia del gen *nodQ* revela similitudes con factores de iniciación y elongación propios del proceso de traducción y síntesis de proteínas (Cervantes *et al*, 1989).

En *R. leguminosarum* se ha descrito recientemente un nuevo gen *nodO* ubicado a la izquierda del gen *nodD*, que codifica para una proteína rica en glicina y aspártico, la cual se exporta al medio sin ser modificado su extremo N-terminal y que es capaz de unir Ca^{+2} (Economou *et al*, 1990). La mutación de este gen *nodO* no produce alteraciones significativas en la

nodulación de vicia o arveja, pero tiene efectos severos cuando se suma a una mutación en el gen *nodE* (Economou et al, 1990), lo que sugiere mecanismos concurrentes o potenciados en el accionar de estos genes.

Otros productos génicos inducibles por compuestos flavonoides han sido detectados en los rizobios, aunque su función es aún desconocida, entre ellos una proteína de 50 kDa que se excreta al medio de cultivo (de Maagd et al, 1988). No se sabe aún si esta proteína es la misma que la codificada por el gen *nodO*; es posible que ello sea así, dado que las mutaciones descritas por de Maagd et al que eliminan la producción de la proteína de 50kDa caen en la zona descrita para el gen *nodO* (Economou et al, 1990). Esta proteína resulta importante para la nodulación dependiendo de la cepa de rizobios y de la planta hospedante ensayados (de Maagd et al, 1989), comportándose como un gen de especificidad muy restringida, al modo del gen *nodX* citado más arriba.

Existe otra proteína de 24 kDa, de localización citosólica, que no se detecta en bacteroides, y que está codificada por genes cercanos a los genes *nod*, a los que se ha denominado *rhi*, pues se cree que estas proteínas se expresarían en la rizosfera (Dibb et al, 1984; Economou et al, 1989).

Estudios independientes muestran que *R. leguminosarum* produce un factor dependiente de los genes *nodABC* que provoca el acortamiento y engrosamiento de la raíz y deformación de los pelos radicales en su hospedante vicia (Zaat et al, 1987). Un factor similar es producido por *R. meliloti* (Faucher et al, 1988). Este factor de *R. meliloti* induce además la deformación de los pelos radicales de alfalfa en forma específica. El factor requiere de los genes *nodABC* pero además es modificado para actuar específicamente sobre alfalfa por acción del gen *nodH* de *R. meliloti* (Faucher et al, 1988). La falta de este último gen en *R. meliloti* determina que este rizobio produzca un factor que es inactivo sobre alfalfa pero activo sobre vicia. La contraprueba se encontró al incorporar a *R. leguminosarum* (que posee los genes comunes *nodABC*) los genes *nodH* y *nodQ* de *R. meliloti*. De este modo, en relación a su hospedante, *R. leguminosarum* se convirtió en un homólogo de *R. meliloti* ya que adquirió la capacidad de infectar y nodular alfalfa, y producir un factor deformador de pelos activo sobre alfalfa, perdiendo simultáneamente su capacidad de interactuar con las raíces de vicia (Faucher et al, 1989).

Esta sustancia deformadora de los pelos radiculares específica para alfalfa ha sido finalmente identificada como un β -1,4 tetrasacárido de glucosamina, sulfatado y sustituido por grupos acetilos y un grupo acilo de un ácido graso de C_{16} con dos insaturaciones, y se la ha denominado NodRm-1 (Lerouge et al, 1990). Estos resultados constituyen uno de los mayores éxitos en el estudio de las bases genéticas de los mecanismos de reconocimiento entre los simbioses.

Existen antecedentes sobre sustancias deformadoras de los pelos radiculares con diferentes características moleculares y diferentes orígenes (ver sección 1.15.), quizás algunas de ellas relacionadas con ese factor NodRm-1. En los sistemas *Rhizobium*-leguminosas existirían sustancias termosensibles y no dializables producidas por las bacterias que actúan como inductores o activadores en la planta, la que a su vez produce otra sustancia termoestable -y también nodializable- que estaría involucrada en el fenómeno de la morfología anormal de los pelos radiculares durante el proceso de asociación simbiótica (Ljunggren, 1969). Por otra parte en sobrenadantes de cultivos de *R. trifolii* se han encontrado factores deformadores de los pelos radiculares que pueden fraccionarse en sustancias de alto y bajo peso molecular y que pueden ser también termoestables o termosensibles (Bhuvaneswari y Solheim, 1985; Erwin y Hubbell, 1985).

Un aspecto que resulta muy interesante es la posibilidad de expresión de genes de *Rhizobium* en otros organismos relacionados. Los géneros *Agrobacterium* y *Phyllobacterium* pertenecientes a la familia *Rhizobiaceae* permiten este tipo de construcciones quiméricas (Truchet et al, 1984; van Veen et al, 1988). La introducción de regiones del pSym conteniendo los genes *nod* de *R. meliloti* en *A. tumefaciens* permite la nodulación de alfalfa por este último a través de una infección atípica (Truchet et al, 1984). La introducción del plásmido pRIJI de *R. leguminosarum* en *P. myrsinacearum* confirió a este último la habilidad para nodular efectivamente raíces de vicia. Estudios sobre la expresión de los genes *nod* en *Agrobacterium* y otras bacterias, indican que otros genes además de los *nod* son necesarios para la inducción por flavonas de estos últimos (Yelton et al, 1987).

Estos sistemas quiméricos amplían la posibilidad de estudio de la expresión de genes *nod* de los rizobios y su participación en los diversos

fenómenos que constituyen el proceso de la asociación simbiótica (ver capítulo 8).

1.6. - LA RIZOSFERA.

El término rizosfera fue introducido en 1904 por Hiltner para describir la zona del suelo alrededor de las raíces de leguminosas donde las bacterias estarían influenciadas por los compuestos liberados por los nódulos. Actualmente se considera rizosfera al volumen de suelo cercano a la raíz de cualquier planta, donde existe una elevada actividad microbiana, debido a la exportación de sustancias orgánicas desde la raíz de la planta al suelo circundante, proceso que se denomina exudación radicular (ver sección 1.8). De este modo la rizosfera es el lugar donde ocurren diversos procesos e interacciones biológicamente importantes, como por ejemplo: La absorción de nutrientes inorgánicos por la raíz; la interacción con bacterias u hongos que pueden ser saprófitos, patógenos o benéficos para la planta; la interacción con micorrizas; el ataque de la planta por nematodos (Olsson, 1987).

Algunos autores han utilizado el término rizosfera para referirse a zonas de la raíz que se observan cuando ésta se inocula en un medio líquido con la técnica de Fahraeus (Fahraeus, 1957). En estas condiciones aparece una zona no uniforme de rizobios acumulados o nadando en la vecindad de la superficie radicular. Observaciones con microscopía electrónica de estos preparados muestran una capa mucilaginosa sobre la superficie radicular y la acumulación de los rizobios entre una capa membranosa y la célula epidérmica. Estas estructuras fueron consideradas como un tejido exterior necesario para el proceso de infección donde se concentraría el intercambio de señales entre los simbioses (Dart y Mercer, 1964).

Es muy importante considerar la región circundante de las semillas en germinación que se denomina espermosfera (Lynch, 1983) y que ha recibido muy poca atención por parte de los fisiólogos y microbiólogos. Quizás aquí exista el mayor potencial para efectos microbianos que pueden tener una influencia final sobre la planta. En el caso de semillas de leguminosas es muy sugestivo que de extractos de semillas se obtengan lectinas y sustancias inductoras de los genes *nod* de los rizobios, que poseen una participación

determinante en el establecimiento de la simbiosis (Hartwig *et al*, 1990a; Halverson y Stacey, 1986a). Es posible pensar en un proceso quimiotáctico hacia la esfermosfera y una colonización primaria en torno de las radículas emergentes, procesos que quizás determinen o influyan decisivamente sobre la colonización final de la rizosfera.

La existencia de un ecosistema rizosférico depende directamente de los materiales que provienen de la raíz a medida que ésta crece y se desarrolla en un ambiente no estéril (el suelo circundante) (Hale *et al*, 1981). Allí reside la importancia de considerar y estudiar los efectos de los exudados radiculares sobre el comportamiento de los microorganismos rizosféricos.

1.7. - LA DIFERENCIACION RADICULAR Y SU IMPORTANCIA EN EL ESTABLECIMIENTO DE LA SIMBIOSIS.

Si consideramos el ecosistema raíz-microorganismo, se pueden distinguir al menos dos ambientes, uno físico o estructural dado por la diferenciación radicular y uno químico dado por los exudados radiculares (Bowen, 1981).

El sistema radicular puede considerarse como un continuo espectro de cinco zonas morfológicas diferenciables: el ápice radicular (root cap o root tip), la zona de elongación, la zona de pelos radiculares, la zona de lisis de células epidérmicas e iniciación de raíces laterales, y la zona de la raíz con engrosamiento secundario. La superficie de todas estas zonas está cubierta por un mucigel (Rovira, 1979) en forma heterogénea, según cada zona, y de composición también heterogénea. A este mucigel se lo considera compuesto por mucílagos de origen vegetal y material de origen bacteriano, células y sus productos metabólicos, y material mineral y orgánico coloidal propio del suelo.

1.7.1. - LA ZONA DEL APICE RADICULAR Y LA ZONA DE ELONGACION.

Estas zonas constituyen áreas de intensa actividad metabólica. Estas células se encuentran cubiertas por una capa de mucílago de la planta, gruesa en el ápice (5-10 μm), y que se afina en las células de elongación.

Las observaciones microscópicas sugieren la existencia de una fina cutícula cubriendo externamente este mucílago (Dart y Mercer, 1964; Foster, 1981). Esta zona es muy activa en la exudación de sustancias por la raíz (Bowen, 1981; Djordjevic *et al*, 1987; Peters y Long, 1988) y en ella se localizan sitios de atracción de rizobios y otras bacterias inespecíficas (Gulash *et al*, 1984).

1.7.2. - LA ZONA DE PELOS RADICULARES.

La zona de elongación se continúa con la zona de formación de pelos radiculares o pelos radiculares emergentes y la zona de pelos maduros. Los pelos radiculares también penetran en el suelo rizosférico y secretan una cubierta de mucílago (Bowen, 1981).

Estas zonas -elongación y pelos radiculares- adquieren particular importancia en la interacción rizobio-leguminosa ya que constituyen la zona infectable de la raíz (Bhuvanewari y Bauer, 1980). En las raíces de leguminosas la zona de elongación radicular entre el ápice radicular "root tip" (RT) y la zona de pelos emergentes (ERH) resulta ser la región infectable o competente para la infección de la raíz; esta región también llamada ventana infectiva se corre en el sentido de crecimiento de la raíz con el crecimiento de la misma (Bhuvanewari y Bauer, 1982). Por lo tanto la posición de los nódulos en la raíz en relación a la posición del ápice radicular al momento de la inoculación (marca RT) permite comparar velocidades o tiempos en los que ocurre la infección. Así, si un nódulo corresponde a una infección más temprana que otra, se encontrará más arriba en la raíz tomando la marca RT como punto de referencia. Esta propiedad muy utilizada en diversos trabajos, ha sido también empleada en algunos experimentos de esta tesis (capítulo 5, sección 5.4).

1.8. - EL EXUDADO RADICULAR.

La raíz se encuentra inmersa en un ambiente químico que forma parte del ecosistema de la rizosfera. Este ambiente químico está compuesto principalmente por las distintas sustancias aportadas por la raíz al suelo,

Las sustancias liberadas por los microorganismos presentes en la rizosfera y por las sustancias propias del suelo.

El conjunto de sustancias liberadas por la raíz al medio circundante se denomina en sentido amplio exudado radicular (Hale et al 1981). Muchos componentes de los tejidos de la raíz se encuentran en los exudados radiculares (Rovira, 1969), por ejemplo: aminoácidos, azúcares, ácidos grasos, sustancias aromáticas, polisacáridos, péptidos, enzimas, lectinas y otras glicoproteínas. Todas éstas son sustancias que participan en diversas interacciones moleculares con los microorganismos presentes en la rizosfera.

Diferentes términos se han utilizado y propuesto para designar a las diferentes sustancias que componen el exudado radicular, de acuerdo a su peso molecular (alto o bajo), a la forma de exportación hacia el medio (pasiva o activa), a si el origen se debe a hidrólisis de la pared celular vegetal por ataque de microorganismos o por lisis de células descamadas o de las células mismas, etc. Un nuevo término que incluye todos estos procesos u orígenes diferentes para las sustancias orgánicas presentes en el suelo y provenientes de la raíz fue sugerido por Newman en 1985, y es "rizodeposición" (Olsson, 1987).

En un trabajo anterior se había propuesto una clasificación más precisa de las diferentes sustancias aportadas por la planta al suelo (Rovira et al 1979). Estos autores denominaban "exudados" al conjunto de sustancias de bajo peso molecular liberadas el medio en forma pasiva, "secreciones" a las sustancias de alto peso molecular liberadas por transporte activo, "mucílagos de la planta" que incluyen la cobertura del ápice radicular, hidrolizados de pared celular primaria y secreciones de células epidérmicas que poseen sólo pared primaria, "mucigel" al material gelatinoso compuesto por mucílago más bacterias y partículas del suelo, y "lisados" a los productos de lisis de células descamadas de la raíz.

En esta tesis nos referiremos al exudado radicular en su sentido amplio, definido al comienzo de esta sección.

Diversos factores regulan la producción de exudados radiculares (Hale et al, 1981):

a) Factores de stress del ambiente: agua, pH, anaerobiosis, mecánicos, contaminación ambiental, luz, temperatura.

b) Factores de la planta: crecimiento, sistema radicular, grado de desarrollo, tipo de planta.

c) Factores bióticos externos: organismos rizosféricos, organismos colonizantes.

d) Factores químicos agrícolas: nutrientes, pesticidas, etc.

La exudación radicular se aumenta por los daños mecánicos producidos por el desarrollo de la raíz en el suelo y por la presencia demicroorganismos colonizantes de la rizosfera, mientras que se disminuye cuando la raíz sufre anerobiosis o crece en un medio estéril.

En el estudio del establecimiento de la asociación simbiótica entre los rizobios y las raíces de las leguminosas debe considerarse el exudado radicular de las leguminosas como un factor biótico muy importante en los diferentes eventos de interacción que determinan el llamado proceso de preinfección . En las siguientes secciones se describen y discuten estos eventos tempranos de interacción y la participación de componentes del exudado radicular en los mismos.

1.9. - QUIMIOTAXIS DE LOS RIZOBIOS HACIA LA RAIZ.

Los exudados radiculares han sido extensamente estudiados, en relación a su participación en la preinfección, como quimioattractantes responsables del acercamiento direccional de los microorganismos desde el suelo hacia la superficie radicular. (Soby y Bergman, 1983, Kush y Dadarwal, 1981), e incluso hacia zonas específicas de la anatomía radicular (Gulash et al, 1984).

Los ensayos de quimiotaxis han sido realizados utilizando sustancias puras, reconocidas como componentes de los exudados radiculares, (Burg et al, 1982; Caetano-Anollés et al, 1988a; Bowra y Dilworth, 1981; Parke et al, 1985; Malek, 1989) o utilizando directamente exudado radicular o fracciones del mismo (Gitte et al, 1978; Currier y Strobel, 1976; Seaton y Currier, 1979; Gaworzewska y Carlile, 1982; Malek, 1989). Un estudio detallado realizado con *R. leguminosarum* muestra que este rizobio es atraído por sustancias de bajo peso molecular con diferentes características iónicas. A partir de un fraccionamiento del exudado radicular por resinas de intercambio iónico, resultaron ser quimioattractantes las fracciones ya sea

catiónicas, aniónicas, y neutras, del exudado radicular de arveja (Gaworzewska y Carlile 1982). Estudios realizados sobre la quimiotaxis de *R. meliloti* L5-30 muestran que la respuesta quimiotáctica a exudados radiculares, de raíces homólogas como heterólogas, es varias veces superior a la que se obtiene para sustancias simples (Malek, 1989).

No sólo moléculas simples han sido reconocidas como quimioattractantes, sustancias peptídicas de bajo peso molecular (aproximadamente 1000 daltons) propias del exudado de alfalfa son potentes quimioattractantes de *R. meliloti* (Bergman *et al*, 1988). También se han encontrado quimioattractantes de alto peso molecular; el rizobio infectivo del trébol de cuernito (*Lotus corniculatus*) es atraído por una glicoproteína presente en el exudado radicular (Currier y Strobel, 1977). También ha sido reportada la participación de macromoléculas del exudado radicular y de semillas de alfalfa como quimioattractantes para *R. meliloti* (Seaton y Currier, 1979).

Algunos de estos quimioattractantes actuarían sobre los rizobios con la selectividad de la asociación simbiótica. Así se encontró en el caso de la luteolina exudada por alfalfa que actúa sobre *R. meliloti* (Caetano-Anollés *et al*, 1988a), y la proteína quimiotactina exudada por *Lotus corniculatus*, que atrae específicamente al respectivo microsimbionte (Currier y Strobel, 1977). Sin embargo, la respuesta específica de *R. meliloti* a luteolina que depende de los genes *nodABC* (Caetano Anollés *et al*, 1988a) no parecería ser determinante de la respuesta global quimiotáctica de los rizobios frente a las raíces, ya que mutantes deletados en la región *nodABC* (que entonces carecen de respuesta a luteolina) muestran la misma respuesta quimiotáctica de formación de acúmulos o "nubes" microbianas alrededor de determinados puntos de la raíz que la cepa salvaje (ver más adelante).

Esta amplia variedad de atractantes tan diferentes da una idea de la complejidad inherente a los mecanismos sensores y adaptadores del sistema quimiotáctico de los rizobios, más ampliamente estudiado en otras bacterias como *Escherichia coli* (Koshland, 1981). *R. meliloti* posee un sistema quimiotáctico que gobierna el motor de rotación de los flagelos, aparentemente más complejo que el de *E. coli*: Este sistema poseería una vía que detecta moléculas simples -azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos- en

forma similar a *E. coli* (Kush y Dadarwal, 1981), mientras que otra responde a sustancias propias del exudado radicular de alfalfa (Bergman *et al*, 1988). Por otra parte los movimientos quimiotácticos de *R. meliloti* son propios y diferentes a los muy conocidos de *E. coli* (Koshland, 1981). Los 5 a 10 flagelos peritricos de estructura compleja de *R. meliloti* forman un haz más complejo, que por simple rotación y detención dirige los movimientos quimiotácticos del rizobio, sin la existencia del movimiento de volteo de *E. coli* previo a un cambio en la dirección de la traslación (Götz y Schmidt, 1987).

En relación a la nodulación, la movilidad y quimiotaxis de los rizobios no son funciones imprescindibles. Sin embargo son determinantes de su capacidad competitiva para la nodulación. Esto último ha sido demostrado utilizando mutantes para las funciones de movilidad y quimiotaxis de diferentes rizobios (Hunter y Fahring, 1980; Ames y Bergman, 1981; Napoli y Albersheim, 1980; Mellor *et al*, 1987). La competitividad es muy importante al considerar el escenario natural del proceso de nodulación que es la rizosfera. El uso de mutantes de movilidad y quimiotaxis de *R. meliloti* ha sido útil para demostrar que estas funciones microbianas determinan también una mayor eficiencia en la nodulación, probablemente debido a una mejor realización de las etapas tempranas de adsorción específica a la superficie radicular (Caetano-Anollés *et al*, 1988b) (ver capítulo 8, sección 8.2).

La distribución de la capacidad de la raíz para atraer a los rizobios no es homogénea sino que sobresalen determinados puntos de la superficie de la misma cercanos al ápice radicular (Gulash *et al*, 1984; Malek, 1989)), probablemente la zona más propicia o receptora de la raíz que posteriormente va a llevar a cabo las siguientes etapas de la asociación simbiótica. Estos estudios de observación microscópica, que revelan la formación de acúmulos o "nubes" microbianas alrededor de determinados puntos de la superficie radicular, muestran que la movilidad y quimiotaxis bacteriana contribuyen con un factor de complejidad adicional en la relación de los rizobios con la superficie de la raíz.

1.10. - LA COLONIZACION RIZOSFERICA.

El aumento del número de bacterias en las zonas del suelo vecinas a la raíz y sobre su superficie, debido tanto a los movimientos quimiotácticos (sección 1.9.) como a la multiplicación bacteriana sostenida por las sustancias exudadas por la raíz al medio (ver sección 1.8.), se denomina colonización rizosférica.

El estímulo de crecimiento microbiano se ha estudiado de diferentes maneras; una de ellas ha sido por la utilización de un medio mínimo de cultivo, suplementado por el agregado de exudado radicular o de alguno de sus diferentes componentes -determinados a partir del estudio de la composición química del exudado radicular- y ensayados como nutrientes; otra forma ha sido estudiar el crecimiento microbiano directamente sobre la raíz o alrededor de la misma. Un estudio de crecimiento de diferentes rizobios sobre la superficie de diferentes leguminosas y su crecimiento *in vitro*, en ausencia de raíces, en medios suplementados con exudados radiculares homólogos o heterólogos correspondientes a varios sistemas diferentes de inoculación cruzada mostró que en la colonización rizosférica no se manifiesta una selectividad específica para el microsimbionte (Peters y Alexander, 1964).

Otro autor (Van Egeraat, 1975a y b) halló sin embargo un estímulo de crecimiento de *R. leguminosarum* por acción de la homoserina, siendo éste el aminoácido preponderante en extractos de raíces de arveja. Sin embargo la homoserina no es mayoritaria en el exudado radicular de la zona del ápice radicular, zona muy importante para las interacciones tempranas entre los simbioses (Bhuvanewari et al, 1980). La homoserina es liberada por la raíz hacia el suelo principalmente por las zonas de crecimiento de raíces secundarias; esto ayudaría a colonizar los primordios de raíces secundarias y la formación de nódulos allí.

Algunos estudios sobre crecimiento bacteriano en medios mínimos suplementados con sustancias de la planta presentan resultados contradictorios: en un trabajo realizado con trébol, el exudado radicular de la planta hospedante fue incapaz de sostener el crecimiento de un cultivo del rizobio infectivo (Kush y Dadarwal, 1981); en cambio, el exudado de soja o caupí pudo mantener el crecimiento y la expresión de la nitrogenasa de *B.*

japonicum cuando se lo utilizó como fuente de C en el medio de cultivo (Odunfa y Werner, 1980).

Una clase de sustancias que ha centrado la atención de muchos investigadores en estos últimos años son las flavonas, isoflavonas y sustancias relacionadas, presentes en los exudados radiculares de las leguminosas, cuya función más importante y espectacular es la de actuar como inductores o represores de genes simbióticos en el microsimbionte (ver más adelante sección 1.11.). Dada la importancia de estas sustancias en el establecimiento de la simbiosis, se ha estudiado también su uso catabólico por las bacterias, encontrándose que dos isoflavonoides presentes en el exudado radicular de soja promueven el crecimiento de microorganismos rizosféricos, en forma no específica para la simbiosis (Lameta y Jay, 1987).

Dado que -de acuerdo a los resultados ya mencionados- el efecto rizosférico no presentaría marcadas características de selección para el microsimbionte, se han buscado rutas alternativas para transformarlo en un proceso selectivo. En ese sentido un ejemplo se encuentra en el uso de las calisteginas, sustancias poco difundidas en el reino vegetal, cuyo catabolismo por parte del rizobio resulta ser una propiedad transmisible por plásmido a diferentes bacterias rizosféricas (Tepfer et al, 1988).

Hoy puede especularse que la manipulación genética tanto de la planta como del microsimbionte abren la posibilidad de modificar la ecología de la rizosfera en forma selectiva, produciendo sistemas simbióticos adaptables a diferentes condiciones ambientales que pueden ser aprovechadas por el hombre.

1.11. - COMPUESTOS DE LA PLANTA QUE PARTICIPAN EN LA REGULACION DE LA EXPRESION DE LOS GENES *nod* DE LOS RIZOBIOS.

Las plantas sintetizan una amplia variedad de compuestos fenólicos tanto en tejidos de la raíz como de la parte aérea durante su normal crecimiento y desarrollo. Estos son producidos por la vía del camino de biosíntesis de los fenilpropanoides y cumplen una variedad muy amplia de funciones. Algunos son bloques componentes de pigmentos que participan en la estructura de la pared celular, en los sistemas de protección contra la luz

ultravioleta, en mecanismos de defensa contra patógenos y posiblemente se utilicen para modificar la acción de hormonas (Peters y Verma, 1990).

Estos compuestos se encuentran muy involucrados en la expresión de genes en las interacciones planta-microorganismos. Así, los compuestos fenólicos inducen una variedad de genes catabólicos en bacterias asociadas a plantas. Compuestos monocíclicos como la acetociringona inducen los genes de virulencia de *Agrobacterium tumefaciens* (Peters y Verma, 1990).

En relación a la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa varios componentes de naturaleza flavonoidea derivados de las plantas han sido identificados en exudados radiculares que pueden actuar tanto activando como antagonizando la inducción de los llamados genes *nod* de los rizobios.

La participación de componentes de la planta en la expresión de genes del rizobio fue reportada por primera vez en un trabajo sobre la inducción de genes *nod* de *R. meliloti* (Mulligan y Long, 1985). Utilizando fusiones de estos genes con el de β -galactosidasa para poder medir los niveles de expresión genética, se encontró que la inducción del gen *nodC* requería la presencia del gen *nodD* y sustancias de la planta presentes en exudados de semilla o exudados radiculares de plántulas de alfalfa, o de plantas heterólogas (Mulligan y Long, 1985).

Posteriormente uno de los principales activadores de la inducción de los genes *nod* de *R. meliloti* fue identificado por separación, purificación y estudios espectrales como la 3',4',5,7-tetrahidroxiflavona comúnmente llamada luteolina (Peters *et al*, 1985). Esta sustancia de bajo peso molecular es termoestable y dializable. Otros estudios indican que la actividad estimuladora equivalente a luteolina en el exudado radicular en sí de alfalfa se encuentra en una gran mayoría (50%) en una forma glicosilada que puede ser liberada por hidrólisis ácida (Philips *et al*, 1988). Recientes estudios sobre actividades inductoras de los genes *nod* de *R. meliloti* en exudados de semilla y radiculares de una variedad de alfalfa -Moapa 69- han permitido identificar compuestos aún más activos que la luteolina. En exudados de semillas los inductores más importantes son el crisoeriol (3'-metoxiluteolina) y la luteolina. Las concentraciones de estas sustancias con las que se obtiene la mitad de la máxima respuesta son 5 y 18 nanomolar respectivamente. Resulta interesante que la concentración de estos compuestos con actividad estimuladora en el exudado de semillas sea 100

veces mayor que la que se encuentra en los exudados radiculares (Philips *et al*, 1988; Hartwig *et al*, 1990a). Existen en los exudados de semilla otros derivados de la luteolina (luteolina-7-o-glucósido, 5-metoxiluteolina y 3',5-dimetoxiluteolina) que sumados se encuentran en una concentración 24 veces mayor a la de la luteolina más el crisoeriol. La actividad inductora de estos compuestos estaría asociada a su degradación a luteolina o crisoeriol, y su alta concentración sugieren que podrían contribuir significativamente a la actividad inductora de genes *nod* en el suelo. Estos resultados refuerzan la idea ya expuesta (ver sección 1.6.) sobre la importancia de los exudados de semillas y los procesos biológicos que ocurrirían en la esferosfera. En el exudado radicular de alfalfa variedad Moapa 69 no se encuentra luteolina pero han sido identificados tres sustancias inductoras de genes *nod*: 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona, 4',7-dihydroxiflavona y 4',7-dihydroxiflavanona. La sustancia más activa como inductora de los genes *nod* resulta ser la 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona que permite obtener la mitad del máximo de inducción con una concentración 2 nanomolar, resultando ser casi 10 veces más activa que la luteolina (Maxwell *et al*, 1989).

Estas sustancias flavonoideas aisladas de semilla o exudado radicular de alfalfa, en su acción sobre los rizobios son capaces de interactuar entre sí de modo que los efectos finales resultan a veces ser diferentes a los esperados por la simple aditividad de los efectos que producen las sustancias por separado (Hartwig *et al*, 1989). Así la luteolina y la 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona presentan efectos sinérgicos en muy bajas concentraciones. Por el contrario los dos inductores moderados del exudado radicular de alfalfa, la 4',7-dihydroxiflavona y la 4',7-dihydroxiflavanona disminuyen el efecto inductor de altas concentraciones (24nM) de los potentes inductores luteolina o 4,4'-dihidroxi-2'-metoxichalcona, actuando como sustancias antagónicas (ver más adelante).

En otras plantas fueron identificados los principales activadores para otras especies de rizobios. En trébol la 4',7'-dihydroxiflavona (DHF) (Redmond *et al*, 1986), en arveja la apigenina-7-o-glucósido y el erodictiol han sido sugeridos como los más importantes (Zaat *et al*, 1988) y en soja el activador más importante es la isoflavona daidzeína (Kosslak *et al*, 1987).

Además de sustancias activadoras, un estudio realizado en *R. leguminosarum* reveló la existencia de posibles sustancias antagónicas para la inducción de los genes *nod* (Firmin *et al*, 1986). El estudio de diversos compuestos estrechamente relacionados permitió identificar las diferentes sustancias activadoras o inhibidoras de la inducción de genes *nod* en *R. trifolii* (Djordjevic *et al*, 1987) y en *R. meliloti* (Peters y Long, 1988). En este último caso el antagonista más importante de la sustancia activadora luteolina resultó ser la umbelliferona (Peters y Long, 1988).

Tanto en el caso de trébol (Djordjevic *et al*, 1987) como en el de alfalfa (Peters y Long, 1988) se ha encontrado que la zona de exudación de la raíz con una actividad neta de estimulación de la inducción de los genes *nod* coincide con la ventana infectable de la raíz formada por la zona de elongación radicular entre el ápice y la zona de pelos emergentes, determinada por ensayos directos de infectividad de rizobios y localización de los nódulos sobre la raíz (Bhuvaneshwari *et al*, 1980; Bhuvaneshwari *et al*, 1981).

Un estudio que enfatiza la participación de estas sustancias en el proceso global de nodulación fue realizado utilizando dos poblaciones de alfalfa, de las cuales una es supernoduladora, derivada de la otra. Se encontró que la población más noduladora poseía una concentración de luteolina 77% superior a la de la población parental. Más aún, el agregado de 10 μM luteolina en los ensayos de nodulación con la población parental aumentaba significativamente su nodulación. Estos resultados indican que niveles normales de inductores de genes *nod* en las plantas podrían constituir un factor limitante para la nodulación por los rizobios (Kapulnik *et al*, 1987).

Como ya se ha discutido (ver sección 1.5., diferentes formas moleculares del producto del gen *nodC*) es posible que algunas sustancias participen en más de un evento de interacción en el proceso de asociación. Con las sustancias flavonoideas ocurriría lo mismo. Así como ya se ha mencionado (ver sección 1.9.), la luteolina que es un potente inductor de los genes *nod* de *R. meliloti*, resulta ser un fuerte quimioattractante de *R. meliloti* en concentraciones de 10^{-8} M. Las sustancias antagonistas de la luteolina como la umbelliferona, también se comportan como antagonistas de esta respuesta quimiotáctica (Caetano-Anollés *et al*, 1988a).

1.12. - ACTIVIDADES GLICOSIDASICAS PRESENTES EN EL EXUDADO RADICULAR.

Las interacciones entre el rizobio y la raíz implican la participación de las superficies expuestas por ambos simbioses. En el rizobio existen diferentes tipos de polisacáridos que forman parte de la membrana externa de la bacteria (LPS) y de las estructuras de su superficie (CPS y EPS). En la superficie de la célula vegetal se encuentra la pared celular con un alto contenido de polisacáridos, celulosa y pectinas.

La composición de las superficies actuantes da lugar a suponer que en dicha interacción simbiótica se encuentren involucradas enzimas con actividad glicosidásicas capaces de degradar o modificar los polisacáridos expuestos.

En los exudados radiculares de las leguminosas trébol y arveja se han detectado enzimas con actividad glicosidásica capaces de degradar polisacáridos de la superficie de los rizobios. La especificidad de estas enzimas se manifiesta en forma parcial. Mientras que las preparaciones enzimáticas de trébol degradan parcialmente los polisacáridos de su simbiote *R. trifolii*, actúan en menor extensión sobre los polisacáridos del rizobio heterólogo *R. leguminosarum*. Sin embargo, a la inversa, enzimas preparadas de arveja degradan los polisacáridos homólogos y heterólogos con una diferencia a favor del homólogo más pequeña que en el primer caso (Solheim y Fjellheim, 1984). Es importante remarcar que es difícil llegar a conclusiones respecto de la especificidad o no de esta interacción, cuando deben extrapolarse datos obtenidos in vitro con fracciones semipurificadas de polisacáridos como sustratos.

Otros autores ensayaron estas actividades utilizando células rizobianas como sustrato y anticuerpos contra antígenos de superficie del rizobio para observar por inmunofluorescencia la posible degradación o no de la cápsula bacteriana. De este modo pudo detectarse en el exudado radicular de trébol una glicosidasa que erosiona la cápsula rizobiana dando como resultado células rizobianas con polisacárido capsular remanente en los polos celulares. Esta actividad no pudo ser reemplazada con igual eficacia por exudado radicular de alfalfa sugiriendo una cierta especificidad simbiótica en esta reacción enzimática (Dazzo et al, 1982). Esta actividad

enzimática favorecería la adhesión polar de los rizobios a la superficie de los pelos radiculares, modo específico de adsorción en el sistema *R. trifolii*-trébol (Dazzo *et al*, 1984).

Otras enzimas del tipo de poligalacturonasas o pectinasas se han detectado en el medio de crecimiento de raíces, inducidas por la presencia del rizobio infectivo para la planta (Ljunggren, 1969). Esta inducción pudo obtenerse también utilizando únicamente material soluble proveniente del cultivo del rizobio. Según este autor, estas enzimas jugarían un rol importante en el proceso de infección del pelo radicular.

La importancia de las glicosidasas en el fenómeno de reconocimiento entre los simbioses ha sido puesta de manifiesto en los últimos años al lograr romper la barrera de especificidad para la infección de la raíz de trébol, por tratamiento de la pared celular de la raíz con una mezcla de enzimas glicosidásicas. Las raíces así pretratadas fueron posteriormente infectadas y noduladas en forma efectiva por *R. leguminosarum* normalmente no infectivo en raíces de trébol (Al-Mallah *et al*, 1987).

1.13. - LAS LECTINAS Y EL PROCESO DE RECONOCIMIENTO.

Es normalmente aceptado que la alta selectividad necesaria para llevar a cabo un proceso de reconocimiento como el que nos ocupa entre rizobios y leguminosas está dada por el ajuste específico estereoquímico entre moléculas complementarias, una llevando información biológica y la otra capaz de decodificar dicha información. Así el reconocimiento celular es otro aspecto del concepto fundamental de complementaridad llave-cerradura, originalmente formulado por Emil Fischer en 1897 para referirse a las interacciones enzima-sustrato. Esta hipótesis inicialmente dirigida a moléculas en solución fue extendida por Paul Ehrlich en 1900 y Frank Lillie en 1914 para describir interacciones de células con moléculas solubles o con otras células a través de moléculas expuestas en su superficie.

El estudio de la naturaleza de las moléculas involucradas en este reconocimiento constituye un amplio campo de investigación. En las últimas dos décadas se ha puesto mucha atención sobre la posibilidad de que las lectinas y los carbohidratos medien en los fenómenos de reconocimiento (Sharon y Lis, 1989).

Las lectinas son proteínas que unen carbohidratos en forma específica y no covalente. Los carbohidratos son moléculas biológicas muy versátiles que pueden llevar mucha información en su constitución. Esta información reside en la naturaleza de los azúcares unidos, su secuencia, la posición y configuración anomérica (α y β) de las uniones glicosídicas, la posibilidad de uniones ramificadoras de la molécula y la posibilidad de modificación posterior de los azúcares con sustituyentes no sacarídicos. Las lectinas podrían participar en el reconocimiento celular no sólo a través de su unión a carbohidratos sino también a través de dominios capaces de reconocer otros ligandos no carbohidratos, como a través de sus propios carbohidratos ya que las lectinas son en general glicoproteínas (Barondes, 1988).

En las leguminosas una de las hipótesis más populares sobre las bases de la especificidad simbiótica es aquélla que sostiene que las lectinas tendrían un rol determinante en el reconocimiento entre la raíz y los rizobios capaces de infectar e inducir la formación de nódulos fijadores de nitrógeno. Albersheim y Anderson Prouty (1975) sugirieron que los determinantes de reconocimiento entre plantas y microorganismos podrían ser probablemente glicoproteínas con carácter de lectinas presentes en la planta huésped que reconocerían específicamente polisacáridos de la superficie bacteriana. De este modo se establecería la adsorción de los rizobios a la superficie de la raíz, una de las etapas de interacción previa a la infección y formación del nódulo.

El origen de la teoría se remonta a la capacidad de los rizobios de unir lectinas extraídas de semillas, reacción que se pone en evidencia por la capacidad de aglutinar eritrocitos que adquieren estos rizobios cuando se los trata con lectina (Hamblin y Kent, 1973; Kamberger, 1977).

Posteriormente la unión de la lectina a los rizobios se estudió por aglutinación de los propios rizobios. La aglutinación positiva de los rizobios homólogos por lectinas extraídas de semillas de la planta huésped, y la falta de aglutinación de rizobios heterólogos, en trébol (Dazzo y Hubbell, 1975), arveja (Kijne *et al*, 1980) y alfalfa (Paau *et al*, 1981), dieron un fuerte apoyo a la teoría de reconocimiento simbiótico a través de la unión de la lectina de la planta a carbohidratos propios del rizobio hospedante.

Otro criterio fue la unión selectiva de la lectina a los rizobios, demostrada mediante la utilización de lectina marcada con un sustituyente fluorescente (isotiocianato de fluoresceína) en soja (Bohlool y Schmidt, 1974), o por inmunofluorescencia con antisuero antilectina (Dazzo y Hubbell, 1975).

Los primeros estudios fueron realizados utilizando preparaciones de lectinas de semillas.

A partir de estas lectinas se obtuvieron anticuerpos con los que se buscó un material con reactividad cruzada en la superficie de las raíces y pelos radicales. Así pudo detectarse la presencia de sustancias antigénicamente relacionadas con las proteínas de semilla en raíces de trébol (Dazzo y Brill, 1977), de alfalfa (Paau et al, 1981) y de arveja (Kato et al, 1981; Diaz et al, 1984).

Una forma particulada de la lectina de trébol "trifoliina A" ha sido aislada de exudado radicular de trébol blanco. Estas partículas proteicas poseen trifoliina A entre otras proteínas y se encuentran en la superficie de los pelos radicales, inmersas o en el exterior del mucigel. Las mismas son capaces de unirse a la superficie de *R. trifolii* y de unir más lectina. Estos resultados sugieren un rol de estas partículas en las interacciones tempranas entre los rizobios y las raíces (Truchet et al, 1986).

La hipótesis del reconocimiento por lectina fue ampliada en el caso de trébol. Los resultados obtenidos en el laboratorio dirigido por Frank B. Dazzo con el uso de anticuerpos contra la superficie radicular de trébol y la superficie de una cepa de *R. trifolii* permitieron elaborar una teoría sobre la adhesión específica de los rizobios a la superficie de los pelos radicales de trébol. La unión de los simbioses estaría mediada por la lectina trifoliina A que actuaría como puente, reconociendo antígenos comunes tanto en los polisacáridos superficiales del rizobio como en los componentes de la superficie radicular (revisado por Dazzo y Truchet, 1983). Una evidencia de esta hipótesis se encuentra en que el pretratamiento de los rizobios con trifoliina A aumenta enormemente su adsorción a la superficie radicular como sería de esperar si la lectina participa en el proceso de pegado (Dazzo et al, 1976). La lectina trifoliina A reconocería polisacáridos específicos de *R. trifolii* en cuya producción estarían

involucrados los productos de los genes de especificidad *nod* FELMN del rizobio (Philip-Hollingworth et al, 1989).

Sin embargo esta hipótesis de reconocimiento por la lectina, sostenida por muchos estudios en el sistema de trébol-*R.trifolii*, no ha podido ser corroborada en el sistema arveja-*R.leguminosarum* (Smit et al, 1986, 1988; Kijne, 1989), sistema evolutivamente muy cercano ya que los rizobios correspondientes son considerados biovares distintos de un mismo género *leguminosarum*. Incluso algunos autores no han podido confirmar la hipótesis aún en el mismo sistema de trébol (Badenoch-Jones et al, 1985). En estudios detallados de la asociación temprana entre *B. japonicum* y soja tampoco se ha podido demostrar una forma de adhesión específica (Pueppke, 1984; Vesper y Bauer, 1985). A diferencia de lo que ocurre con *R. trifolii* (ver más arriba), el pretratamiento de *B. japonicum* con lectina de semilla de soja no estimula su posterior adsorción a las raíces (Pueppke, 1984).

Como ya se ha dicho, la aglutinación de rizobios por la lectina de semilla de la planta hospedante fue uno de los criterios utilizados inicialmente para demostrar que la unión rizobio-lectina refleja la especificidad simbiótica. Sin embargo estudios más completos sobre la aglutinina de alfalfa (no llamada lectina por no haberse encontrado un hapteno sacarídico específico para dicha proteína) demostraron que la reacción de aglutinación de *R. meliloti* a pH 4 -pH no fisiológico para *R. meliloti* (Adler et al, 1984)- es inespecífica y que puede ser producida con proteínas extraídas de otras semillas (Seeger y La Rue, 1985), incluso con proteínas no vegetales cuyo pI sea superior al pH del ensayo de aglutinación (Lepek, Tesis Doctoral, 1989; Lepek y Marechal, 1989). Estos resultados señalan que la reacción de aglutinación de *R. meliloti*, que paradójicamente contribuyó a sentar las bases para la teoría de reconocimiento por lectina, es inespecífica.

La reacción de *R. meliloti* con la aglutinina de alfalfa a pH 4 se utilizó también para caracterizar la superficie de los rizobios. Así se demostró, para la cepa 102F51, que una baja respuesta de aglutinación (aglutinación a diluciones bajas de aglutinina) se correlaciona con un fenotipo de mayor competitividad para la nodulación y un cierto patrón de resistencias a fagos (Handelsman et al, 1984); por el contrario, mutantes que aglutinan a altas diluciones de la aglutinina resultaron ser menos

competitivos y presentar alterado su patrón de resistencias a fagos (Handelsman et al, 1984). Este comportamiento se debe a la presencia en el rizobio de un polisacárido de tipo teucurónico, que probablemente enmascare a los receptores de la aglutinina (Cavagnac, 1988) (ver sección 1.15.).

Los diferentes resultados muestran que la hipótesis de reconocimiento mediante una lectina es un punto de discusión aún no resuelto en el estudio de las interacciones tempranas rizobios-leguminosas (véase la revisión por Halverson y Stacey, 1986b).

No puede descartarse, sin embargo, que exista algún tipo de interacción específica entre el rizobio y la lectina que debería ser revelada por otro ensayo biológico diferente. En este sentido existen fuertes evidencias independientes de esta hipótesis que revelan un papel determinante de las lectinas en el proceso de reconocimiento simbiótico:

a) La localización de una lectina de arveja por técnicas de inmunofluorescencia indirecta en la superficie de los pelos radicales de arveja, permitió establecer una fuerte correlación entre la presencia de la lectina y la infección de la raíz por el rizobio (Diaz et al, 1986).

b) La lectina de soja es capaz de revertir la nodulación retardada de un particular mutante de *B. japonicum* y de estimular la nodulación temprana de la cepa salvaje cuando ésta es inoculada en bajas concentraciones (10^4 rizobios por planta) (Halverson y Stacey, 1986a). La estimulación de la nodulación fue medida por el corrimiento de la posición del primer nódulo hacia la dirección del tallo (ver sección 1.7.2.). En estos ensayos la mitad del máximo de estimulación se obtuvo en presencia de una concentración de lectina extraordinariamente baja, con sólo 10 moléculas de lectina por bacteria. Las preincubaciones de los rizobios fueron de 72 horas, pero una sola hora en presencia de la lectina seguida de 71 horas en medio mineral produjeron el mismo efecto de estimulación de la nodulación que resultó ser dependiente de la síntesis de RNA y proteínas (Halverson y Stacey 1986a). Estos resultados revelan mecanismos de recepción de una señal y posterior transducción de la misma por parte del rizobio.

c) La lectina de semilla de soja y una lectina de cultivo de células de soja, no relacionadas en sus características estructurales, son capaces de inducir en los bradyrizobios la capacidad de estimular posteriormente el crecimiento de las células vegetales en cultivo,

constituyendo una evidencia más de la posible participación de las lectinas en los procesos de reconocimiento simbiótico (Fantauzzo y Mutaftschiev, 1988; Imbert y Mutaftschiev, 1988).

d) Resultados más espectaculares fueron obtenidos en un elegante experimento en que las raíces de trébol fueron hechas transgénicas mediante la introducción del gen de la lectina de arveja, utilizando *A. rhizogenes* como vector. La expresión de esta sola lectina en las raíces transformadas de trébol permitió la infección efectiva de las mismas por *R. leguminosarum*, rizobio infectivo de arveja pero no infectivo de raíces normales de trébol (Diaz et al, 1989). Este resultado constituye una evidencia muy fuerte a favor de un rol determinante de la lectina de la planta hospedante en algunos de los pasos necesarios para la infección y nodulación.

1.14. - OTROS COMPONENTES MACROMOLECULARES DEL EXUDADO RADICULAR QUE INTERACCIONAN CON LOS RIZOBIOS.

Los rizobios entran en contacto con el exudado radicular a partir del momento de su inoculación en las raíces, o colonización rizosférica. Si entre los rizobios y los componentes del exudado radicular existen interacciones tempranas que producen en los rizobios cambios dirigidos hacia el proceso de infección y nodulación, un pretratamiento de las bacterias con estos compuestos podría acortar los tiempos del proceso de infección y nodulación posterior a la inoculación.

Así se ha detectado la participación de componentes macromoleculares del exudado radicular en los sistemas de caupí (Baghwat y Thomas, 1982, 1983), soja (Halverson y Stacey, 1984, 1985) y en trébol (Solheim, 1983).

El pretratamiento de los rizobios específicos con el exudado radicular dializado de caupí produce un aumento en la población rizobiana de células capsuladas que correlaciona con una mayor infectividad de los rizobios (Baghwat y Thomas, 1983). Esta infectividad fue medida por el método de corrimiento de la posición del primer nódulo hacia zonas superiores de la raíz (Bhuvanewari y Bauer, 1980). La actividad estimuladora se separó como un componente de naturaleza glicoproteica que resultó ser termoestable (Baghwat y Thomas, 1982). La cuestión sobre la

eventual relación o identidad con la hipotética lectina de raíz de caupí, no fue tratada por estos autores.

En soja se obtuvieron resultados similares de aumento de nódulación temprana por pretratamiento de *Bradyrhizobium japonicum* con el exudado radicular. El estímulo consistió en la reversión fenotípica de nodulación retardada de un mutante particular de *B. japonicum* (Halverson y Stacey, 1984). Un efecto similar se obtuvo con la cepa salvaje cuando ésta fue inoculada en bajas concentraciones (Halverson y Stacey, 1986a). En el caso de soja, la actividad estimuladora resultó ser termosensible, sensible a tratamientos con tripsina y pudo ser eficientemente suplantada por la lectina purificada de semillas de soja (Halverson y Stacey, 1985, 1986). Tanto en los sistemas de caupí como de soja, para el pretratamiento de los correspondientes rizobios los exudados respectivos no pudieron ser reemplazados por preparaciones de exudados radiculares de plantas heterólogas, propiedad que indica una expresión de la especificidad simbiótica en etapas muy tempranas de interacción entre los rizobios y componentes del exudado radicular.

1.15. - POLISACARIDOS DE LOS RIZOBIOS.

Los polisacáridos extracelulares de los rizobios comprenden heteropolisacáridos cargados (EPS y CPS), β -glucanos y lipopolisacáridos (LPS). Entre los posibles roles de los polisacáridos extracelulares se pueden mencionar: constituir señales o ser sustrato para la producción de señales, ser material necesario para la adaptación osmótica de los rizobios durante la invasión, o ser factores de reconocimiento que presentan o enmascaran a las bacterias durante la invasión (Long, 1988).

Hace unos años atrás los polisacáridos de los rizobios fueron estudiados fundamentalmente como posibles receptores de las lectinas de la planta en un proceso de reconocimiento temprano (Dazzo y Truchet, 1983).

Numerosos estudios se han realizado para tratar de identificar la naturaleza de estos receptores. En los cultivos puros de rizobios se producen diversos polisacáridos, que constituyen las llamadas exoestructuras de los mismos (Mutaftschiev et al, 1982). Actualmente las hipótesis de trabajo más aceptadas proponen que *B. japonicum* uniría a la lectina de soja

a través de su CPS y EPS, *R. meliloti* uniría la lectina de alfalfa por su LPS, y *R. leguminosarum* y *R. trifolii* lo harían específicamente a las lectinas de trébol y arveja a través de ambos EPS-CPS y de su LPS de acuerdo a la edad de los cultivos (revisión de Dazzo y Truchet, 1983).

En varios de estos casos se han realizado estudios de unión de las lectinas a los rizobios, con observaciones al microscopio electrónico, utilizando la técnica de tinción con glutaraldehído-rojo de rutenio-uranilo (Mutaftschiev et al, 1982) que minimiza la formación de artefactos, e inmunodetección con antisuero antilectina conjugado con oro coloidal que permite ver la localización de las lectinas unidas a las exoestructuras de los rizobios (Vasse et al, 1984).

Los receptores de lectinas de varias especies de rizobios presentan la característica de aparecer en forma transiente dependiendo de la edad de cultivo de los rizobios. Esto fue observado en *B. japonicum* (Bhuvanewari et al, 1977), *R. trifolii* (Dazzo et al, 1979) y *R. leguminosarum* (van der Schaal et al, 1983). Esta dependencia con la edad del cultivo se manifiesta también en la capacidad de *B. japonicum* para la infección y nodulación temprana de las raíces de soja (Bhuvanewari et al, 1983). No ocurre así en el caso de *R. meliloti* donde los receptores de la aglutinina de alfalfa (detectados por la aglutinación a pH 4) se expresan en forma constitutiva y no varían con la edad del cultivo (Lepek, 1989).

La presencia de los receptores de lectinas en los rizobios puede ser modificada por diversos factores. Así, cuando los cultivos de rizobios son realizados en presencia de las raíces de su hospedante, el exudado radicular modula los procesos de desarrollo de los rizobios. Estas condiciones de cultivo estimulan la formación de receptores de lectina de soja en *B. japonicum* (Bhuvanewari y Bauer, 1978). En el caso de trébol, las glicosidasas presentes en el exudado radicular, modifican la exoestructura del rizobio en lo que se refiere a la posición y disponibilidad de receptores de la lectina en *R. trifolii* (Dazzo et al, 1982, 1984).

El fenómeno de deformación de los pelos radiculares también ha sido asociado a los polisacáridos extracelulares del rizobio, a partir de la observación que el filtrado de un cultivo de rizobios era capaz de producir estos efectos sobre las raíces hospedantes, y las sustancias activas se encontraban relacionadas a las fracciones de EPS, CPS y proteínas

extracelulares de los cultivos de rizobios (véase la revisión por Halverson y Stacey, 1986b).

Actualmente se cree que la acción de algunos de estos componentes superficiales no ocurre en las etapas más tempranas de reconocimiento específico, sino algo más tarde, durante la infección misma. Esta nueva visión se apoya en los resultados obtenidos con mutantes de los rizobios para la producción de polisacáridos extracelulares.

Los exopolisacáridos del rizobio juegan un rol necesario en las etapas de la infección (Leigh et al, 1987). Mutantes en los genes *exo*, cuyo fenotipo *Exo⁻* se manifiesta en la falta de producción de exopolisacáridos o material reactivo con calcofluor, son defectivos en la producción del enrulado del pelo radicular y producen hilos de infección que abortan antes de llegar al cortex interno (Leigh et al, 1987; Finan et al, 1985). Actualmente se pueden reconocer al menos dos especies de exopolisacáridos EPSI y EPSII. El EPSII es capaz de reemplazar al EPSI en *R. meliloti*, para que este resulta infectivo sobre alfalfa, pero no son completamente equivalentes desde el punto de vista fisiológico ya que de este modo se altera el rango de hospedantes para *R. meliloti* (Glazebrook y Walker, 1989). Estos mutantes *exo* sin embargo mantienen intactas sus capacidades de inducción de la división celular en la raíz, que dará origen al nódulo, dependiente de los genes *nod* (Finan et al, 1985). Estos dos grupos de mutantes *nod* y *exo* resultan así ser fisiológicamente complementarios. Una coinoculación de ambos mutantes, que son no infectivos en forma individual, conduce a la formación de nódulos efectivos fijadores de nitrógeno (Pühler et al 1986, Kapp et al, 1990).

Recientemente se han clonado genes involucrados en la biosíntesis de los lipopolisacáridos entre los que se destaca un gen para LPS denominado *lpsZ*, involucrado en la composición y estructura de los lipopolisacáridos, que es capaz de suprimir mutaciones en el gen *exoB* responsables de producir la ausencia total de los dos EPS conocidos (Williams et al, 1990). Estos resultados muestran una clara relación funcional entre los diferentes polisacáridos de los rizobios, ya encontrada anteriormente en su participación como receptores de las lectinas de la planta (ver más arriba).

Además de los estudios con mutantes, se han diseñados diversos experimentos para evidenciar directamente un rol fisiológico de los polisacáridos en las interacciones del rizobio con la planta. Estos resultados apoyan también la participación de los polisacáridos en el proceso de asociación: el agregado de pequeñas cantidades de diferentes polisacáridos al inóculo de los rizobios, aumenta la eficiencia y velocidad de infección y nodulación de las raíces hospedantes (véase la revisión por Halverson y Stacey, 1986b).

Si bien los resultados obtenidos con los mutantes sugieren un rol tardío de los polisacáridos, recién durante la infección, la participación de componentes superficiales de *R. meliloti* en etapas tempranas de su interacción con las raíces de alfalfa ha sido demostrada por estudios fisiológicos y bioquímicos. Estos muestran que el LPS participaría en el proceso de reconocimiento de los simbioses, involucrado en el modo de adsorción específica de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa. Preparaciones de LPS de cepas homólogas de *R. meliloti*, pero no heterólogas, inhiben este modo específico de adsorción (Lagares, Tesis Doctoral, 1989).

La participación de los β -glucanos en el proceso de asociación simbiótica ha sido puesto de manifiesto por el comportamiento de los mutantes defectivos en su biosíntesis (genes *ndvA* y *ndvB*), que resultan ser no infectivos (o producen infecciones abortadas) (Dylan *et al*, 1986; Geremía *et al*, 1987). Estos polisacáridos neutros participarían en el proceso de adaptación osmótica de los rizobios necesaria para el éxito de la infección (Dylan *et al*, 1990).

En *R. meliloti* se han estudiado también otros polisacáridos de tipo teicurónicos metilados, que contienen galactosa y ácido glucurónico, involucrados en el proceso de asociación simbiótica. Estos polisacáridos determinan la sensibilidad o resistencia a diferentes fagos y se encuentran asociados a una mayor capacidad competitiva de los rizobios para la nodulación (Cavaignac, 1988). Cepas mutantes con alteraciones en la galactosiltransferasa necesaria para la síntesis de estos polisacáridos, presentan alterada su resistencia a fagos y su competitividad para nodular alfalfa, si bien mantienen sus capacidades de infección efectiva (Ugalde *et al*, 1986a, 1986b; Coria *et al*, 1987).

1.16. - LA ADSORCION DE LOS RIZOBIOS A LA SUPERFICIE RADICULAR.

La adsorción de los rizobios a la superficie radicular constituye el primer evento donde los simbioses entran en contacto físico a través de sus superficies. Este primer contacto evoluciona hacia el proceso de infección y desarrollo del nódulo.

La adsorción de los rizobios y la expresión del reconocimiento simbiótico en esta etapa han sido ampliamente estudiadas en los diferentes sistemas rizobio-leguminosa.

Los métodos de estudio utilizados por los diversos autores son muy variados. Se ha utilizado la observación directa por microscopía óptica de bacterias adheridas a pelos radiculares (Dazzo *et al*, 1976; Stacey *et al*, 1980; Smit *et al*, 1986; Badenoch-Jones *et al*, 1985), el conteo por plaqueo de los rizobios desorbidos de la raíz por machacado de las mismas (Pueppke, 1984), o desorbidos por lavado sucesivo de las raíces (Martinez y Favelukes, 1987; Robertson *et al*, 1981), el conteo de rizobios como microcolonias sobre la superficie de la raíz (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986a), y también contando la radiactividad unida a segmentos de raíces utilizando rizobios marcados radiactivamente (Chen y Philips, 1976; Badenoch-Jones *et al*, 1985). Las diversas metodologías implican diferencias en la concentración del inóculo de células utilizadas que abarca un rango de 10^3 a 10^9 bacterias por ml según el método. Estas diferencias metodológicas dificultan a veces la comparación de resultados.

La mayoría de los autores reconoce que existe al menos una forma de adhesión inespecífica de los rizobios a la superficie de la raíz de las leguminosas. De este modo una determinada especie de rizobio es capaz de unirse no sólo a la raíz de su planta hospedante sino también a la de una planta heteróloga. (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986a; Smit *et al*, 1986; Pueppke, 1984; Dazzo *et al*, 1976).

La especificidad en la adsorción ha sido definida como un modo de adsorción propio de los rizobios infectivos de la raíz hospedante, que no puede ser realizado por los rizobios heterólogos. Este modo específico de adsorción ha sido efectivamente encontrado en diferentes sistemas simbióticos.

En trébol, la adhesión específica se ha caracterizado y diferenciado de la adsorción inespecífica, por diferencias cuantitativas (Dazzo *et al*, 1976) y cualitativas, donde la adhesión polar de los rizobios a la superficie del pelo radicular y el simultáneo acúmulo de rizobios en el ápice radicular es considerada una forma de adhesión específica de *R. trifolii* a la raíz de trébol (Dazzo *et al*, 1984). Esta forma de pegado es también considerada específica en soja (Stacey *et al*, 1980). En alfalfa la adsorción específica ha sido definida como un modo de adsorción de *R. meliloti* a la superficie radicular de alfalfa que es únicamente competido por otros rizobios homólogos y que no puede ser competido por rizobios heterólogos aunque estos se encuentren en concentraciones 10^3 - 10^4 veces superiores a la de *R. meliloti* (bacteria indicadora de la adsorción presente en una concentración de 10^3 bacterias por ml) (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b).

Otros autores en cambio no han podido encontrar manifestaciones de especificidad simbiótica en esta etapa de pegado de los rizobios a la superficie radicular (Chen y Phillips, 1976; Badenoch-Jones *et al*, 1985; Pueppke, 1984; Vesper y Bauer, 1985; Smit *et al*, 1986).

En algunos casos uno de los posibles motivos que pueden explicar esta falta de especificidad es el uso de altas concentraciones de rizobios en el inóculo que puede enmascarar la respuesta específica (Dazzo *et al*, 1984; Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b) (ver Apéndice 1). La diferencia de resultados podría explicarse también en algunos casos por el uso de bacterias lavadas previo al ensayo de adsorción, considerando que los determinantes de especificidad y quizás otros componentes necesarios para la adhesión se encuentran en la superficie del rizobio y que podrían ser removidos por estos tratamientos.

De todos modos no debe descartarse que existan sistemas donde la especificidad simbiótica no se manifieste en esta etapa de la adsorción de los rizobios a la raíz.

Por otra parte resulta aún una pregunta abierta si la adsorción específica descrita en algunos sistemas como trébol (Dazzo *et al*, 1984) y alfalfa (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b) constituye una etapa obligada en el proceso de asociación simbiótica. Este punto podría resolverse estudiando la capacidad de nodulación de un mutante (de mutación única)

afectado en la adhesión específica, es decir que se comporte como rizobio heterólogo para la adsorción a raíces.

En el sistema alfalfa-*R. meliloti* la respuesta pareció encontrarse con la cepa *R. meliloti* 1028, que es un mutante por inserción de transposón Tn5, no nodulante (induce la formación de muy escasos nódulos vacíos en las raíces de alfalfa) (Buikema *et al*, 1981), que se comportó como bacteria heteróloga en la adsorción de rizobios a raíces de alfalfa (Caetano-Anollés, 1985; Favelukes y Caetano-Anollés, 1985). Estos resultados condujeron a elaborar la hipótesis que la adsorción específica de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa constituye un paso obligado hacia la infección (Favelukes y Caetano-Anollés, 1985). Algunos resultados contradictorios obtenidos posteriormente con esta cepa (A. Lagares, comunicación personal) pusieron en tela de juicio dicha hipótesis. Por esta razón considero que la cuestión si la adhesión específica es un paso obligado o no constituye aún un problema no resuelto. En este trabajo se presentan algunos resultados obtenidos con la cepa 1028 que, sin embargo, dan apoyo a la hipótesis original (ver capítulo 8 y discusión final en capítulo 10).

El estudio del curso temporal de la adsorción de *R. trifolii* a los pelos radiculares de trébol ha permitido definir etapas dentro del proceso de adsorción. Se han reconocido al menos dos modos diferentes de adsorción, uno laxo y reversible que se establece inmediatamente y progresa durante las primeras horas de contacto entre los simbioses y una segunda fase donde aparecen sistemas de anclaje entre los rizobios y la raíz que determinan una adsorción firme e irreversible. El tiempo de aparición de los diferentes tipos de adsorción está en relación directa con la concentración de rizobios utilizada en el ensayo con las raíces (Dazzo *et al*, 1984). Así los acúmulos de rizobios sobre la punta de los pelos radiculares de trébol aparecen en minutos cuando se usan 5×10^8 bacterias por planta y tardan unas horas en aparecer, o no se observan, cuando se utilizan 10^5 - 10^6 bacterias por planta (Dazzo *et al*, 1984); y a las 4 horas aparecen células unidas polarmente al pelo radicular. Esta primer fase reversible de la adhesión de *R. trifolii* a los pelos radiculares de trébol estaría mediada por la lectina trifoliina A. Entre las 8 y 12 horas el pegado se hace irreversible pudiendo observarse al microscopio electrónico microfibrillas asociadas lateral o polarmente con

las bacterias unidas, que se extienden a la superficie de las células vegetales (Dazzo *et al*, 1984).

Cuando se estudia el comportamiento de *R. leguminosarum* en su unión a los pelos radiculares de arveja, los acúmulos de rizobios en la punta de los pelos radiculares de arveja tardan 1 hora en aparecer cuando se utilizan inóculos (relativamente altos) de 10^7 - 10^8 bacterias por segmento de 1 cm de raíz ensayado. La aparición de estos acúmulos correlaciona con la aparición de microfibrillas de celulosa en los rizobios que se adhieren (Smit *et al*, 1986). De estos estudios surge un modelo de adsorción de *R. leguminosarum* a la punta de los pelos radiculares como un proceso en dos etapas. Los mecanismos que actúan en estas etapas pueden ser diferentes dependiendo de las limitaciones nutricionales de los rizobios (Kijne *et al*, 1988a). Primero ocurre una unión reversible inespecífica mediada por una proteína adhesina dependiente de calcio "rhicadhesina" (Smit *et al*, 1987), seguida de una etapa de formación de los acúmulos sobre la punta del pelo radicular. Estos acúmulos son mediados por microfibrillas de celulosa en rizobios crecidos con limitación de fuente de Carbono (Smit *et al*, 1986). En cambio son mediados por la lectina de arveja cuando los rizobios provienen de un cultivo deficiente en manganeso (Kijne *et al*, 1988b). Este mecanismo que involucra la participación de rhicadhesinas y las fibras de celulosa es inespecífico de especie y común para todas las bacterias de la familia *Rhizobiaceae*. El mecanismo que involucra a la lectina de arveja, por el contrario, podría conducir la interacción entre los simbioses hacia la infección (Kijne *et al*, 1988a, 1988b). Esta última idea se refuerza por resultados obtenidos con plantas transgénicas que indican que la presencia de la lectina de arveja es determinante para la infección de la raíz por *R. leguminosarum* (Diaz *et al*, 1989).

Una diferencia notable en los modelos descritos para la adsorción de estos dos rizobios taxonómicamente tan cercanos se encuentra en la participación de genes contenidos en el plasmido Sym. La adsorción de *R. trifolii* depende de la presencia del plasmido Sym (Zurkowski, 1980), especialmente la primera fase reversible mediada por la lectina trifoliina A (Dazzo *et al*, 1985). Sin embargo ninguno de los mecanismos descritos para *R. leguminosarum* necesitaría la presencia del plásmido pSym en los rizobios (Kijne *et al*, 1988a). En el caso de *R. leguminosarum* se ha descrito

recientemente una proteína que une Ca^{+2} codificada por el gen *nod 0* del pSym, que según lo sugieren los autores, podría estar relacionada con las rchadesinas involucradas en el pegado inicial de estos rizobios a los pelos radiculares (Economou *et al*, 1990). Sin embargo, la rchadesina descrita por Smit parece ser constitutiva y la expresión del gen *nod0* depende de la presencia del gen *nodD* y sustancias flavonoides de la planta (ver sección 1.5.).

Otro mecanismo de adsorción sugerido para *B. japonicum* involucra la participación de pilis (fimbrias) o apéndices bacterianos de estructura fibrilar que podrían servir como estructuras de anclaje de las bacterias a la superficie radicular (Vesper y Bauer, 1986). Sin embargo, posteriores estudios con mutantes Tn5 para la piliación (mutantes muy piliados o muy poco piliados) indicaron que este mecanismo de adsorción no estaría involucrado en los procesos que conducen a la nodulación ya que todos los mutantes y la cepa salvaje parental nodularon con igual eficiencia (Vesper *et al*, 1987).

1.17. - FACTORES QUE REGULAN EL PROCESO DE ASOCIACION SIMBIOTICA.

Un sistema tan complejo como es la asociación simbiótica entre rizobios y raíces de leguminosas implica mecanismos de regulación acordes con dicha complejidad.

Se pueden distinguir al menos dos tipos de factores que intervienen en la regulación de la simbiosis : factores propios de los simbiosistas (tomados conjuntamente) y factores externos propios del medio. En esta sección me referiré principalmente a algunos aspectos de regulación de las etapas tempranas de la asociación, infección y desarrollo del nódulo. No se discutirán aquí los mecanismos que operan sobre la expresión y actividad del complejo de la nitrogenasa, sistema enzimático encargado de la reducción del nitrógeno atmosférico a ión amonio, uno de los mecanismos de regulación más estudiados en los sistemas fijadores de nitrógeno (Gallon y Chaplin, 1987; Long, 1989a).

1.17.1. - Factores de regulación propios de los simbioses.

Dentro de las etapas tempranas de la asociación, uno de los procesos que mayor atención ha recibido en los últimos años es la regulación de la expresión de los genes *nod* de los rizobios por acción de sustancias provenientes de la planta, mecanismos que ya se han discutido en secciones anteriores (ver sección 1.5. y 1.11.).

Otro grupo de eventos donde se evidencia un proceso de regulación con la participación de los genomas de ambos simbioses, es la expresión de las diferentes nodulinas, proteínas de la planta propias del nódulo radicular. Las nodulinas se dividen en dos grandes grupos de acuerdo al momento en que se detecta su expresión: nodulinas tempranas y nodulinas tardías (Verma *et al*, 1988).

Las nodulinas tempranas, por ejemplo, se expresan ya antes de producirse la infección. Estudios realizados con mutantes de *R. leguminosarum* curados del plásmido pSym y complementados únicamente con la región de los genes *nod*, indican que la expresión de las nodulinas tempranas de arveja es dependiente de los genes *nod* del rizobio (Nap *et al*, 1989).

Mientras las nodulinas tempranas no necesitan la formación del hilo de infección para ser inducidas, las llamadas nodulinas tardías aparecen recién cuando existen rizobios internalizados en la raíz. Aún dentro de este último grupo, se pueden reconocer que distintas nodulinas tardías se expresan en diferentes estadios de la secuencia simbiótica, lo que conduce a pensar que no están sometidas a una regulación común, sino que existen distintas señales regulatorias (Verma *et al*, 1988). Para el estudio de estas regulaciones resulta muy útil el uso de diferentes mutantes del rizobio que son capaces de interactuar con las raíces cada uno hasta un cierto estadio del proceso de asociación simbiótica.

En los nódulos efectivos de alfalfa se han detectado 17 nodulinas, incluyendo las 5 leghemoglobinas. La inoculación de un mutante *exoB* defectivo en la producción de exopolisacárido ácido, que lleva a la formación de nódulos vacíos sin hilos de infección, induce una sola nodulina en la planta. Un mutante *fix21* normal en su exopolisacárido pero defectivo en su lipopolisacárido, produce nódulos inefectivos, con hilos de infección que no liberan las bacterias a las células meristemáticas o lo hacen en

forma anormal. En estos nódulos se detectan 14 nodulinas, incluyendo las 5 leghemoglobinas. En cambio un mutante Tn5 en el gen *nifH*, produce nódulos de morfología normal, no fijadores de nitrógeno, en los cuales se detectan todas las nodulinas de un nódulo efectivo (Norris *et al*, 1988).

La planta puede regular la nodulación a través de un mecanismo de retroalimentación negativa por el cual la formación de nódulos en una parte de la raíz inhibe la posterior formación de nódulos en otra parte. Esto ha sido observado inoculando raíces de soja en dos oportunidades sucesivas separadas por un cierto lapso de tiempo. De este modo se produce una buena nodulación alrededor de la zona de la raíz susceptible de ser infectada al momento de la primera inoculación, apareciendo una inhibición de la nodulación en la zona susceptible correspondiente al momento de la segunda inoculación (Pierce y Bauer, 1983). También se ha utilizado el sistema de raíz partida ("split-root") en el cual se trabaja con plantas que poseen dos sistemas radiculares principales. Con este método, inoculando una de las raíces y luego de un tiempo la otra, se observa una inhibición de la nodulación en la segunda raíz. Esto indica que la regulación se debe a una respuesta sistémica de la planta (Kosslak y Bohlool, 1985; Sargent *et al*, 1987). Experimentos de injerto de plantas utilizando variedades parentales autorreguladas para la nodulación y mutantes supernoduladoras (que no presentan el fenómeno de inhibición de la nodulación) indicaron que el factor de regulación es activado en la parte aérea de la planta por una señal disparada por la nodulación, y es translocado a la raíz (Gresshoff y Delves, 1986). Del mismo modo el carácter responsable de la supernodulación es controlado por un factor translocado del tallo de la planta (Delves *et al*, 1986). La inducción de la respuesta de la planta, inhibitoria de la segunda nodulación, no requiere de los exopolisacáridos de los rizobios en la primera inoculación (Caetano Anollés *et al*, 1990).

Recientes estudios indican que la planta posee toda la información necesaria para producir e inducir la estructura del nódulo radicular y que los rizobios se encargarían de disparar dichos mecanismos (Truchet *et al*, 1989). Un efecto similar de inducción de estructuras radiculares semejantes a nódulos vacíos se ha obtenido también por administración, a la planta, de sustancias antihormonas (Hirsch *et al*, 1989). En estos nódulos vacíos y

espontáneos ya se manifiesta el fenómeno de autorregulación de la nodulación controlado por la planta (Caetano Anollés et al, 1990).

1.17.2. - Factores externos.

Existen muchos factores externos o del medio que condicionan el éxito de la simbiosis. Los más conocidos son: pH del medio, cationes divalentes, temperatura, nutrición mineral de la planta y disponibilidad de nitrógeno combinado (Dart 1974).

La influencia del pH y los cationes divalentes sobre la infección y nodulación de alfalfa fue estudiada entre otros por Munns (1968 y 1970). Este autor concluye sugiriendo que estos factores actuarían sobre etapas anteriores al proceso de infección en sí.

Así fue encontrado posteriormente que tanto el pH como la presencia de cationes divalentes condicionan marcadamente el éxito de la etapa temprana de adsorción de *R. meliloti* a la superficie radicular de alfalfa (Caetano-Anollés et al, 1989). Esta adsorción resulta totalmente dependiente de la presencia de Ca^{+2} o Mg^{+2} en el medio, es máxima a pH 7 y se anula a pH inferiores a 6. Ambas dependencias se relacionan, de modo que a pH inferiores a 7 se necesitan mayores concentraciones de cationes divalentes para alcanzar el valor de adsorción máximo (Caetano-Anollés et al, 1989). Los cationes divalentes también condicionan la expresión de la especificidad en la adsorción de *R. phaseoli* a las raíces de poroto (Lodeiro y Favelukes, 1989).

En relación a la adhesión de los rizobios a las raíces y la participación del Ca^{+2} , ya se había mencionado (sección 1.16.) el hallazgo de adhesinas propias de las *Rhizobiaceae*, que dependen de Ca^{+2} , y están involucradas en mecanismos inespecíficos de adsorción de rizobios a los pelos radiculares (Smit et al, 1988).

Un factor externo que ejerce una influencia muy grande en el establecimiento de la simbiosis es la presencia de nitrógeno en el medio en formas asimilables por la planta como NO_3^- y NH_4^+ . Puede suponerse que la finalidad última de la simbiosis fijadora de nitrógeno, o la propiedad teleonómica del sistema de acuerdo a la filosofía de Monod (1971), sea justamente la obtención de nitrógeno asimilable para la planta, y de fuentes

de carbono para el rizobio. Este proceso implica complicados mecanismos de interacciones entre ambos simbioses. Es lógico pensar que ante la disponibilidad más directa de nitrógeno en el suelo, entonces el establecimiento de la simbiosis resulte inhibido.

Efectivamente el NO_3^- y el NH_4^+ disminuyen marcadamente -hasta anularla- la nodulación de las leguminosas (Dart, 1974; Streeter, 1988). Sin embargo, también es conocido que muy bajas cantidades de N combinado limitante pueden estimular la nodulación (efecto de arranque o "starter") (Dart, 1974), probablemente por favorecer el desarrollo de la planta que a su vez alcance la capacidad de sostener el costo de biosíntesis del proceso de nodulación, que precede a la efectiva fijación de nitrógeno y la disponibilidad de nutrientes nitrogenados propios.

Todos los estadios de la infección que involucran a las bacterias son sensibles al NO_3^- , incluyendo el crecimiento del hilo de infección, donde se observa menor formación, desorganización y aborto de los mismos (Munns, 1968b; Dart, 1974; Truchet y Dazzo, 1982). En alfalfa la inhibición de formación de pelos radiculares por la presencia de NO_3^- resulta paralela a la inhibición de la secreción de poligalacturonasas por la raíz inducida por los rizobios (Ljunggren, 1969). En cambio, el agregado de NO_3^- 18 mM en alfalfa 5 días después de su inoculación e infección con *R. meliloti* no ejerce ningún efecto sobre el desarrollo posterior de la nodulación (Truchet y Dazzo, 1982), indicando que las etapas sensibles al NO_3^- ya han ocurrido en ese lapso y que los mecanismos de desarrollo del nódulo ya disparados no son detenidos por la presencia tardía de NO_3^- . Sin embargo, en estos nódulos se observa una prematura senescencia probablemente debida a la presencia de esos altos niveles de NO_3^- (Truchet y Dazzo, 1982).

En trébol, la presencia de NO_3^- 1 mM o NH_4^+ 16 mM que inhiben completamente la nodulación, producen una inhibición en la adhesión de *R. trifolii* a los pelos radiculares de trébol y en los niveles de detección de la lectina trifoliina A en raíz (Dazzo y Brill, 1978). Estudios más detallados indican que esta inhibición del pegado de rizobios a los pelos radiculares no se debe a una interacción directa entre el NO_3^- y la trifoliina A (Dazzo y Hrabak, 1982).

En caupí, la presencia de NH_4^+ 16mM en el medio de crecimiento de las plantas determina la desaparición de una actividad estimuladora de la

infectividad de los rizobios (mencionada en la sección 1.14.), presente en el exudado radicular de caupí cuando éste se obtiene en ausencia de NH_4^+ (Baghwat y Thomas 1983).

Estos resultados en su conjunto indican y corroboran que los factores externos como pH, cationes divalentes o nitrógeno combinado, afectan principalmente las etapas tempranas de la asociación simbiótica entre rizobios y leguminosas.

Es posible especular que estos factores externos actúen regulando la producción o actividad de algunas de las señales (factores de regulación) que intercambiadas por los simbioses determinan el mutuo reconocimiento y condicionan la ejecución de las sucesivas etapas de interacción que constituyen el proceso de la asociación simbiótica.

1.18. - CONCLUSIONES: LA SIMBIOSIS FIJADORA DE NITROGENO COMO UN SISTEMA DE INTERCAMBIO DE SEÑALES ENTRE LA BACTERIA Y LA PLANTA.

Más de un siglo de estudio y el enorme impulso dado por la biología molecular en estos últimos 20 años han permitido acumular una gran cantidad de conocimientos sobre el funcionamiento de las simbiosis fijadoras de nitrógeno.

En la actualidad las asociaciones de rizobios y leguminosas se pueden interpretar como sistemas establecidos por mecanismos de reconocimiento a través de un intercambio de señales de naturaleza química y sus respectivas respuestas (Bauer, 1981; Halverson y Stacey, 1986b).

Es importante destacar que ambos simbioses deben poseer la información genética necesaria para llevar a cabo estos procesos. Esto implica que uno -o ambos- de los simbioses debe estar preparado para producir y enviar una primer señal que el otro debe ser capaz de reconocer, sin haber existido ningún contacto previo entre ambos. De este modo se inicia la interacción entre ambos organismos , el microsimbionte y el macrosimbionte.

Los diferentes fenómenos de interacción estudiados indican que las primeras señales se originarían en la planta (por ejemplo quimioattractantes, inductores o represores de los genes *nod*) y serían reconocidas y procesadas por el rizobio. A partir de allí comenzaría el referido intercambio de

señales y sus respuestas que permitirían la prosecución de las sucesivas etapas de la asociación simbiótica y formación del nódulo radicular fijador de nitrógeno.

Quizás, el primer fenómeno de recepción de señales ocurra en el proceso de atracción quimiotáctica de los rizobios hacia la raíz. Los principales quimioattractantes son sustancias de bajo peso molecular, por lo tanto fácilmente difusibles en el medio, que actúan en concentraciones muy bajas (ver sección 1.9.). De este modo el rizobio alcanzaría las zonas donde las próximas señales a ser intercambiadas, quizás menos difusibles, se encuentren en una concentración adecuada para obtener una respuesta.

La colonización rizosférica conduciría a un aumento en la concentración de los rizobios en la inmediatez de la raíz (ver sección 1.10.), incrementando de esa manera la concentración local de las sustancias señales provenientes del rizobio.

La inducción de los genes *nod* regulada por sustancias liberadas por la planta (ver sección 1.11.), permite que el rizobio produzca a su vez señales que tienen que ver con los procesos de deformación y enrulado de los pelos radiculares, y con la inducción de los centros de rediferenciación y multiplicación celular en la raíz de la planta, que darán origen al meristema del nódulo y su morfogénesis (ver secciones 1.3.1. y 1.5.).

La interacción de proteínas de origen vegetal con el rizobio aún en el exterior de la raíz, produciría cambios en el mismo que determinarían un efectivo desarrollo de la posterior infección y nodulación (ver sección 1.14. y 1.15.).

El proceso de adsorción de los rizobios a la superficie radicular ha sido extensamente estudiado, especialmente en relación a la expresión de la especificidad simbiótica en esta etapa. Se puede concluir de los resultados de los diferentes autores que existen más de una forma de adhesión, algunas de ellas inespecíficas que no implican un reconocimiento entre simbioses, y en algunos sistemas al menos una forma específica propia de la asociación simbiótica (ver sección 1.16.). Para una apreciación de la significación de la adsorción específica en relación con la asociación simbiótica debería establecerse si ella es un paso obligatorio intrínseco al proceso de infección y nodulación (ver sección 1.16.). A falta de esta demostración puede argüirse que es obvio que la adsorción superficial a los

pelos radiculares es un paso ineludible que necesariamente precede a la penetración de la pared de los mismos y a la iniciación de los hilos de infección. Más acá de este requerimiento meramente físico, el estado adsorbido puede ser propicio para facilitar aún más el intercambio de señales entre los simbioses; desde este punto de vista puede constituir una etapa importante en el curso de la preinfección. En relación con esto se han reconocido una serie de factores macromoleculares involucrados en la adsorción de los rizobios a la raíz dentro de los cuales se pueden nombrar:

a) Las enzimas glicosidásicas producidas por la planta que modifican la estructura exterior de los rizobios, favoreciendo una adhesión direccional de los mismos al pelo radicular (ver sección 1.12.).

b) Proteínas rizobianas que unen Ca^{+2} , las que intervendrán en formas muy tempranas de unión de los rizobios a la superficie de la raíz, y fibras de celulosa que participan en la acumulación de rizobios en la punta de los pelos radiculares (ver sección 1.16.).

c) Las macromoléculas más estudiadas en relación al proceso de adsorción son las lectinas de la planta. Estas moléculas son capaces de unirse a la superficie de los rizobios en una forma hapteno-específica, reconociendo algún determinante sacarídico expuesto por el rizobio.

Una hipótesis de trabajo muy difundida, conocida como la hipótesis del reconocimiento por lectina, propone que esta molécula es mediadora de la adsorción de los rizobios a la superficie radicular (ver sección 1.14.). Pese a los esfuerzos realizados, esta hipótesis no está cabalmente demostrada y existen algunos resultados contradictorios.

En otros estudios sobre la nodulación (que no tratan del particular proceso de adsorción de los rizobios a la raíz) se ha demostrado que las lectinas desempeñan un rol determinante en el proceso de la asociación simbiótica. Un aspecto importante de estos resultados radica en que los mismos presentan a la lectina como una señal capaz de ser procesada por el rizobio, luego de lo cual este último adquiere capacidades que le permiten llevar a cabo etapas de la asociación simbiótica con mayor efectividad o eficiencia, o incluso producir nuevas señales en respuesta hacia la planta (ver sección 1.14.).

Los exopolisacáridos extracelulares y lipopolisacáridos del rizobio determinarían al menos en parte el éxito del proceso de infección.

Los mismos parecen encontrarse relacionados con el desarrollo de algunas etapas tempranas de la asociación como la unión de lectinas o el fenómeno de adsorción a las raíces, e influyen en el proceso de invasión a través del hilo de infección y etapas posteriores (ver sección 1.15.).

En este proceso de invasión también participarían enzimas glicosidásicas que se han detectado provenientes de ambos simbioses. Es posible que el rizobio produzca algunas de estas enzimas en respuesta a una señal de la planta, quizás una vez atrapado por el pelo radicular o ya en el hilo de infección (ver secciones 1.3.2. y 1.12.).

Otro ejemplo de intercambio de señales lo constituyen la expresión de las nodulinas de la planta, proteínas vegetales propias del nódulo que se expresan luego que la asociación alcanza un determinado estadio, es decir una vez que se haya producido la señal correspondiente en el lugar adecuado (ver sección 1.16.).

El conjunto de información presentada y discutida en este capítulo permite obtener un amplio panorama que abarca las diferentes etapas que conforman el establecimiento de la asociación simbiótica entre los rizobios y las raíces de las leguminosas, en particular lo referente a las etapas tempranas del proceso. La complejidad del sistema, que ya empieza a ser descifrada a nivel molecular, se puede concebir como un esquema de interacciones simples entre los simbioses donde algunas de ellas sean lineales y consecutivas, mientras que otras sucedan en forma paralela y concurrente. De este modo el sistema ofrece una gran variedad de posibilidades de control y regulación del desarrollo de la asociación, característica de los sistemas más evolucionados y con mayores posibilidades de adaptación al medio.

El amplio conocimiento de esta asociación resulta de sumo interés en más de un sentido.

En un plano académico proporciona información sobre los mecanismos que gobiernan un sistema biológico complejo, en el que se asocian dos genomas evolutivamente muy distantes, uno de un organismo procariote y el otro de un vegetal.

Por otra parte un mayor conocimiento del funcionamiento de la asociación simbiótica abre posibilidades de un mejor manejo de la misma, e incluso su modificación por el hombre a través de la ingeniería genética

aplicada a la bacteria o a la planta. Así se podrían obtener sistemas más adecuados para su aplicación agronómica, y por lo tanto de mayor importancia económica para su uso en la alimentación humana o animal.

1.19. - OBJETIVOS DE ESTA TESIS.

El estudio de la adsorción de *Rhizobium meliloti* a la superficie radicular de alfalfa permitió demostrar que la especificidad simbiótica ya se manifiesta en esta temprana etapa de la asociación (Caetano-Anollés y Favelukes 1986b) (ver sección 1.15.). Lo que no se conoce aún, son los eventos moleculares involucrados en este proceso de adsorción y reconocimiento simbiótico.

Con el objetivo de descubrir alguno de estos eventos moleculares, en esta tesis se estudiaron algunos factores que pudiesen estar involucrados en dicho proceso, en particular la participación del exudado radicular como determinante de la adsorción de *Rhizobium meliloti* a las raíces de alfalfa.

Una vez establecida en el proceso de adsorción la existencia de una interacción entre el rizobio y el exudado radicular, se continuó el estudio de la misma. Se buscó establecer su significado dentro del proceso de la asociación simbiótica y se trató de caracterizar a los componentes del exudado radicular involucrados en dicha interacción.

SEGUNDA PARTE

CAPITULO 2

MATERIALES Y METODOS.

2.1. - MEDIOS DE MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE CEPAS Y DE INCUBACION DE BACTERIAS Y PLANTAS.

Los medios de cultivo para cepas de *Rhizobium* y *Agrobacterium* fueron los siguientes (la concentración de los componentes se da en gramos.L⁻¹, excepto cuando se lo especifica):

YEM: (extracto de levadura-manitol): manitol, 10; NaCl, 0.1; MgSO₄.7H₂O, 0.2; K₂HPO₄ 0.5; y extracto de levadura (Difco), 0.4.

Medio mínimo de Götz: Manitol 1; (NH₄)₂SO₄, 0.13; K₂HPO₄, 1.06; KH₂PO₄, 0.53; MgSO₄.7H₂O, 0.25; CaCl₂ 0.011; NaCl, 0.006; Na₂MoO₄, 0.002; componentes minoritarios en µg.L⁻¹: FeSO₄.7H₂O, 150; riboflavina, 20; ácido p-aminobenzoico, 20; piridoxina-HCl, 20; tiamina-HCl 20; y biotina, 20 (Götz et al, 1982).

Cuando fue requerido se agregó a los medios agar (Difco o Merck) y/o rojo congo, en concentraciones de 1.5% y 0.025% respectivamente, y los antibióticos correspondientes. Las soluciones de antibióticos se esterilizaron separadamente por filtración y se agregaron a los medios de cultivo previo a la preparación de las placas o a la inoculación de cultivos líquidos.

Los medios minerales utilizados, todos exentos de nutrientes nitrogenados, fueron los siguientes (la concentración de los componentes se da en gramos.L⁻¹):

Medio de Fahraeus: CaCl₂.2H₂O, 0.114; MgSO₄.7H₂O, 0.12; Na₂HPO₄, 0.15; KH₂PO₄, 0.1; citrato férrico, 0.005. (Se corrigió a pH = 7.00 cuando fue necesario) (Fahraeus 1957). En algunas tablas y figuras este medio se ha indicado como "MF".

Medio de Jensen: CaHPO₄, 1; MgSO₄.7H₂O, 0.2; NaCl, 0.2; K₂HPO₄, 0.2; FeCl₃.6H₂O, 0.1; y 1 ml por L de la siguiente solución de micronutrientes: KCl, 3.73; H₃BO₃, 1.55; MnSO₄.H₂O, 0.85; CuSO₄.5H₂O, 0.13; ZnSO₄.7H₂O, 0.58; (NH₄)₂Mo₇O₂₄.4H₂O, 0.018 (Jensen, 1942). Este medio se utilizó únicamente en los ensayos de nodulación de plantas (ver sección 2.7.)

2.2. - BACTERIAS.

Las cepas utilizadas para los ensayos de adsorción a raíces y de pretratamiento del exudado radicular fueron las siguientes: *R. meliloti* L5-30 (Str^r) (G. Martinez-Dretz, Montevideo, Uruguay); *R. meliloti* L5-30-1 (Str^r, Rif^r) (Caetano-Anollés, La Plata, Argentina); *R. trifolii* A118 (Str^s, Trm^r) (I. Microbiología, INTA-Castelar, Argentina); *R. meliloti* 2011 (J. Dénarié, Toulouse, Francia); *R. leguminosarum* 248 (J. Vasse, Toulouse, Francia) y *R. phaseoli* CE-3 (CIFN, Cuernavaca, Mexico). En los estudios sobre requerimientos genéticos del rizobio para la interacción con el exudado radicular de alfalfa aquí estudiada, se utilizaron las cepas que se detallan y describen en la Tabla 8 (Capítulo 8).

Los cultivos permanentes de *Rhizobium* y *Agrobacterium* se mantuvieron en YEM-agar (1.5% o 0.75%) a 4°C, o en YEM-glicerol 10% a -20°C. Las bacterias se crecieron en el medio líquido adecuado hasta fase estacionaria. A partir de éste se preparó un segundo cultivo por una dilución en medio fresco (1/100) del cultivo estacionario, cuyo desarrollo se siguió hasta la fase de crecimiento deseada. Los cultivos se crecieron en un baño termostatzado a 28°C con una agitación rotatoria de 120 rpm. Los cultivos de *R. meliloti* L5-30 en fase exponencial tardía tenían una concentración bacteriana de aproximadamente 2×10^8 bacterias por ml y una DO(500 nm) aproximada de 0.35-0.45.

2.3. - LEGUMINOSAS, ESTERILIZACION Y GERMINACION DE SEMILLAS.

Las semillas utilizadas en este trabajo fueron: alfalfa var. Dawson (Alexandre y Cía, Buenos Aires), alfalfa var. Don Arturo (INTA, Anguil, La Pampa) y trébol blanco var. El Lucero (INTA, Pergamino, Buenos Aires). Las semillas Dawson se esterilizaron superficialmente por inmersión (sin agitación) en etanol 96° durante 60 minutos y luego en HgCl₂ 0,5%, HCl 0,2% durante 15 minutos, seguido de abundantes lavados con agua estéril (Caetano-Anollés, 1985; Caetano Anollés y Favelukes, 1986a). Cuando se comenzó a trabajar con las semillas Don Arturo - por falta de suministro y existencia de las semillas Dawson en el país -, resultó más efectivo el siguiente método de esterilización superficial. Las semillas se lavaron

durante 30 segundos con etanol 70%, luego 3 lavados sucesivos de 5 minutos cada uno en agua estéril, seguido de un tratamiento de 5 minutos con HgCl_2 0,2% - HCl 0,5% y finalmente 3 o 4 lavados rápidos con agua estéril seguidos de 4 o 5 lavados de 5 -10 minutos también con agua estéril; todos estos tratamientos se realizaron con agitación rotatoria (120 rpm) del recipiente que contenía las semillas.

Las semillas esterilizadas superficialmente se conservaron hasta una semana a 4°C.

Las semillas se germinaron sobre placas de agar-agua invertidas, en la oscuridad, a temperatura ambiente, durante un tiempo determinado por el protocolo del ensayo en el que fueron utilizadas las plántulas (ver secciones 2.6. y 2.7.): obtención de exudados radiculares, ensayos de adsorción bacteriana a las raíces y ensayos de nodulación. En la obtención de exudados radiculares las semillas se germinaron por 24 o 48 horas en placas de medio YEM invertidas y se descartaron las plántulas que ya presentaban signos de contaminación microbiana.

Los resultados de pretratamiento de los rizobios con exudado radicular y adsorción a raíces obtenidos originalmente con semillas de alfalfa var. Dawson, fueron fielmente reproducidos cuando se debió cambiar por semillas var. Don Arturo.

2.4. - OBTENCION DEL EXUDADO RADICULAR.

Exudado radicular crudo: Cincuenta plantas de dos días de germinación se transfirieron a una grilla de acero inoxidable suspendida en un vaso de precipitado estéril de 250 ml, cubierto con una tapa de caja de petri, de modo que sólo las raíces quedaron sumergidas en 100 ml de medio de Fahraeus. Las plantas así dispuestas se cultivaron en una cámara de plantas con un fotoperíodo de 16 horas y una temperatura de 26°C durante tres días. Al término de este tiempo se separó el líquido de las plantas denominándosele exudado crudo. Para determinar la existencia de posibles contaminantes en las preparaciones de exudados radiculares crudos, una alícuota del mismo, apropiadamente diluída, se plaqueó sobre medio YEM-agar y se incubó a 28°C. En estas placas se desarrolló un sólo tipo de colonia de

un contaminante que fue tipificado por pruebas bioquímicas como *Erwinia herbicola* (tipificación realizada por R. Miguel).

Exudado estéril: El exudado crudo se centrifugó a 20000 x g durante 15 a 20 minutos y se esterilizó por filtración a través de una membrana de policarbonato de 0,2 μm de poro.

Exudado dializado: Para obtener la fracción de alto peso molecular del exudado y eliminar las sustancias de bajo peso molecular, el exudado estéril se dializó durante aproximadamente 18 horas contra medio de Fahraeus a 4°C, utilizando indistintamente membranas de diálisis que retienen sustancias de peso molecular ya sea superior a 3.5, o bien 12 kDa. Durante la diálisis el medio de Fahraeus se renovó en dos oportunidades a intervalos regulares. No se observó cambio de volumen en el exudado al final de la diálisis. La esterilidad del exudado dializado se controló por plaqueo de una muestra del mismo en medio rico al final de la diálisis y los preparados con signos de contaminación se descartaron.

Para evitar la contaminación durante la exudación -especialmente de bacterias endógenas provenientes de las semillas (Caetano-Anollés, 1985)-, sesenta plántulas de alfalfa de dos días de germinación se lavaron durante 6 horas con 50 ml de medio de Fahraeus con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin, en un baño rotatorio (28°C con una agitación de 100 rpm), seguido de 6 lavados con medio de Fahraeus estéril (cada uno de 1 minuto). Las plántulas así lavadas se utilizaron como se describió anteriormente para obtener exudados radiculares que resultaron libres de contaminantes según se determinó por plaqueo de los mismos en medio YEM.

Para determinar la influencia del estado de nutrición nitrogenada de la planta sobre la exudación, se obtuvo el exudado radicular a partir de plántulas (previamente lavadas con estreptomycin) que crecieron en un medio de Fahraeus suplementado con KNO_3 5 mM o con NH_4Cl 5mM.

Por motivos que se describen en los capítulos siguientes, salvo que se indique lo contrario, se trabajó siempre con exudado radicular dializado. Y por simplicidad, de aquí en más al exudado radicular dializado se lo denomina ER.

2.5. - PREPARACION DE AGLUTININA DE SEMILLA.

Se siguieron los procedimientos de Paau (Paau *et al*, 1981) y Seegers y La Rue (1985).

Las semillas se molieron en un molinillo eléctrico hasta obtener una harina fina. Esta se desgrasó con hexano a 0°C, y una vez secada se extrajo con 10 volúmenes (10 ml por g de harina) de solución de extracción durante 1 hora con agitación a 4°C. La composición de la solución de extracción con pH 6.8 fue: KH_2PO_4 0.01 M, NaCl 0.15 M, ascorbato de sodio 1% (P/V), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.12% (P/V), polivinipolipirrolidona (previamente lavada con HCl) 2% (P/V). El extracto crudo se separó del residuo de harina por centrifugación (5000 x g durante 15 minutos) y el sobrenadante límpido se dializó durante 1 noche contra buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.00. El precipitado obtenido al final de la diálisis se separó por centrifugación (20000 x g durante 20 minutos) y el sobrenadante límpido se incubó en baño de agua a 80°C durante 30 minutos. El nuevo precipitado obtenido por este tratamiento se separó por centrifugación (20000 x g durante 20 minutos) y el sobrenadante se llevó a 60 % de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Se dejó precipitar a 4°C durante 1 hora. Se separó el precipitado por centrifugación (20000 x g durante 20 minutos) y se resuspendió en un mínimo volumen de buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.00. Esta fracción de proteínas fue desalada utilizando una columna de Sephadex G-25 equilibrada con buffer acetato de sodio 0.2 M pH 4.00 (Columnas NAP25 , Pharmacia). La fracción eluída en el volumen muerto de la columna se conservó a -70°C fraccionada en muestras de 250 μl , hasta su uso para los ensayos de actividad o determinación de proteínas. La preparación de aglutinina se analizó por espectroscopía UV-visible para determinar el grado de contaminación con impurezas no proteicas (p.e: ácidos nucleicos y compuestos flavonoides) de la muestra.

2.5.1. - ENSAYO DE AGLUTINACION DE BACTERIAS.

A partir de un cultivo de rizobios en fase exponencial tardía se preparó una suspensión de bacterias lavadas por centrifugación y resuspensión en buffer acetato de sodio 0.1 M pH 4.00 (3 veces) conteniendo aproximadamente 10^9 bacterias por ml. 100 μl de esta suspensión se mezclaron

con igual volumen de la preparación de aglutinina a ensayar y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 minutos. Luego de una centrifugación a 10000 g durante 10 minutos para sedimentar las bacterias y resuspender suavemente el sedimento, se determinó aglutinación de las bacterias por observación directa y al microscopio óptico. Para determinar la actividad de la aglutinina se ensayaron diluciones sucesivas 1:2 de la misma. La inversa de la máxima dilución que produjo aglutinados de bacterias se tomó como el título de actividad de la preparación de aglutinina.

2.6. - ENSAYO DE ADSORCION BACTERIANA A LAS RAICES.

2.6.1. - ADSORCION TOTAL.

El ensayo corresponde al desarrollado por Caetano-Anollés y Favelukes (1986a) para la cuantificación de la adsorción de rizobios a la superficie radicular de plántulas pequeñas.

Bacterias crecidas hasta fase logarítmica tardía (salvo que se indique lo contrario) se diluyeron con medio de Fahraeus de modo de obtener aproximadamente 10^3 - 10^4 bacterias/ml en la suspensión final. A 22.5 ml de esta suspensión bacteriana contenidos en un recipiente estéril cilíndrico con tapa, de 6 cm de diámetro interno, se le agregaron 15 plántulas de alfalfa de 5 días de germinación, con la ayuda de una pinza estéril, cuidando que el manipuleo de las mismas fuese lo más suave posible para no dañarlas, y se incubaron a 28°C con una agitación rotatoria de 50 rpm durante un tiempo determinado, oportunamente indicado. En aquellos experimentos donde se ensayó la adsorción de bacterias que habían sido preincubadas en diferentes condiciones, el período de incubación final con las plantas fue de 1 hora (salvo donde se indique lo contrario). Al final del período de incubación se descartó el líquido y se lavaron las plantas con 25 ml de medio de Fahraeus a 28°C y una agitación rotatoria de 120 rpm durante 1 minuto, con inmediata remoción de las aguas de lavado. Así se realizaron 4 lavados sucesivos.

Las plantas lavadas se transfirieron en esterilidad al interior de una caja de Petri y se cubrieron con medio YEM agarizado, fundido (42°C), con rojo congo, cicloheximida (25 μ g/ml) y el antibiótico marcador de la

cepa ensayada para la adsorción. Se incubaron en estufa a 28°C durante 2 días y con ayuda de una lupa binocular se contaron las microcolonias blanquecinas que desarrollaron sobre la superficie de la raíz. La zona de la raíz fue reconocida por teñirse con el colorante rojo congo del medio. La concentración de bacterias en el inóculo se determinó por recuento en placa.

La adhesividad (A) se expresó como el porcentaje de bacterias del inóculo que quedaron adheridas a las 15 raíces luego de la incubación y los lavados, detectadas como microcolonias sobre la superficie radicular. Los resultados se expresaron con un intervalo de confianza aproximado para un 95% de significación dado por la siguiente expresión (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986a):

$$A \pm 1.96 \times A \times (1/m + 1/n)^{1/2} \quad (1)$$

donde m y n son los números de colonias enumeradas para evaluar las bacterias adheridas a las raíces y las presentes en el inóculo respectivamente.

Para calcular el promedio ponderado de los valores de adhesividad con un intervalo de confianza aproximado para un 95% de significación con la forma $\underline{A} \pm \underline{s}$, correspondientes a un número N de experimentos independientes con valores de la forma $A \pm s$ calculados según la fórmula I, se utilizó la siguiente expresión:

$$\underline{A} \pm \underline{s} = \frac{\sum wA}{\sum w} \pm \frac{(\sum N)^{1/2}}{\sum w} \quad (2)$$

donde $w=1/s$ (Caetano Anollés, 1985).

2.6.2. - ADSORCION ESPECIFICA.

Se define como adsorción específica a un modo de adsorción de *R. meliloti* sobre las raíces de alfalfa que no puede ser competido por rizobios heterólogos. El ensayo para determinar este modo de adsorción fue desarrollado por Caetano-Anollés y Favelukes (1986b).

Este consistió en realizar el ensayo de adsorción descrito en la sección anterior, con una cepa denominada indicadora marcada con una resistencia a un determinado antibiótico, en presencia de una concentración saturante (10^3 - 10^4 veces superior) de otra cepa competidora sensible al antibiótico marcador. De este modo al plaquear finalmente las plantas

lavadas en el medio para crecimiento de los rizobios, con el antibiótico al que resiste la cepa indicadora, sólo se revelaba esta última como microcolonias sobre la raíz.

Utilizando distintas concentraciones crecientes de la cepa competidora para la incubación con las plantas, se obtuvieron curvas de inhibición de la adsorción de la cepa indicadora, en función de la concentración de la competidora.

Las células de las cepas competidoras se lavaron previamente por centrifugación a 10000 x g durante 15 minutos y resuspensión del sedimento en medio de Fahraeus, para evitar efectos inhibitorios no deseados por sustancias presentes en el medio de cultivo (Caetano-Anollés y Favelukes 1986b).

2.7. - ENSAYOS DE NODULACION.

Los ensayos de nodulación se realizaron en bolsas de polietileno siguiendo la técnica desarrollada por Bhuvanewari *et al* (1980).

5 plántulas de alfalfa de dos días de germinación se transfirieron en forma axénica a una bolsa de polietileno de 15 x 16 cm conteniendo una hoja de papel absorbente (toallas de papel comerciales apropiadamente recortadas y dobladas) y 6 ml de medio Jensen que empapaban el papel. Las plántulas se colocaron sobre el papel a través de un pliegue del mismo realizado en la parte superior, de modo que los cotiledones quedaron hacia el exterior y las raíces hacia el fondo de la bolsa sobre el papel. Así se crecieron durante tres días más en invernáculo, con 24°C, humedad relativa 80% y fotoperíodo de 16 horas. Inmediatamente antes de inocular estas plantas de cinco días, se marcó sobre la bolsa la posición del extremo radicular (marca RT) y con ayuda de una lupa binocular, la posición de los pelos radiculares emergentes (marca ERH). La distancia entre ambas marcas determinó la unidad de distancia de crecimiento radicular, correspondiente a la zona de elongación de la raíz para cada planta (unidad RU). En condiciones axénicas se inocularon las plantas mediante el agregado a cada una de 100 μ l de una suspensión de rizobios (convenientemente preincubados según el experimento) conteniendo aproximadamente 10^4 bacterias totales, bañando la raíz desde su extremo hacia zonas superiores. La nodulación de

Las plantas se analizó determinando la posición relativa de los nódulos a la marca RT de la planta en forma manual, utilizando una regla milimetrada y con la ayuda de una lupa. Para la expresión de los resultados, en algunos casos, las posiciones relativas de los nódulos se normalizaron para cada planta expresándolas en unidades de raíz (RU).

Los valores calculados para los diferentes parámetros analizados: posición del primer nódulo respecto de RT, número de nódulos arriba de RT por planta, número de nódulos por plantas, se expresan \pm el error típico de la media aritmética (ETM). $ETM = \sigma_{n-1} / n^{1/2}$, siendo σ_{n-1} la desviación estandar de la muestra y n el tamaño de la muestra analizada.

2.8. - PREINCUBACION DE LAS BACTERIAS.

2.8.1. - PREINCUBACION DE LOS RIZOBIOS EN MEDIO MINERAL.

A partir de un cultivo de rizobios en la fase de crecimiento deseada, se realizaron diluciones seriadas 1:10 ó 1:100 con medio de Fahraeus, para obtener una suspensión con aproximadamente 10^3 - 10^4 bacterias por ml. 25 ml de esta suspensión se incubaron en frascos cilíndricos de 6 cm de diámetro interno con tapa, a 28°C y con una agitación rotatoria de 50 rpm durante un período variable entre 1 y 4 horas. Finalizado este tiempo se tomaron 2.5 ml para determinar la concentración bacteriana en el inóculo por plaqueo, y a los 22.5 ml restantes se les agregaron 15 plántulas de alfalfa para ensayar la adsorción de los rizobios pretratados a la superficie radicular, como se indica en la sección 2.6. En algunas oportunidades se ensayó el comportamiento de bacterias previamente lavadas. Para ello se centrifugaron 10 ml de un cultivo de rizobios en la fase de crecimiento deseada a 10000 x g durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento de bacterias se resuspendió en igual volumen de medio de Fahraeus. A partir de esta suspensión se realizaron las diluciones de igual modo que con los cultivos sin centrifugar. Como control del tratamiento mecánico que significa el proceso de sedimentación por centrifugación y resuspensión de las bacterias sedimentadas, a las bacterias centrifugadas se las resuspendió en el mismo sobrenadante, y luego se las ensayó del mismo modo que a las otras bacterias.

2.8.2. - PREINCUBACION DE LOS RIZOBIOS EN EXUDADO RADICULAR.

2.8.2.1. - DETERMINACION DEL EFECTO DE PREINCUBACION DE LOS RIZOBIOS SOBRE SU POSTERIOR ADSORCION A LAS RAICES.

Un cultivo de rizobios en fase exponencial tardía ($DO(500\text{ nm}) = 0.35 - 0.45$), salvo que se indique lo contrario, se diluyó apropiadamente con medio de Fahraeus y una alícuota de 2.5 ml se mezcló con 10 ml de exudado radicular -experimental- o de medio de Fahraeus -control- y se preincubaron a 28°C con una agitación rotatoria de 50 rpm en los frascos utilizados para los ensayos de adsorción, durante 3 horas. Al término de este tiempo se diluyó la mezcla experimental con 12.5 ml de medio de Fahraeus y la mezcla control con 10 ml de exudado radicular más 2.5 ml de medio de Fahraeus. De este modo los líquidos de ambas mezclas finales tuvieron la misma composición (exudado radicular, medio de Fahraeus y rizobios en una concentración aproximada de 5×10^3 bacterias por ml) inmediatamente antes del agregado de las plántulas. En algunas ocasiones el control se diluyó únicamente con medio de Fahraeus, de modo que en este otro control no hubo un agregado extra de exudado radicular al medio. En forma inmediata se tomó una alícuota de 2.5 ml para determinar el número de rizobios en el inóculo, que se mantuvieron en baño de 0°C hasta su plaqueo. A continuación, 15 plántulas de alfalfa de 5 días se agregaron a los 22.5 ml restantes. Los rizobios y las plantas se incubaron a 28°C con una agitación rotatoria de 50 rpm durante 1 hora para determinar la adsorción de los rizobios preincubados a las raíces, según se detalló antes (ver sección 2.6.).

La estimulación de la adhesividad de los rizobios por su preincubación se llamó actividad estimuladora del exudado radicular (S) y se calculó según la expresión:

$$S = [A_{(ER)} - A_{(MF)}] \times 100 / A_{(MF)}$$

donde $A_{(ER)}$ representa la adhesividad de los rizobios preincubados con exudado radicular y $A_{(MF)}$ representa la adhesividad del control, o sea de los rizobios preincubados con el medio de Fahraeus.

2.8.2.2. - DETERMINACION DEL EFECTO DE PREINCUBACION DE LOS RIZOBIOS SOBRE EL COMPORTAMIENTO DE LOS MISMOS EN LA NODULACION DE RAICES DE ALFALFA.

Un cultivo de rizobios en fase exponencial tardía de crecimiento se diluyó apropiadamente con medio de Fahraeus y finalmente con ER de alfalfa de modo de obtener una suspensión con aproximadamente 2×10^5 bacterias por ml que se preincubó a 28°C con una agitación rotatoria de 50 rpm durante tres horas. Al termino de esta preincubación los rizobios en la misma suspensión se inocularon sobre plantas dispuestas para el ensayo de nodulación (ver sección 2.7.). Como control del efecto de la preincubación sobre la adhesividad de los rizobios, una parte de esta suspensión de rizobios preincubados se diluyó apropiadamente en medio de Fahraeus hasta obtener 5×10^3 bacterias por ml, y a esta nueva suspensión se le agregaron inmediatamente las plántulas de 5 días para medir la adsorción de los rizobio a las raíces como se describe en la sección 2.6.).

Como controles se realizaron preincubaciones en medio de Fahraeus y en ER de alfalfa previamente calentado a 100°C durante 30 minutos (ver sección 2.10.1.).

2.8.3. - PREINCUBACION DE LOS RIZOBIOS CON AGLUTININA DE SEMILLA Y DETERMINACION DE SU EFECTO SOBRE LA ADSORCION DE LOS RIZOBIOS A LAS RAICES Y NODULACION DE LAS MISMAS.

Un cultivo de rizobios en fase exponencial tardía de crecimiento se diluyó apropiadamente con medio de Fahraeus hasta obtener una suspensión con aproximadamente 2×10^5 bacterias por ml. A esta suspensión se le agregó aglutinina de alfalfa (preparada según se describe en la sección 2.5) en concentraciones variables en un rango de 1 a 10^{-7} $\mu\text{g/ml}$ y se preincubaron a 28°C con una agitación rotatoria de 50 rpm durante tres horas. Al fin de este lapso se determinó la concentración bacteriana en la suspensión por plaqueo, y se inocularon plantas para medir y caracterizar la nodulación producida por estos rizobios (sección 2.7.). Una alícuota de los mismos rizobios se diluyó con medio de Fahraeus para obtener una concentración

aproximada de 5×10^3 bacterias por ml y con ella ensayar la adsorción de los rizobios a las raíces de plantas de alfalfa (sección 2.6.1.).

2.9. - PRETRATAMIENTO DEL EXUDADO RADICULAR CON RIZOBIOS.

9 ml de un cultivo de rizobios en fase exponencial tardía se centrifugaron a 10000 x g durante 10 minutos y el sedimento de bacterias se resuspendió en 25 ml de ER de alfalfa obteniéndose una suspensión bacteriana con aproximadamente 10^7 bacterias por ml. Esta suspensión se incubó a 28°C sin agitación durante 30 a 40 minutos. Luego, se centrifugó a 20000 x g durante 20 minutos y el sobrenadante se filtró por membrana de policarbonato de 0.2 μm de poro para eliminar las bacterias remanentes. Este exudado pretratado con rizobios y ahora libre de los mismos, se utilizó para preincubar nuevos rizobios y ensayar así su actividad estimuladora. Como control positivo de actividad estimuladora se utilizó una muestra de la misma preparación del ER sometida a similares pretratamientos pero sin rizobios.

Se realizaron también, experimentos similares de pretratamiento del ER con rizobios pero variando la concentración de estos últimos. En estos casos las bacterias del cultivo centrifugado fueron resuspendidas en medio de Fahraeus. Los rizobios de esta suspensión se diluyeron en forma seriada con medio de Fahraeus y finalmente en los 25 ml de ER de modo de obtener las concentraciones deseadas de rizobios para pretratar el exudado radicular. La incubación y procesamiento posterior de estas suspensiones fue similar a lo descrito más arriba.

2.10. - PROCEDIMIENTOS DE CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ESTIMULANTE DE LA ADSORCIÓN DE LOS RIZOBIOS A LAS RAICES.

2.10.1. - TRATAMIENTOS TÉRMICOS.

En experimentos independientes una muestra de exudado radicular dializado se calentó en baño de agua a 100°C durante 30 minutos, o en baño de agua a 75°C durante 60 minutos. Luego de enfriarlos, estos ER calentados se utilizaron para ensayar su actividad estimuladora sobre la adhesividad

de los rizobios como se describe en la sección 2.8.2.1. Como control se utilizó una muestra de la misma preparación de exudado radicular que no se sometió a ningún tratamiento térmico.

Por otra parte se ensayó el efecto de la congelación a -70°C y descongelación de una muestra activa de ER de alfalfa.

2.10.2. - TRATAMIENTO CON TRIPSINA.

A una muestra de ER de alfalfa se le agregó $50\ \mu\text{g/ml}$ de tripsina de pancreas bovino (Tipo I, Sigma) y se incubó a 28°C por 1 hora. Para detener la reacción y evitar una posterior acción de la tripsina, se agregó $20\ \mu\text{g/ml}$ de inhibidor de tripsina (Tipo I-S, Sigma) al ER-tripsina tratado. La actividad de la tripsina se midió por la hidrólisis de N- α -Benzoil-DL-arginina-p-Nitroanilida (Sigma), sustrato cromogénico de la tripsina. Las condiciones de reacción fueron: concentración del sustrato $1.8\ \text{mM}$ en buffer fosfato $10\ \text{mM}$ a pH 7.0, a 28°C , midiendo el producto coloreado por lecturas de DO(400 nm) luego de 1 hora de incubación. Se observó actividad de tripsina en estas condiciones en las mezclas de incubación con ER y no se detectó actividad de tripsina luego del agregado del inhibidor.

2.10.3. - TRATAMIENTOS CON RESINAS INTERCAMBIADORAS DE IONES.

Para separar el componente activo del ER de alfalfa se ensayaron tratamientos en batch y cromatografía en columna del mismo con materiales intercambiadores de iones. Se utilizaron S-Sepharosa (Pharmacia) como resina intercambiadora de cationes (material aniónico fuerte) a pH 6.20 y Q-Sepharosa (Pharmacia) como resina intercambiadora de aniones (material catiónico fuerte) a pH 7.90.

Tratamiento en batch: 30 ml de ER de alfalfa - originalmente a pH 7.0 - se llevaron al pH elegido para la resina a utilizar y se incubaron con 0.2 ml de la resina - previamente equilibrada con medio de Fahraeus al pH elegido de trabajo - durante 1 hora, con agitación suave para mantener la resina en suspensión y a temperatura ambiente. A continuación se separó el sobrenadante de la resina por decantación y filtración a través de una membrana de $0.2\ \mu\text{m}$ de poro de policarbonato y se corrigió nuevamente su pH a

7.00. La resina se recuperó del filtro y se trató con 0.6 ml de KCl 1 M en buffer fosfato 50 mM a pH 7.00 durante 10 minutos. Se filtró el nuevo sobrenadante por membranas de policarbonato de 0.2 μm de poro y el filtrado se dializó contra medio de Fahraeus con una relación de volúmenes de 1:500 y se hicieron tres cambios de las aguas de diálisis a intervalos regulares durante 18 horas a 4°C. En algunas oportunidades el desalado se realizó utilizando una pequeña columna de Sephadex G-25 (columnas PD10 de Pharmacia) equilibrada con medio de Fahraeus. Tanto el sobrenadante del tratamiento con las resinas como los eluidos de las mismas dializados, se utilizaron para preincubar rizobios y determinar la actividad estimuladora de la adsorción en las diferentes fracciones. Como control positivo se utilizó una muestra de la misma preparación de ER sometida a las mismas condiciones de temperatura y filtración que las muestras tratadas con las resinas. En el caso de la fracción eluida de las resinas, para la preincubación de los rizobios -como se indica en la sección 2.8.2.1.- se utilizó una alícuota con un volumen equivalente a 10 ml de exudado original que se completó hasta 10 ml con medio de Fahraeus.

Tratamiento en batch y elución con gradiente: 950 ml de ER de alfalfa se trataron con 7 ml de resina S-Sepharosa a pH 6.00 durante 1 hora en batch con agitación a temperatura ambiente. La resina se separó por decantación y se utilizó para rellenar una columna C10 con adaptadores AC10 (Pharmacia). La columna resultante (de 1 cm de diámetro y 8.8 cm de altura) se eluyó con un gradiente de KCl en buffer fosfato 10mM a pH 6.00, a una velocidad de 9 ml por hora. Las fracciones eluidas (1.0 ml) se monitorearon a 214 nm. Ante la falta de señal de absorción a lo largo del cromatograma los volúmenes eluidos se agruparon arbitrariamente en 6 fracciones de 5.8 ml cada una, que fueron esterilizadas por filtración a través de membranas de policarbonato de 0.2 μm de poro y dializadas exhaustivamente contra medio de Fahraeus (pH 7.00) durante 20 horas. Una alícuota de 1 ml de estas fracciones se utilizó para determinar la presencia de actividad estimuladora de la adsorción rizobiana en las mismas. Con las alícuotas correspondientes a las diferentes fracciones se preincubaron los rizobios en la forma habitual, completando volúmenes con medio de Fahraeus donde fuese necesario (12.5 ml en la preincubación y 22.5 ml en la incubación final con las raíces, ver sección 2.8.2.1.). Como control se utilizó la preincubación

de los rizobios en medio de Fahraeus sin agregado alguno de exudado radicular. Se determinó también la actividad de una muestra del ER original y del sobrenadante del ER tratado con la resina una vez filtrado y corregido su pH a 7.0.

2.10.4. - ANALISIS DE PROTEINAS EN EL EXUDADO RADICULAR Y METODOS DE CONCENTRACION.

Se utilizaron distintos métodos para tratar de determinar proteínas en las preparaciones de exudados radiculares: el método de Lowry *et al* (1951) y absorbancia en el ultravioleta, A_{280}/A_{260} (Warburg y Christian, 1941, en Darbre, 1986), y A_{215}/A_{225} (Wadell, 1956, en Darbre, 1986).

Las muestras de exudados radiculares se intentaron concentrar por diferentes métodos:

1. Disminución del volumen por diálisis sobre un colchón de polivinilpirrolidona en polvo a 4°C.

2. Liofilización de las muestras y resuspensión en un volumen 100 veces menor de agua desionizada.

3. Ultrafiltración por membrana Amicon AM10 capaz de retener sustancias de peso molecular superior a 10 kDa, hasta obtener una reducción del volumen de 50 veces. En un intento por evitar una posible adsorción de los componentes activos sobre la membrana, esta se preincubó durante 1 hora con una solución de albumina bovina 3%.

4. Utilización de resinas de intercambio iónico como se indica en la sección 2.10.3.

2.10.5. - ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Se utilizó la técnica de Laemmli (1970):

Gel de apilamiento: acrilamida 5% (P/V); N,N'-metilen(bis)acrilamida 0.13% (P/V); Tris-HCl 0.125 M (pH 6.8); dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1% (P/V); N,N,N',N'-tetrametilendiamina (TEMED) 0.33% (V/V); persulfato de amonio 0.05% (P/V).

Gel de separación: acrilamida 15 o 12% (P/V); N,N'-metilen(bis)acrilamida 0.32% (P/V); Tris-HCl 0.375 M (pH 8.8); SDS 0.1% (P/V); TEMED 0.125% (V/V); persulfato de amonio 0.05% (P/V).

Buffer de electrodo: Tris-HCl 0.025 M (pH 8.3); glicina 0.192 M; SDS 0.1% (P/V).

Buffer de muestra: Tris-HCl 0.0625 M (pH 6.8); SDS 2% (P/V); β -mercaptoetanol 5% (V/V); glicerol 10% (V/V); azul de bromofenol 0.001% (P/V).

En algunas oportunidades se usaron geles de 15 x 20 cm x 1 mm de espesor, sembrando 50-80 μ l en un ancho de 5mm; en otras se utilizaron geles de 10 x 8 cm y 0.75 mm de espesor, sembrando 10-20 μ l en un ancho de 3mm (sistema de electroforesis minislab II (BIORAD)). Las corridas fueron realizadas a temperatura ambiente. Se comenzó a 60 V para el gel de apilamiento y luego se continuó a 150 V hasta que el frente de azul de bromofenol llegaba al límite inferior del gel.

Tinción con plata: El procedimiento utilizado fue el siguiente (Merril et al 1981, modificado):

- a- Fijación del gel en metanol-ácido acético-agua (50:10:40 V/V) durante 30 a 60 minutos.
- b- Tres lavados sucesivos de 10 minutos cada uno en etanol-ácido acético-agua (10:5:85 V/V).
- c- Tratamiento con $K_2Cr_2O_7$ 3.4 mM y HNO_3 3.2 mM.
- d- Cuatro lavados rápidos (30 segundos) con agua desionizada.
- e- Tratamiento con $AgNO_3$ 0.012 M durante 30 minutos.
- f- Dos lavados rápidos con agua desionizada.
- g- Dos lavados rápidos y posterior revelado durante 15 minutos o más con Na_2CO_3 0.28 M, formol 0.05% (V/V).
- h- Detención de la reacción con ácido acético 5%.

La sensibilidad para este método de tinción con plata es del orden de 0.1 ng/mm² (para geles de 0.8mm) dependiendo de la naturaleza de la proteína analizada (Morrisey, 1981).

Algunas electroforesis (geles gradientes desnaturalizantes) se corrieron con el sistema de minigeles Phastsystem, de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Pharmacia). Estos geles se revelaron combinando los métodos de tinción con Coomassie Blue y con plata (Phastsystem)

con una sensibilidad de 0.3-0.5 ng de proteína por banda para una siembra de 1 μ l por calle.

TERCERA PARTE

**ESTUDIO DE INTERACCIONES TEMPRANAS ENTRE
Rhizobium meliloti Y LAS RAICES DE ALFALFA.**

CAPITULO 3

CURSO TEMPORAL DE LA ADSORCION DE LOS RIZOBIOS A LAS RAICES.

En un estudio anterior sobre la adsorción de *Rhizobium meliloti* L5-30 a la superficie radicular de plántulas de alfalfa, se había encontrado que la adhesividad de los rizobios varía en forma no lineal con el tiempo de incubación de las plantas en la suspensión de rizobios (Caetano-Anollés, 1985).

Los resultados que se muestran en la Figura 1.A, curva I, ejemplifican esta variación. En dicha curva se pueden distinguir tres etapas diferentes. Un período inicial de latencia de aproximadamente 3 horas donde la adhesividad rizobiana aumenta en forma muy lenta; un segundo período de adsorción activa donde la adhesividad aumenta rápidamente, aumento que resulta mayor que el del número de bacterias en la suspensión rizobiana debido a la multiplicación bacteriana; y finalmente hacia las 6 a 8 horas de incubación el aumento de adhesividad con el tiempo disminuye haciéndose incluso menor que el aumento de la concentración bacteriana, cuya multiplicación continúa en forma constante.

Cuando se ensayó la adsorción de *R. meliloti* L5-30 en presencia de concentraciones saturantes del competidor heterólogo *R. trifolii* A118 - condición que define operacionalmente el modo de adsorción específica de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b)- se encontraron las mismas variaciones temporales de la adhesividad rhizobiana (Figura 1.A, curva II).

El tiempo de generación de *R. meliloti* L5-30 en la mezcla de incubación, a lo largo de todo el período de tiempo estudiado, fue de 2.5 horas, independientemente de la presencia o no del competidor *R. trifolii* A118 en concentraciones mil veces mayores (Figura 1.B).

El período inicial de latencia encontrado, sugirió la existencia de cierto acondicionamiento o preparación lenta de uno o ambos simbioses, que aumentaría sus capacidades para llevar a cabo el proceso de adsorción superficial entre ambos. Es importante remarcar que en este proceso de adsorción ya se manifiestan mecanismos de selectividad que reflejan la especificidad del par simbiótico *R. meliloti*-alfalfa (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b).

Este hipotético acondicionamiento de los simbioses podría llevarse a cabo de diferentes formas:

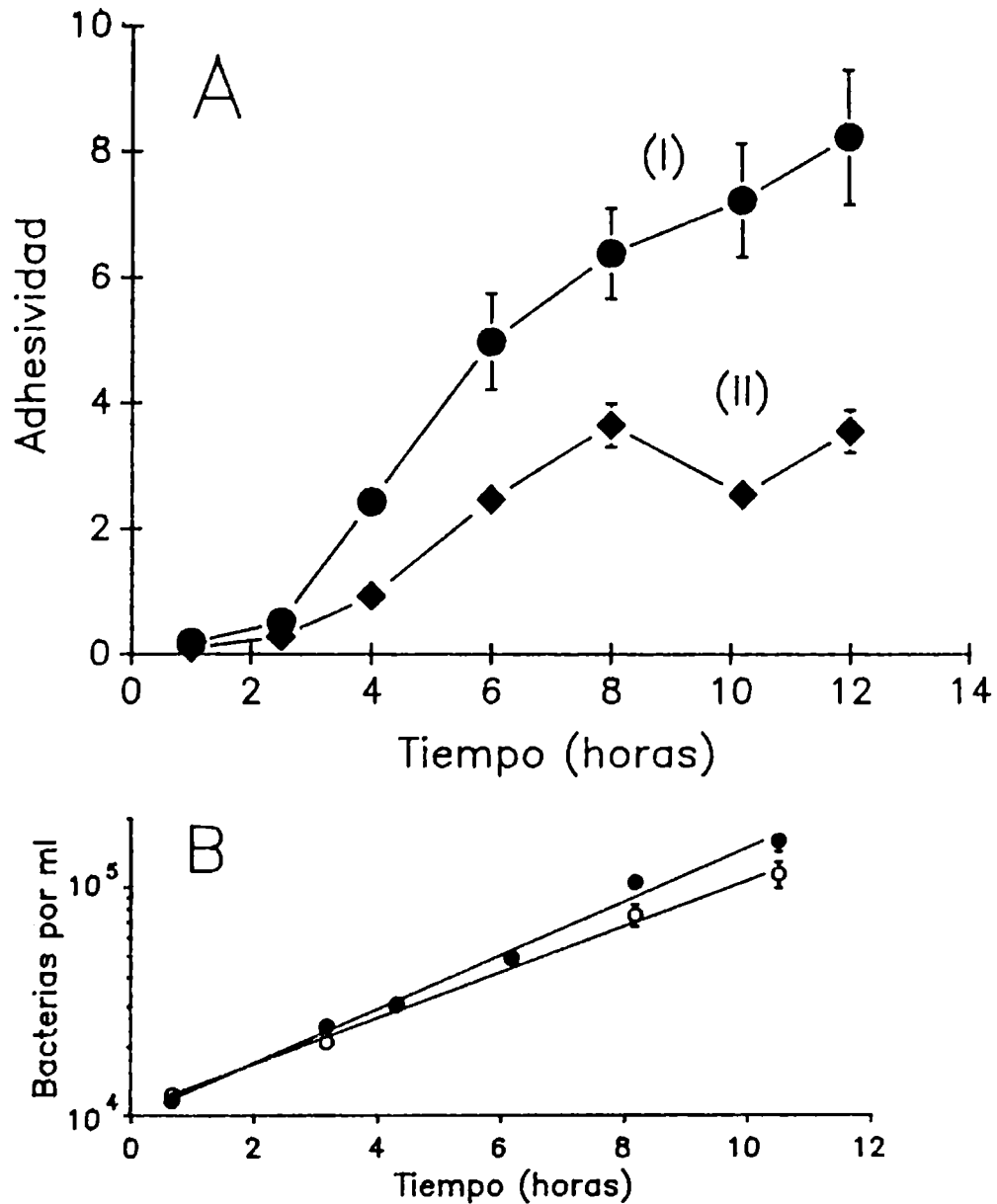


FIGURA 1: A. Curso temporal de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a la superficie radicular de alfalfa.

Quince plántulas de alfalfa de 5 días se incubaron a 28 °C con una agitación de 50 rpm, durante los tiempos indicados, con 22.5 ml de una suspensión de bacterias provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía diluido con medio de Fahraeus hasta una concentración de 10^3 - 10^4 células por ml. La adsorción rizobiana se expresa como adhesividad (el porcentaje de las bacterias *R. meliloti* L5-30 presentes en la suspensión inicial que quedaron adsorbidas a la superficie de las raíces luego del período de incubación y los posteriores lavados) (ver capítulo 2, sección 2.6.1.). Curva I (●), adsorción total, en ausencia de bacterias competidoras. Curva II (◆), adsorción específica, en presencia de concentraciones saturantes de la competidora heteróloga *R. trifolii* A118 (aproximadamente 10^7 bacterias por ml) (ver capítulo 2, sección 2.6.2.). Las barras verticales indican intervalos de 95% de confianza.

B. Crecimiento de *R. meliloti* L5-30 en el medio de incubación final con las plantas.

La concentración bacteriana se determinó por recuento en placas; (●) en ausencia de bacterias competidoras, (○) en presencia de la competidora *R. trifolii* A118 (aproximadamente 10^7 bacterias por ml al inicio). Las barras verticales indican intervalos de 95% de confianza.

1) Adaptación de los rizobios provenientes de un medio de cultivo rico, en fase exponencial tardía (aproximadamente 2×10^8 bacterias por ml), a las condiciones de dilución del inóculo en medio mineral (aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml) con los nutrientes del medio de cultivo diluidos en la misma proporción que las bacterias.

2) La germinación de las semillas sobre agar-agua produce plántulas donde las raíces desarrollan al aire. La inmersión de las plántulas en la suspensión de bacterias diluidas en medio mineral constituye una nueva condición ambiental para las raíces. La adaptación de las raíces al medio mineral podría ocurrir de diferentes maneras: a través de la absorción y adsorción de iones del medio; cambios en el potencial de interfase de la superficie radicular; producción de gradientes de sustancias debido a procesos de exudación de la raíz hacia el medio; procesos que podrían alterar la composición y reactividad fisicoquímica de la superficie radicular.

3) Interacción de los rizobios con sustancias provenientes de la planta, que modifiquen la reactividad de los mismos para el proceso de adsorción.

4) Interacción de las raíces con sustancias provenientes de los rizobios, que modifique la reactividad superficial de las mismas para el proceso de adsorción.

En las secciones siguientes se presentan y discuten los resultados del estudio de alguno de estos posibles acondicionamientos e interacciones.

CAPITULO 4

**PREINCUBACION DE LOS SIMBIONTES EN MEDIO
MINERAL. EFECTOS SOBRE LA POSTERIOR
ADSORCION DE *Rhizobium meliloti* A LAS RAICES DE
ALFALFA.**

4.1. - INTENTOS DE ACONDICIONAMIENTO DEL MICROSIMBIONTE.

Se estudió los efectos que la preincubación de *R. meliloti* L5-30 en medio mineral de Fahraeus durante distintos tiempos, causa sobre la posterior adsorción de los rizobios a las raíces de alfalfa en incubaciones finales de 1 o 6 horas con las plantas. Los resultados de un experimento de este tipo se muestran en la Figura 2. La preincubación de los rizobios en medio mineral produce cambios transientes en su adhesividad, presentando un aumento para tiempos de preincubación de 1 hora, y disminuciones con preincubaciones más prolongadas (2 a 4 horas). Estos efectos sobre la subsiguiente adsorción se observaron para períodos de incubación final con las plantas tanto de 1 hora como de 6 horas.

Se planteó entonces la pregunta si la presencia de nutrientes provenientes del medio de cultivo era necesaria o no para la manifestación de estos efectos; para responder a ello se ensayaron bacterias previamente lavadas con medio de Fahraeus. En este caso se tuvo en cuenta resultados previos que indicaban que tratamientos de lavado de los rizobios por centrifugación o por filtración y posterior resuspensión en medio de Fahraeus producen una fuerte disminución de la adhesividad de los mismos (Caetano-Anollés, 1985). Para ello se realizó un control del tratamiento mecánico que implica el procedimiento de lavado de las bacterias utilizando bacterias centrifugadas y resuspendidas en el mismo sobrenadante. Los resultados se muestran en la Figura 3.

El estímulo de adhesividad observado para 1 hora de preincubación de los rizobios en medio de Fahraeus resultó así estar relacionado con la integridad física de los rizobios provenientes del medio de cultivo. El simple tratamiento de centrifugación-resuspensión de los rizobios fue suficiente para eliminar la capacidad de los mismos de ser estimulados por la preincubación de 1 hora en medio de Fahraeus, como también ocurrió cuando el medio de cultivo sobrenadante fue reemplazado por medio de Fahraeus. De este modo resultó imposible contestar la pregunta planteada acerca del rol de los nutrientes en el acondicionamiento encontrado.

Es probable que los componentes mecánicamente frágiles de los rizobios que son importantes para el proceso de adsorción a las raíces, - puestos en evidencia con estos resultados experimentales (Figura 3)- estén

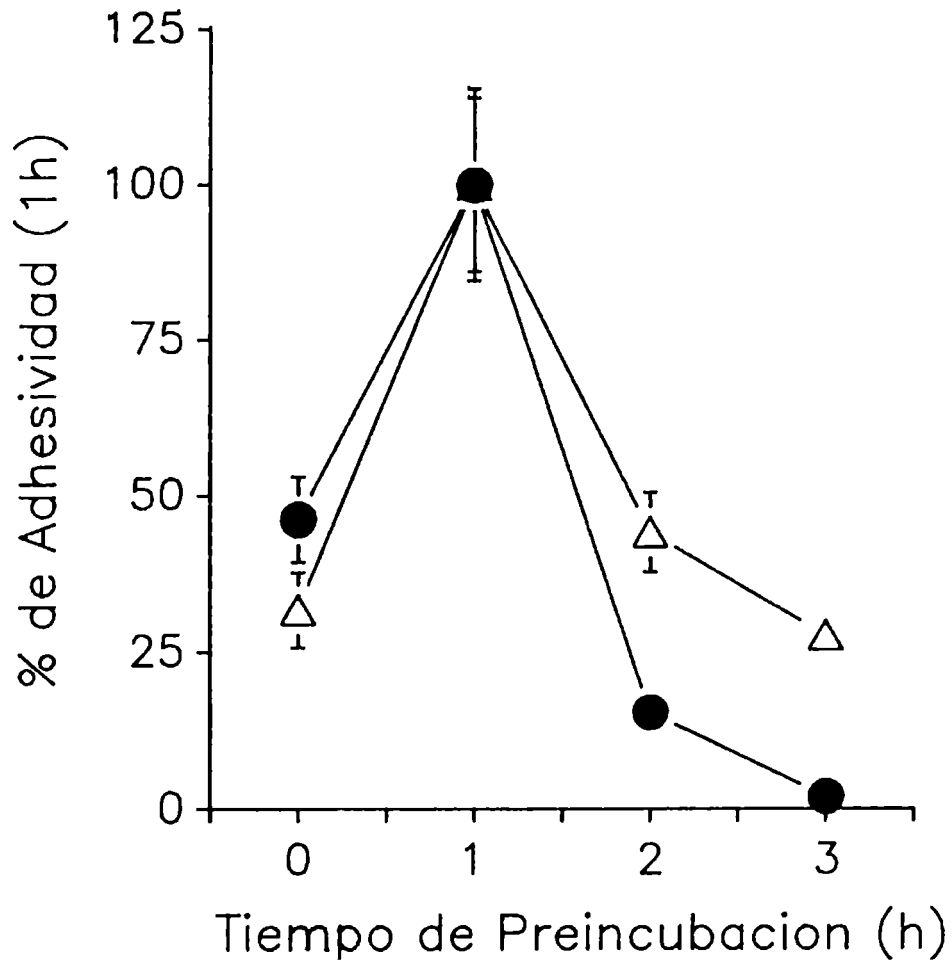


FIGURA 2: Preincubación de *R. melioli* L5-30 en medio de Fahraeus: efectos sobre su posterior adsorción a las raíces de alfalfa.

Un cultivo en medio YEM, en fase exponencial tardía (2×10^8 bacterias por ml) se diluyó con medio de Fahraeus hasta 10^3 - 10^4 bacterias por ml. 25 ml de estas suspensiones se preincubaron durante los tiempos indicados a 28°C con una agitación de 50 rpm. Finalizado este período se tomaron 2.5 ml para determinar la concentración bacteriana por plaqueo; a los 22.5 ml restantes se les agregaron 15 plántulas de alfalfa de 5 días, la mezcla se incubó a 28°C y 50 rpm durante 1 hora (●), o 6 horas (Δ), y se determinó la adhesividad (Capítulo 2, sección 2.6.1.). Los resultados se expresan como porcentaje del valor máximo de adhesividad (A) obtenido en las incubaciones finales respectivas, A (1 hora) máxima=0.95 % 0.13, A (6 horas) máxima=13,15 % 2.04. Las barras verticales indican intervalos de 95% de confianza.

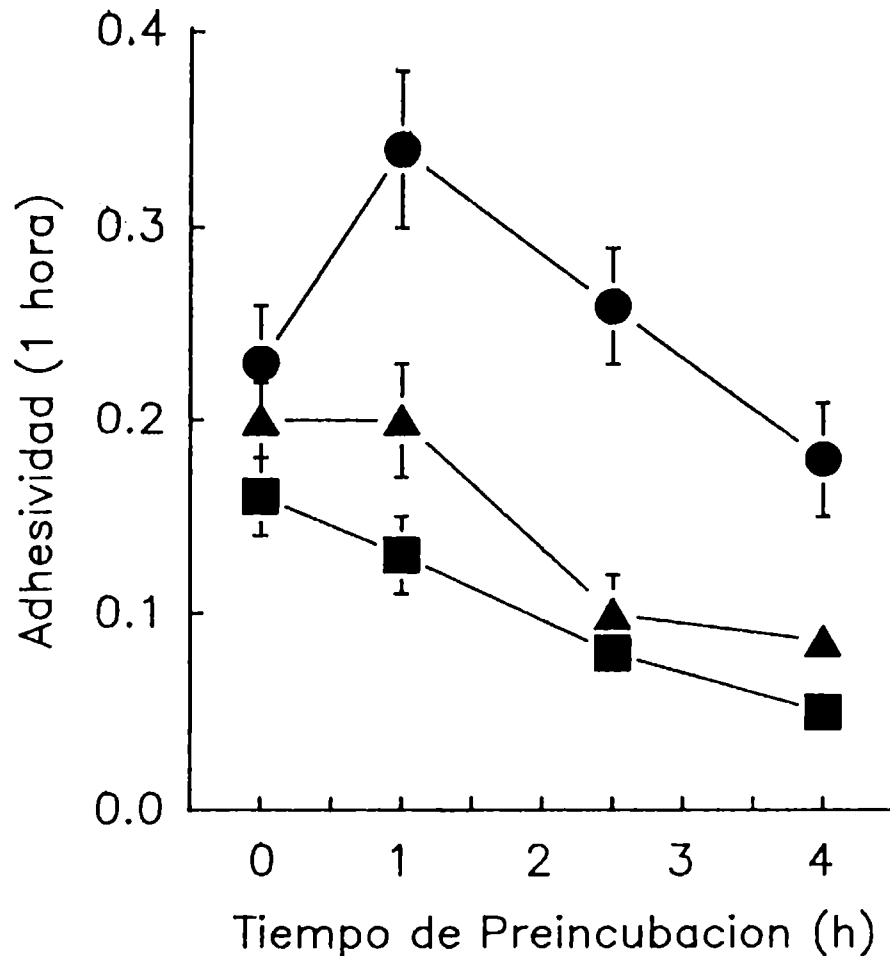


FIGURA 3: Preincubación de *R. melioli* L5-30 en medio de Fahraeus y efectos sobre su posterior adsorción a las raíces de alfalfa: Comportamiento de bacterias previamente lavadas.

Un cultivo en fase exponencial tardía se separó en tres partes que tuvieron diferentes tratamientos: I. Bacterias tratadas mecánicamente (centrifugadas a 10000xg durante 15 minutos, a 4°C, resuspendidas en el propio sobrenadante del medio de cultivo usado) (■); II. Bacterias lavadas (centrifugadas como en I, y resuspendidas en medio de Fahraeus en un volumen igual al original) (▲); III. Bacterias control sin manipulación (porción del cultivo mantenida a 4°C durante el tiempo de centrifugación de I y II) (●). Inmediatamente los cultivos se diluyeron con medio de Fahraeus hasta aproximadamente 10^4 bacterias por ml y 25 ml de estas suspensiones se preincubaron durante los tiempos indicados a 28°C con una agitación de 50 rpm. Finalizado este período se tomaron 2.5 ml para determinar la concentración bacteriana por plaqueo y a los 22.5 ml restantes se les agregaron 15 plántulas de alfalfa de 5 días y la mezcla se incubó a 28°C y 50 rpm durante 1 hora. La adsorción de los rizobios a las raíces se expresa como adhesividad (Capítulo 2, sección 2.6.1.). Las barras verticales indican intervalos de 95% de confianza.

relacionados con las exoestructuras descritas para *R. meliloti* (Mutaftschiev *et al*, 1982), que se desarrollan en cultivos en medio líquido como los aquí utilizados y que resultan ser sustancialmente eliminadas o afectadas por centrifugación de las bacterias (J. Vasse, comunicación personal).

A diferencia del efecto de estímulo de la adhesividad rizobiana por preincubación de 1 hora en medio de Fahraeus que se observó para 1 ó 6 horas de incubación final con las plantas, los efectos de tratamiento mecánico no se observaron cuando las incubaciones finales con las plantas fueron prolongadas. Esto podría indicar que durante ese período prolongado en presencia de las plantas, los rizobios se recuperan o sufren otros cambios que compensan o enmascaran el efecto de los pretratamientos. Esta es una de las razones por las cuales para estudiar en los experimentos los efectos de las preincubaciones de los rizobios sobre su adhesividad a raíces, se utilizaron incubaciones finales con las plantas de 1 hora.

4.2. - PRETRATAMIENTO DE LAS RAICES.

Ensayos realizados por A. Lagares (Tesis Doctoral, 1989, Figura 3.2., p.86) sobre pretratamientos de las raíces de alfalfa en medio mineral indicaron que la adhesividad de los rizobios disminuye gradualmente cuando las raíces se pretratan con medio mineral hasta 4 horas. Más aún, cuando el medio utilizado para el pretratamiento de las raíces se descartó, y se reemplazó por medio fresco durante el período de incubación con los rizobios, la adhesividad de estos últimos disminuyó drásticamente (su valor cayó a la mitad si las raíces se "lavaban" durante tres horas).

Estos resultados ponen de manifiesto el requerimiento de sustancias exudadas por las raíces hacia el medio, para el proceso de adsorción de los rizobios a la superficie radicular.

Los resultados de las secciones precedentes indican que el hipotético proceso de acondicionamiento de uno o ambos simbioses durante el período inicial de latencia de la adsorción de los rizobios a las raíces, no se debería meramente a una adaptación de los simbioses por separado al medio mineral. Este acondicionamiento probablemente requiera de la presencia

simultánea de ambos simbioses, interactuando en un proceso cuyo lento desarrollo se reflejaría en ese período de latencia.

La sugerencia de la importancia de los exudados radiculares en el proceso de adsorción, planteó el interrogante sobre la participación de los mismos en el hipotético acondicionamiento de los simbioses. Los estudios llevados a cabo para responder a esta pregunta se describen en el capítulo siguiente.

CAPITULO 5
PREINCUBACION DE *Rhizobium meliloti* CON
EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA: EFECTOS
SOBRE LA INTERACCION DE LOS RIZOBIOS CON
LAS RAICES.

5.1. - ESTUDIO DEL EFECTO DE PREINCUBACION DE *R. meliloti* CON EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA SOBRE LA POSTERIOR ADSORCION DE LOS RIZOBIOS A LAS RAICES.

El exudado radicular puede favorecer el proceso de adsorción de los rizobios a la superficie radicular en al menos dos formas no excluyentes:

a.- A través de su contenido de quimioattractantes para los rizobios, tanto específicos (Caetano-Anollés *et al*, 1988a) como no específicos (Gaworzewska y Carlile, 1982; Burg *et al*, 1981), que dirigirían la acumulación quimiotáctica de los rizobios hacia determinadas zonas del rizoplano (Gulash *et al*, 1984); esto a su vez facilitaría la rápida adsorción de los rizobios a la superficie radicular, promoviendo una temprana infección y nodulación de la raíz (Caetano-Anollés *et al*, 1988). Esta estimulación quimiotáctica de la adsorción sería totalmente dependiente de la generación *in situ* de gradientes de quimioattractantes en forma radial desde las raíces, y no permite predecir ningún efecto de los exudados actuando sobre los rizobios aislados en ausencia de las raíces.

b.- Por algún tipo de interacción no direccional con los rizobios, independiente de la existencia de gradientes, que conduzca a los mismos a desarrollar en forma más activa o eficiente los subsiguientes pasos hacia la adsorción superficial.

En el presente trabajo de tesis se ha trabajado casi exclusivamente con el segundo tipo de fenómeno: los rizobios se pusieron en contacto con el exudado radicular en mezclas de reacción homogéneas libres de gradientes, y cualquier cambio en la capacidad de adsorción de los rizobios por la interacción con el exudado radicular, fue posteriormente puesta en evidencia en una corta incubación final de los rizobios así preincubados, con raíces agregadas al medio.

En la práctica, se estudiaron los efectos de preincubación de *R. meliloti* L5-30 en bajas concentraciones (10^3 - 10^4 bacterias por ml) con exudado radicular de alfalfa durante 3 horas, previas a la incubación final con las raíces durante 1 hora y la medición de la correspondiente adsorción rizobiana.

Con este procedimiento se intentó crear un período de interacción de los rizobios con el exudado radicular provisto en forma exógena, que fuera comparable al período de latencia observado en el curso temporal de la adsorción (Figura 1.A), mientras que se buscó minimizar los efectos del exudado endógeno que sería luego generado por las raíces durante el posterior período de incubación final de 1 hora.

Para estudiar un hipotético efecto del exudado radicular sobre los rizobios previo al contacto de éstos con las raíces, se utilizó como primer control el comportamiento de rizobios preincubados en medio mineral donde el exudado radicular exógeno fue agregado al medio de incubación de las plantas con los rizobios pretratados. De este modo se satisfizo dos condiciones: a) que los rizobios experimentales y control hubiesen estado igualmente sometidos a los efectos de preincubación en el medio mineral de Fahraeus (véase la sección 4.1. anterior y la Figura 2) tanto en el control, como en el exudado (obtenido en ese medio); y b) la composición del medio durante el período de contacto de los rizobios y las raíces fue similar (medio mineral, exudado radicular exógeno, rizobios y plantas). Por lo tanto la diferencia de resultados era así puramente atribuible a la acción del exudado durante la preincubación. También se realizó un segundo control, con rizobios preincubados en medio mineral donde no hubo ningún agregado de exudado radicular exógeno al medio. Con este segundo control se intentaba estudiar si el agregado del exudado exógeno al medio de incubación final de los rizobios con las plantas producía algún efecto sobre la adsorción rizobiana a las raíces.

En estos ensayos preliminares se utilizaron preparaciones de exudados radiculares crudos. Se tomó como fuente de exudado radicular la solución resultante de crecer en hidroponia (medio de Fahraeus) las raíces, sin procesamiento alguno (ver capítulo 2, sección 2.4.).

La preincubación de *R. meliloti* L5-30 con estos exudados radiculares crudos produjo un aumento significativo de su capacidad de adsorción, respecto de rizobios preincubados con el medio mineral (tanto sin como con complementación de exudado en la incubación final) (Figura 4). Sin embargo, esa mera suplementación del exudado radicular exógeno crudo al medio de incubación final produjo un efecto inhibitorio sobre la adhesividad de los rizobios que se observaba al omitir totalmente la adición de exudado.

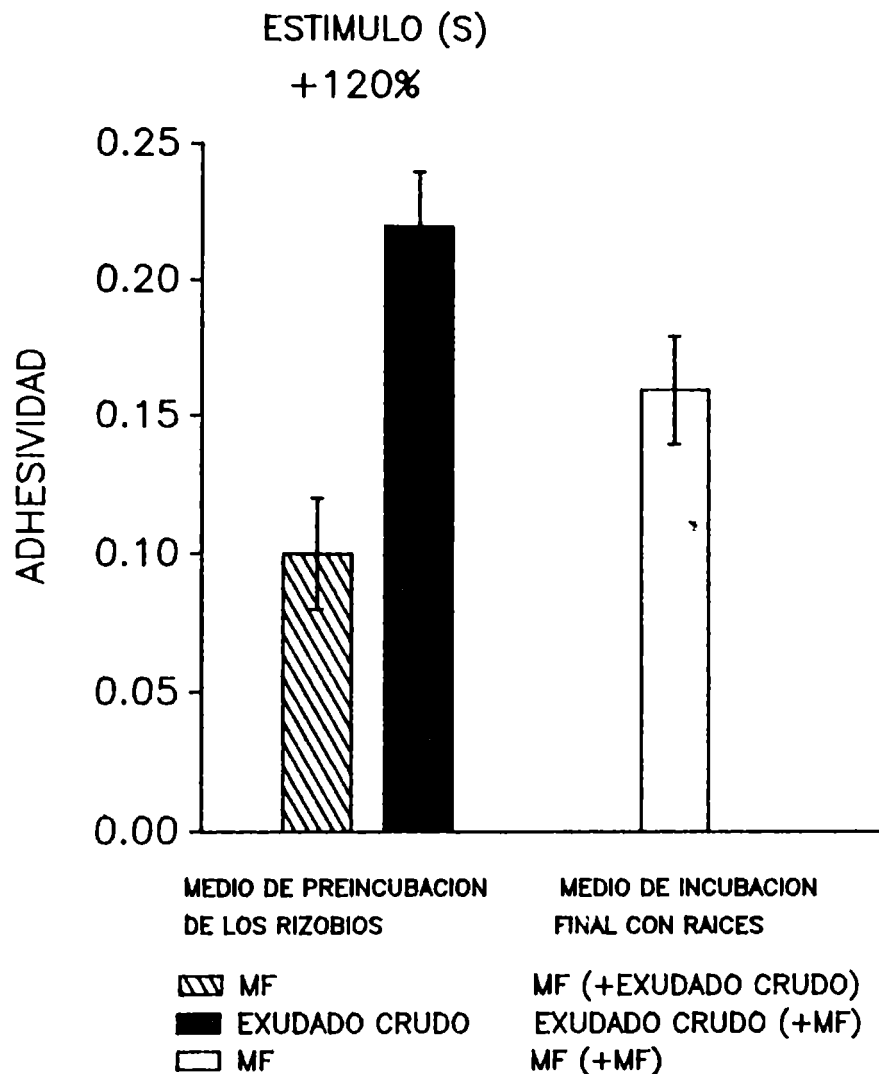


FIGURA 4: Preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular crudo de alfalfa: Efectos sobre su posterior adsorción a las raíces.

Un cultivo de L5-30 en medio YEM en fase exponencial tardía (2×10^8 bacterias/ml), se diluyó hasta aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml con medio de Fahraeus (MF) o con exudado radicular crudo de alfalfa según se indica en la primera columna, y se preincubaron durante tres horas (baño rotatorio, 50 rpm, 28°C). Cada mezcla de preincubación se diluyó con un volumen igual de las soluciones indicadas entre paréntesis en la segunda columna, se tomó una muestra para determinación de la concentración bacteriana por plaqueo, y a los 22.5 ml del inóculo resultante se le agregaron inmediatamente 15 plántulas de alfalfa de 5 días para incubarlos finalmente durante 1 hora (baño rotatorio, 50 rpm, 28°C). Finalizado este período se separaron las plántulas y se procesaron para la cuantificación de la adhesión (véase Capítulo 2, sección 2.6.1.). El exudado crudo se obtuvo según se describe en el Capítulo 2, sección 2.4. Las barras verticales indican un intervalo de confianza del 95%. El valor de estimulación corresponde al aumento porcentual del valor de la adhesividad, comparado con el control respectivo.

Al menos en parte, esta inhibición podría atribuirse a la presencia, en esas preparaciones de exudado radicular crudo, de concentraciones significativas de bacterias (aproximadamente 10^6 bacterias por ml) contaminantes endógenos de las semillas de alfalfa identificado como *Erwinia herbicola*, como ya había ocurrido cuando se ensayó la competición de la adsorción por bacterias heterólogas para poner en evidencia el modo de adsorción específica de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa (Caetano Anollés y Favelukes, 1986b). Este contaminante no podía ser eliminado totalmente por esterilización superficial de las semillas (Caetano-Anollés, 1985).

Considero importante esta observación inicial donde la preincubación de los rizobios con el exudado radicular de alfalfa produjo un estímulo de la adhesividad de *R. meliloti* aún en presencia de elevadas concentraciones de una bacteria heteróloga normalmente presente en el ecosistema de la rizosfera de alfalfa. Esta bacteria heteróloga *Erwinia herbicola* es capaz de interferir en la competitividad de *R. meliloti* para la nodulación de alfalfa (Handelsman y Brill, 1985), y posee una similitud funcional con los rizobios que se revela también en su similar atracción hacia zonas competentes de la raíz de leguminosas (Gulash et al, 1984). De este modo la interacción encontrada entre los simbioses en un sistema de laboratorio ya adquiere la potencialidad de ser significativa en el proceso de interacción en la rizosfera.

Para evitar la presencia de estos contaminantes durante los ensayos, como primer medida se trabajó con preparaciones de exudados esterilizadas por filtración a través de membranas con poros de 0.45 o 0.20 μm . Este procedimiento presentó algunas dificultades, ya que la actividad estimuladora encontrada en el exudado radicular sólo pudo ser recuperada en el filtrado a través de membranas de policarbonato. La utilización de membranas de nitrocelulosa, esteres de celulosa o nylon condujeron a la desaparición de la actividad estimuladora en el filtrado. Esto pudo deberse a adsorción inespecífica del factor activo sobre las membranas, o a inactivación del factor por sustancias presentes en las membranas, propias del proceso de fabricación. Teniendo en cuenta este último caso, se tomó la precaución de utilizar membranas previamente lavadas, sin embargo ésto no cambió los resultados.

Considerando la posibilidad que el procedimiento de filtración agregara al medio sustancias que fuesen inhibitorias del proceso de adsorción, se realizó un ensayo de adsorción utilizando medio mineral filtrado en las incubaciones. La adhesividad de los rizobios resultó equivalente a la obtenida en medio no filtrado, descartándose dicha posibilidad.

Los ensayos anteriores dejan pues en pie la posibilidad de que la pérdida de actividad estimulante por filtrado ocurra por adsorción del factor a las varias membranas filtrantes mencionadas.

Con el objetivo de evitar el desarrollo de la contaminación endógena, durante el proceso de crecimiento de las plantas en hidroponia, y obtener exudados radiculares no influenciados por esos contaminantes, y en condiciones mejor definidas y controladas, se buscó un método que permitiera eliminar a estas bacterias de las plantas una vez germinadas. Para ello se procedió a lavarlas con medio mineral conteniendo estreptomicina (100 $\mu\text{g/ml}$) según se detalla en el capítulo 2, sección 2.4.. En la bibliografía se describe un procedimiento similar con un bactericida diferente (no antibiótico) que había sido empleado para obtener plantas de alfalfa libres de contaminantes, luego utilizadas para estudiar el efecto de dichos contaminantes en la capacidad de nodulación de *R. meliloti* (Handelsman y Brill, 1985).

Las plantas lavadas con estreptomicina desarrollaron en hidroponia en forma similar a las plántulas no lavadas, tanto en el tamaño alcanzado por las plantas al cabo de tres días, como en las estructuras radiculares (desarrollo de pelos, aspecto de su superficie). Los exudados radiculares obtenidos de estas plantas resultaron en general libres de contaminantes, y fueron activos para la estimulación de la adsorción de los rizobios a las raíces.

Para tratar de definir mejor el sistema de trabajo, los estudios siguientes sobre la actividad encontrada en el exudado radicular de alfalfa se realizaron utilizando plantas previamente lavadas con estreptomicina. Esto significó condiciones de trabajo más controladas, si bien no pueden descartarse que, desde el punto de vista de la producción de exudados por parte de la raíz, quizás estas condiciones no resultaron óptimas ya que la ausencia de microorganismos alrededor de la raíz y el crecimiento de la

misma en hidroponia resultan ser factores adversos para la exudación radicular (Hale et al, 1981, ver sección 1.8).

Como se describe y discute más adelante (ver capítulo 6, sección 6.1.1.), la actividad estimuladora presente en el exudado radicular resultó ser no dializable y los exudados radiculares dializados produjeron en general una mayor estimulación de la adhesividad de los rizobios que los exudados no dializados, por lo cual se trabajó en general con exudado dializado de aquí en más denominado ER.

Los resultados de una serie de experimentos de preincubación de *R. meliloti* L5-30 con ER de alfalfa se muestran en la Tabla 1. Esta preincubación condujo a un significativo aumento de la inmediata adsorción de los rizobios a las raíces durante 1 hora (línea 3), en comparación con los mismos rizobios preincubados en medio mineral y luego ensayados para su adsorción a las raíces con el agregado de ER (línea 2), o sin agregado alguno (línea 1).

La estimulación de la adsorción rizobiana a las raíces parece requerir de un período prolongado (representado por las tres horas utilizadas en los experimentos), ya que no se observa estimulación de la adsorción en incubaciones directa de 1 hora por el agregado de ER (Tabla 1, comparar líneas 2 vs. 1).

De este modo, sobre una serie de 26 experimentos independientes, el valor del incremento de la adhesividad para 1 hora de incubación final con las plantas (A% de los rizobios preincubados con ER menos A% del control con rizobios preincubados en medio mineral) dió un promedio de 0.34 (en unidades de A%) con un alto grado de significación (test t , $S_{n-1}=0.26$; $n=26$; $P<0.002$). Este aumento significó una estimulación de la adhesividad respecto del control, con un promedio de 94%.

De esta forma se ha podido poner de manifiesto que el exudado radicular de alfalfa influye tempranamente en el proceso de adsorción de *R. meliloti* a las raíces.

Estos resultados ponen también en evidencia que en el exudado radicular de alfalfa existe algún factor(es) capaz de interactuar con los rizobios aún en vida libre antes del contacto con las raíces, y así modificarlos para producir un aumento en su capacidad de adsorción a la superficie radicular.

TABLA 1: Preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa: Efecto sobre la posterior adsorción de los rizobios a las raíces de alfalfa.

Medio para la preincubación de los rizobios ^a	Diluyente para la incubación final con las raíces ^b	Adhesividad A ^c	Estimulación S ^d
#1 - MF	MF	0.269 ± 0.009 (13)	--
#2 - MF	ER	0.258 ± 0.007 (26)	--
#3 - ER	MF	0.470 ± 0.012 (26)	+94 ± 7%

a. Un cultivo de *R. meliloti* L5-30 en fase exponencial tardía en medio YEM, se diluyó hasta aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml con medio de Fahraeus (MF) (líneas #1 y #2) o con exudado radicular dializado de alfalfa (ER) (línea #3), y se preincubaron durante tres horas (baño rotatorio, 50 rpm, 28°C).

b. Cada mezcla de preincubación se diluyó con un volumen igual de MF o ER según se indica (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.), y el inóculo resultante de rizobios preincubados se incubó inmediatamente con 15 plántulas de alfalfa de 5 días durante 1 hora (baño rotatorio, 50 rpm, 28°C). Finalizado este período se separaron las plántulas, se lavaron y cultivaron bajo medio YEM-agarizado para desarrollar microcolonias a partir de las bacterias adsorbidas que fueron contadas con ayuda de una lupa binocular (Capítulo 2, sección 2.6.1).

c. Porcentaje de los rizobios del inóculo preincubado que permanecieron adsorbidos a las raíces y desarrollaron microcolonias luego de los procedimientos estandarizados de incubación final con las raíces y lavado (Capítulo 2, sección 2.6.1.). Los valores son promedio pesado de resultados de experimentos independientes cuyo número se indica entre paréntesis. Los resultados se dan con un intervalo de confianza del 95%.

d. Estimulación porcentual de la adhesividad por la preincubación con ER, comparada con el control respectivo de preincubación en MF, #3:A(ER) vs. #2:A(MF), ver el texto. Para los experimentos individuales se calculó $S = [A(ER) - A(MF)] \times 100 / A(MF)$. El valor que se da aquí corresponde al promedio de los resultados de 26 experimentos independientes ± ETM.

Esta estimulación causada al cabo de las tres horas de preincubación de los rizobios con ER se hace relativamente menos notoria a medida que el período de incubación final con las plantas (y la producción concomitante de exudado radicular endógeno) se extiende más allá de 1 hora, hasta que a 4 horas o más no se observan diferencias con el control (Figura 5). Este momento es coincidente con el de máxima velocidad de aumento de la adsorción en experimentos con rizobios que no fueron preincubados y donde no hubo agregado de exudado radicular en forma exógena (cf. Figura 1.A, curva I). Es probable que en dichas condiciones experimentales, la máxima capacidad de adsorción de los rizobios refleje quizás, un nivel óptimo de exudado radicular endógeno y un tiempo suficiente de interacción con los rizobios. En este sentido, es importante señalar que la actividad estimuladora de la adsorción de los rizobios pudo ser observada también en exudados radiculares obtenidos en un corto período de incubación de las plantas, de sólo tres horas (para una concentración de plantas y de rizobios igual a la utilizada en las incubaciones de los ensayos de adsorción).

El acondicionamiento que sufren los rizobios por acción de este factor activo del exudado radicular, y la necesidad de generar dicho exudado a partir de la adición de las plantas al medio de incubación a tiempo 0, podría explicar, al menos en parte, el período de latencia en el curso temporal de la adsorción rizobiana antes descrito (Figura 1.A).

En algunas ocasiones la presencia del ER limitada al período de 1 hora de incubación final con las plantas produjo una inhibición de la adsorción respecto del control sin agregado de ER; este efecto podría quizás originarse en una disminución de la intensidad de las señales quimiotácticas -debe tenerse en cuenta que la respuesta quimiotáctica de los rizobios constituye un factor determinante para una óptima adsorción a las raíces en las condiciones de ensayo aquí empleadas (Caetano-Anollés *et al*, 1988b)- como consecuencia de una disminución de la intensidad de los gradientes de sustancias exudadas por la raíz, debido a la presencia de una concentración basal de exudado radicular en el medio de incubación final de los rizobios con las plantas. Con el propósito de disminuir estos efectos se ensayó la preincubación de los rizobios con ER diluido 1:10 y 1:100 con medio de Fahraeus. Los resultados de este experimento (Tabla 2) mostraron que con la dilución del exudado no se alcanzaba el objetivo buscado, ya que la

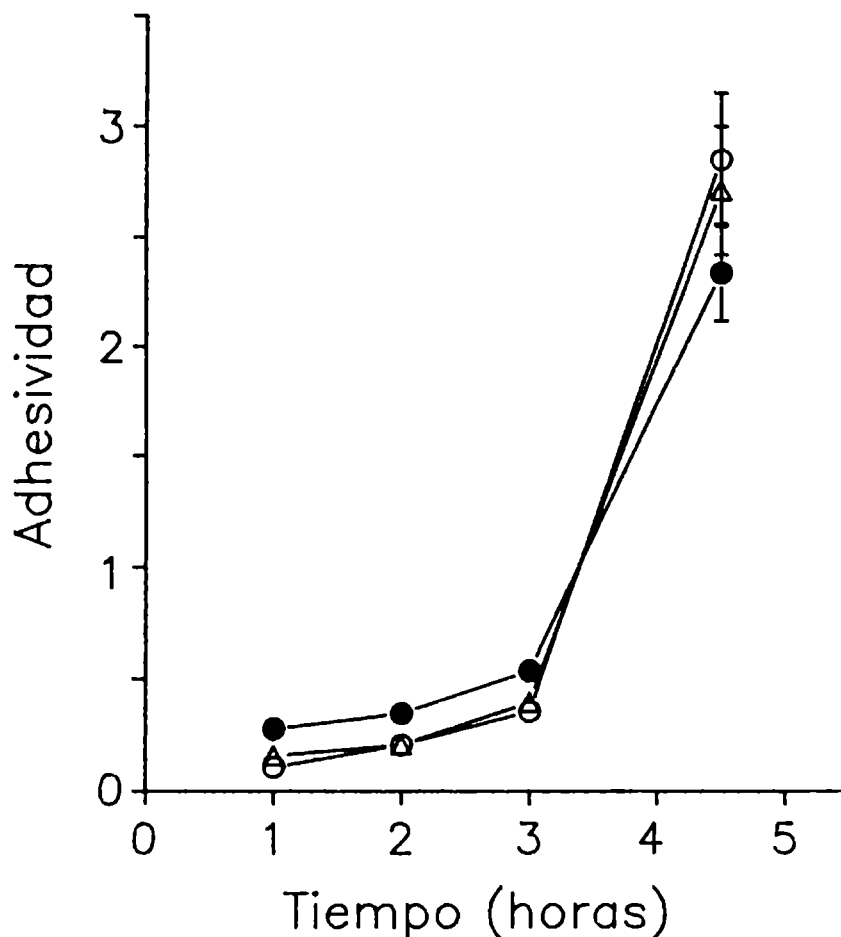


FIGURA 5: Curso temporal de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a la superficie radicular de alfalfa: efecto de la preincubación de los rizobios con exudado radicular dializado de alfalfa.

Un cultivo en fase exponencial tardía se diluyó hasta aproximadamente 10^3 - 10^4 bacterias por ml con : (O) medio de Fahraeus, (●) ER de alfalfa, (▲) ER de alfalfa previamente calentado a 100°C durante 30 minutos para su inactivación. Las diferentes suspensiones se preincubaron durante tres horas (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.). Finalizado este período se determinó la concentración bacteriana por plaqueo y a 22.5 ml de estas suspensiones se le agregaron 15 plántulas de alfalfa de 5 días para su incubación final, durante los tiempos indicados. Se determinó la adsorción rizobiana expresada como adhesividad (Capítulo 2, sección 2.6.1.). Las barras verticales indican intervalos de 95% de confianza (en algunos casos el tamaño de los símbolos es superior a las barras).

TABLA 2: Estimulación de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a raíces por preincubación de los rizobios con exudado radicular dializado de alfalfa: Concentración limitante del factor de exudado.

Dilución del Exudado radicular ^a	A(MF) ^b	A(ER) ^c	S ^d
Ninguna	0.50 ± 0.05	0.81 ± 0.07	+ 62%
1:10	0.60 ± 0.06	0.69 ± 0.06	+ 15%
1:100	0.53 ± 0.05	0.65 ± 0.06	+ 22%

Los rizobios provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía se preincubaron durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o con exudado radicular dializado de alfalfa (ER) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.).

^a. En este experimento se utilizó el ER diluído con MF según los factores de dilución que se indican en la tabla.

^b. Adhesividad de los rizobios preincubados en MF (control), para 1 hora de incubación final con las raíces.

^c. Adhesividad de los rizobios preincubados con ER, para 1 hora de incubación final con las raíces.

^d. Estimulación porcentual de la adhesividad por la preincubación con exudado radicular, $S = [A(ER) - A(MF)] \times 100 / A(MF)$.

Los medios de incubación final de los rizobios con las plantas, tanto en ^b como en ^c tuvieron la misma composición final (MF + ER + rizobios) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.).

Los valores de adhesividad se dan con un intervalo de confianza de 95% de significación.

adhesividad de los rizobios en los controles (preincubación en medio de Fahraeus) no mejoró significativamente en las mezclas de incubación final con las plantas que tenían exudado diluido respecto del exudado sin diluir; sin embargo este experimento puso de manifiesto que el (o los) componente(s) del exudado activo para la estimulación de la adsorción rizobiana, se encontraba en cantidades limitantes en la preparación de ER. Por esta razón, en todos los ensayos posteriores, el ER se utilizó sin diluir, y para centrar el estudio en los efectos del ER durante la preincubación de los rizobios en sí, se cuidó que tanto en el frasco experimental como en el control el medio de incubación final de los rizobios con las plantas tuviese los mismos componentes y la misma composición (Tabla 2, líneas 2 y 3).

Dado que la expresión de los resultados en términos de adhesividad expresan el aumento de la adsorción rizobiana en relación a la concentración de rizobios presente al momento de comenzar la incubación con las plantas (determinada por recuento en placa), el procedimiento experimental resulta ser independiente de cualquier cambio en la concentración bacteriana de la suspensión de rizobios ocurrido durante el período de preincubación con ER. Para estudiar si una diferente velocidad de duplicación durante el período de preincubación (3 horas) podía afectar o relacionarse con el comportamiento de los rizobios durante el período de incubación final con las plantas (1 hora), se midió el cambio en la concentración bacteriana ocurrido durante el período de preincubación en los diferentes medios. Los tiempos de duplicación de los rizobios calculados a partir de la concentración de los mismos en la suspensión al inicio y al final del período de preincubación resultaron diferentes según el medio utilizado. Estas diferencias se reprodujeron en una serie de experimentos independientes. Así, respecto del tiempo de duplicación en el medio de Fahraeus ($t_{1/2} = 2.4$ horas), el exudado estéril -sin dializar- permitía una mayor velocidad de duplicación bacteriana ($t_{1/2} = 2.1$ horas), mientras que en el exudado dializado los rizobios se duplicaban más lentamente ($t_{1/2} = 3.6$ horas). Teniendo en cuenta estas observaciones y los resultados de estimulación de la adsorción rizobiana obtenida tanto con exudado estéril como con exudado dializado, se puede hipotetizar que la estimulación de la adsorción de los rizobios a las raíces resultaría independiente de algún

cambio en la velocidad de duplicación de los rizobios durante el período de preincubación.

Pueden concebirse varios mecanismos por los cuales se pueda explicar el aumento de la capacidad de adsorción de los rizobios por acción del exudado radicular: a) podría aumentar la capacidad para la movilidad y quimiotaxis rizobiana hacia la raíz. Este estímulo podría actuar tanto sobre el aparato sensor y quimiotáctico hacia componentes inespecíficos como sobre la vía sensora de componentes propios de la raíz de alfalfa, o ambas (Bergman *et al*, 1988); b) podrían producirse cambios en la naturaleza y reactividad química de componentes superficiales de las bacterias, aumentando su afinidad por la superficie radicular. Estas modificaciones podrían involucrar a más de un componente del exudado, como en el caso del proceso de adsorción de *R. trifolii* a pelos radiculares de trébol donde podrían participar lectinas y glicosidasas (Dazzo *et al*, 1984). Las modificaciones superficiales podrían consistir en la simple unión del factor (o factores) activo a sitios específicos de la superficie del rizobio. También podrían existir posteriores cambios superficiales tales como ataque enzimático por el factor sobre ciertas exoestructuras del rizobio; c) el cambio de reactividad (adhesividad) del rizobio podría deberse a la expresión genética de nuevos componentes del rizobio -inducidos por el factor activo del exudado- requeridos para la unión a la superficie radicular.

De todos modos, establecida la existencia de una interacción temprana entre el exudado radicular de alfalfa y *R. meliloti*, aunque aún no se conozcan sus mecanismos, se abre el interrogante sobre si, durante la misma, se manifiesta la especificidad simbiótica. De ser así, esta interacción podría constituir un evento muy temprano de reconocimiento entre los simbioses, previo al contacto de sus superficies. Este interrogante es abordado más adelante en el capítulo 7.

5.2. - ELIMINACION DE LA ACTIVIDAD ESTIMULATORIA PRESENTE EN EL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA, POR PRETRATAMIENTO DEL MISMO CON RIZOBIOS.

Para explorar si la interacción del ER con los rizobios afecta a la subsiguiente disponibilidad del factor estimulante en la solución, se

diseñó el siguiente experimento. Una muestra de ER de alfalfa fue pretratada durante 30 minutos con 10^7 bacterias por ml de *R. meliloti* L5-30 provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía. Los rizobios se separaron luego por filtración a través de una membrana de policarbonato con poros de $0.45 \mu\text{m}$ y se ensayó la actividad estimuladora remanente en el filtrado, sobre una nueva suspensión de *R. meliloti* L5-30, en la forma usual. Mientras que la actividad estimuladora del ER control fue de $S=134\%$, la del ER pretratado con los rizobios fue $S=-12\%$.

En el presente trabajo a este efecto se lo designa como "eliminación" del factor activo del ER.

Un efecto similar fue observado en los primeros trabajos sobre sustancias inductoras de genes *nod* de *R. meliloti* presentes en exudados de semillas (Mulligan y Long, 1985).

Para avanzar en la caracterización del efecto de eliminación encontrado, se estudió la dependencia del mismo con la concentración bacteriana en la suspensión utilizada para pretratar al ER. Iguales cantidades de ER se pretrataron durante 40 minutos utilizando un amplio rango de concentraciones de *R. meliloti* L5-30 en fase de crecimiento exponencial tardía, en la forma indicada anteriormente. La actividad estimuladora remanente en cada filtrado estéril disminuyó en relación directa con la concentración de los rizobios, con un comportamiento que recuerda a una titulación estequiométrica, en el rango entre 3×10^4 y 3×10^5 rizobios por ml (Figura 6).

Resultados similares se obtuvieron cuando para el pretratamiento del ER se utilizaron bacterias previamente lavadas con medio de Fahraeus, con el objeto de eliminar sustancias solubles presentes en el medio de cultivo, hipotéticamente reactivas con ER, como por ejemplo los exopolisacáridos.

Estos resultados, aunque no dan prueba definitiva sobre el destino final del factor activo, indican que: a) la capacidad de eliminación del factor reside en los rizobios mismos; b) el proceso de "eliminación" de la actividad estimuladora del ER por los rizobios es un proceso relativamente rápido que se completa en menos de 30 minutos; c) para eliminar completamente el factor del ER en 30 minutos se requiere un número limitado de rizobios, menor que 10^6 bacterias por ml.

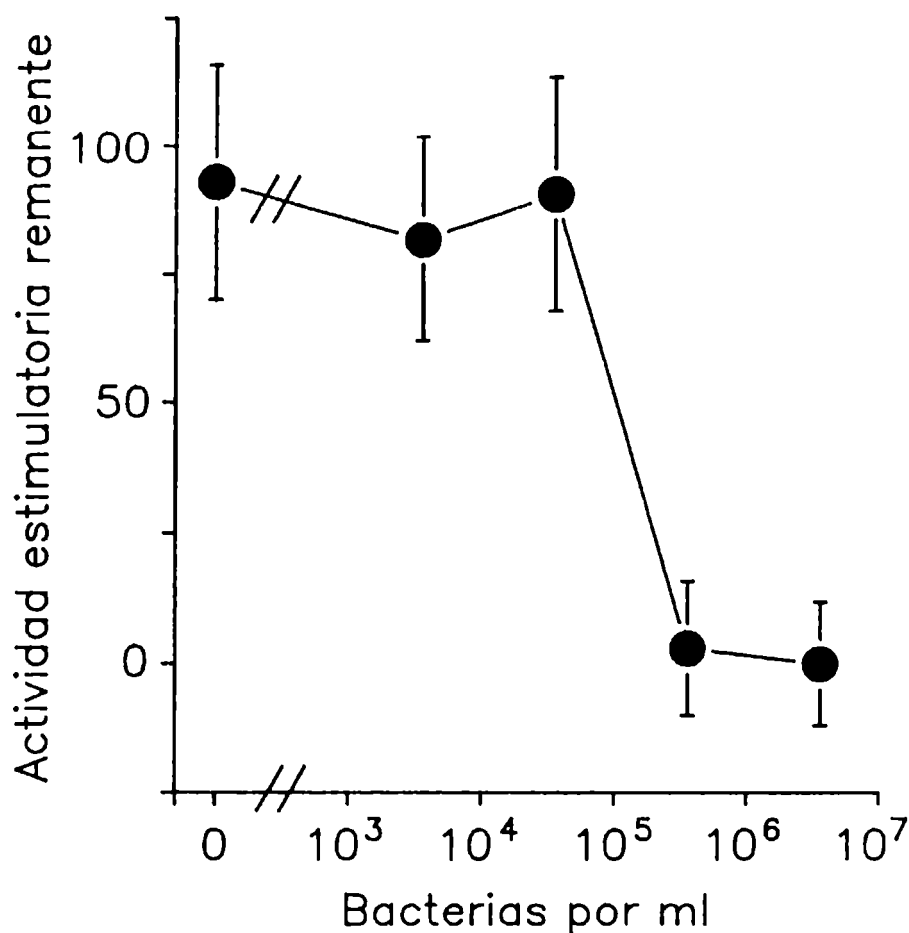


FIGURA 6: Eliminación de la actividad estimuladora presente en el exudado radicular de alfalfa por su pretratamiento con *R. meliloti*: dependencia con la concentración de los rizobios.

Un cultivo en fase exponencial tardía de *R. meliloti* L5-30 se centrifugó a 10000xg durante 15 minutos; el sedimento se resuspendió y diluyó en ER de alfalfa hasta las concentraciones indicadas. Estas suspensiones se preincubaron durante 40 minutos a 28 °C, y luego las bacterias se separaron por centrifugación a 20000xg durante 20 minutos y filtración del sobrenadante a través de membranas de policarbonato de 0.2 μm de diámetro. El filtrado estéril (exudado radicular pretratado) se utilizó para preincubar alícuotas frescas de *R. meliloti* L5-30 (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.) y determinar los efectos sobre su posterior adsorción a raíces (sección 2.6.1.) respecto de un control preincubado en medio de Fahraeus. La estimulación porcentual de la adhesividad rizobiana, así obtenida, se denominó actividad estimuladora remanente del ER (sección 2.9.). Las barras verticales indican intervalos de 95 % de confianza.

Es necesario puntualizar que no se ha realizado un estudio detallado de la cinética de la eliminación del factor activo del ER, para pretratamientos del ER con concentraciones variables de rizobios en la suspensión. Así, quizás el valor de 5×10^5 bacterias por ml necesarias para eliminar completamente la actividad estimuladora del ER en 30 minutos (titulación del factor activo), sea menor para períodos de pretratamiento del ER más prolongados.

La naturaleza del fenómeno de desaparición de la actividad estimuladora de la solución es hasta el momento desconocida y constituye un interrogante por resolver. Podría tratarse de una simple unión de la proteína a la superficie del rizobio (en cuyo caso podría ser posible recuperar el factor activo a partir de los rizobios utilizados para removerlo del exudado radicular), o tratarse de una degradación o modificación química del factor activo por acción de los rizobios (en cuyo caso el factor no se podría recuperar a partir de las bacterias utilizadas para eliminarlo del exudado).

5.3. - INFLUENCIA DEL ESTADO DE CRECIMIENTO DE LOS RIZOBIOS EN LA INTERACCION DE *R. meliloti* CON EL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA.

La estimulación de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a las raíces de alfalfa por preincubación con ER resultó fuertemente dependiente de la fase de crecimiento del cultivo rizobiano (Figura 7). La máxima respuesta se obtuvo con rizobios de fase exponencial tardía, mientras que no se observó ninguna estimulación con rizobios provenientes de un cultivo en fase estacionaria. Es importante hacer notar que la dependencia de la estimulación por ER con la fase de crecimiento de los rizobios resultó ser paralela al grado de adhesividad de los rizobios a las raíces sin preincubación alguna (Figura 7), cuya dependencia respecto del estado de crecimiento de los rizobios había sido ya observada en anteriores estudios de la adsorción de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa (Caetano Anollés, 1985).

Esta transitoriedad en la respuesta a la estimulación por ER podría explicar, al menos en parte, la dispersión de valores de estimulación obtenidos en experimentos independientes (40-200%) pese a los cuidados por

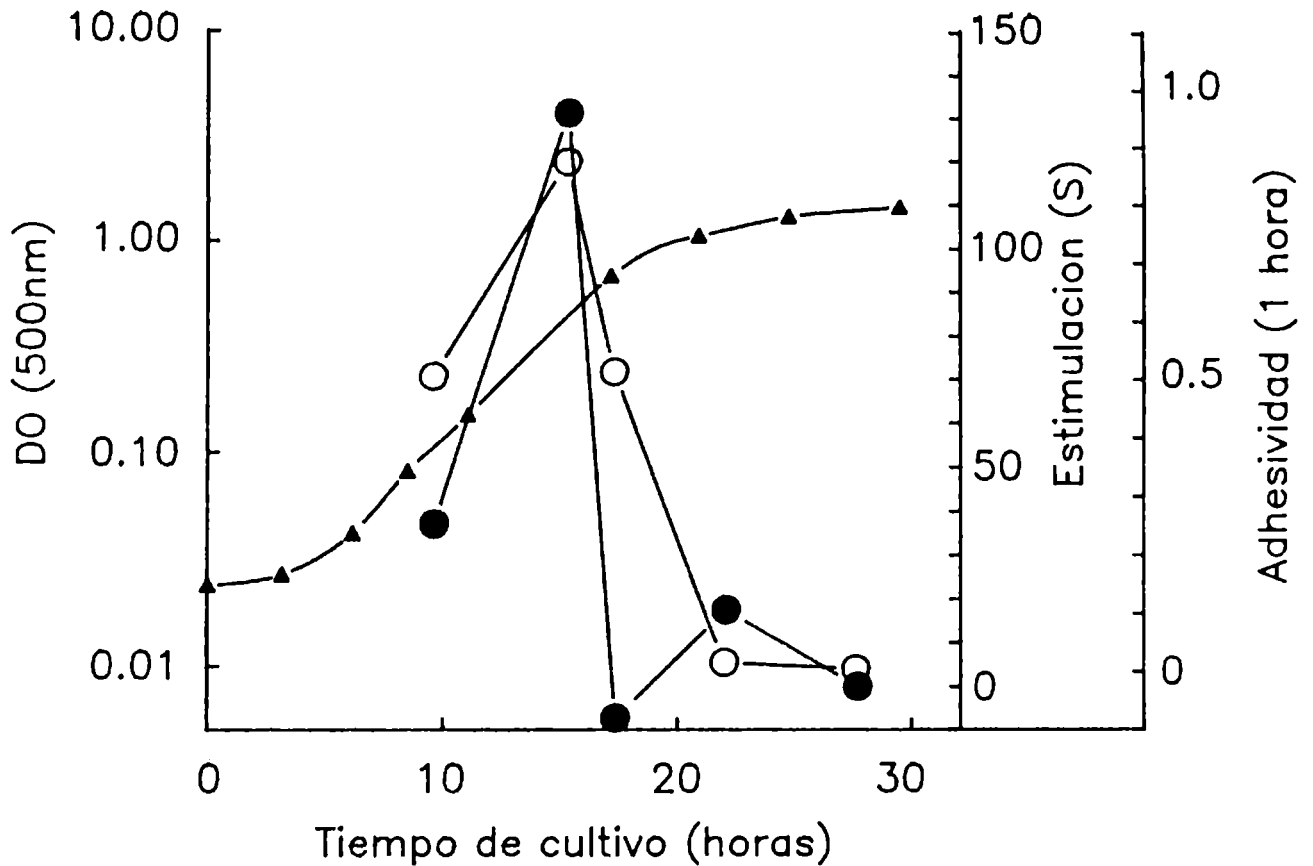


FIGURA 7: Efecto de la edad del cultivo en la estimulación de la adsorción de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa por preincubación de los rizobios con exudado radicular.

La curva de crecimiento de *R. meliloti* L5-30 en medio mínimo (Götz et al, 1980) se siguió por medida de densidad óptica (DO) a 500 nm (▲). Se tomaron muestras del cultivo a los tiempos indicados y se diluyeron apropiadamente hasta aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml que se preincubaron con exudado radicular de alfalfa, para ensayar la estimulación de la adsorción (●) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.). Las mismas muestras diluidas únicamente con medio de Fahraeus se ensayaron para la adsorción directa a las raíces (○) sin preincubación alguna (sección 2.6.1.).

estandarizar los procedimientos experimentales empleados. No se puede descartar empero que pequeñas diferencias en el estado de crecimiento de los rizobios en el momento de su cosecha podrían haber causado considerables variaciones en la respuesta al factor estimulante del ER. Se debe tener presente que durante el período de preincubación, la población bacteriana -proveniente de un cultivo en fase exponencial tardía- sufre al menos una división celular; sin embargo, como ya se ha discutido anteriormente en la sección 5.1., el cambio en la velocidad de duplicación de los rizobios durante este período no sería determinante de la respuesta de estimulación en la adsorción a las raíces.

Estos cambios en la respuesta de los rizobios al ER podría explicarse con la existencia de receptores hipotéticos para el factor, a los cuales éste se uniría para provocar los cambios de adsorción, y que fuesen transientemente expresados a una cierta edad del cultivo. Situaciones de este tipo han sido descritas, entre otras, para los receptores de lectinas en rizobios de diferentes especies (Bhuvanewari *et al*, 1977; Dazzo *et al*, 1979; van der Schaal *et al*, 1983). Una extensión de esta hipótesis es que la unión del factor de ER a los hipotéticos receptores condujese a su secuestro de la solución, dando lugar a la aparente "eliminación", que resultaría así dependiente de la fase de crecimiento del cultivo bacteriano. En particular esto predeciría que rizobios en fase de crecimiento estacionaria -incapaces de ser estimulados como lo indican los resultados de la Figura 7- deberían ser incapaces de "eliminar" el factor de ER. Para ensayar esta hipótesis se utilizó *R. meliloti* L5-30 de un cultivo en fase estacionaria con el que se pretrató ER de alfalfa y se ensayó si la actividad del mismo fue así eliminada. Contrariamente a la hipótesis planteada, estas células fueron capaces de eliminar el factor activo del ER y lo hicieron con la misma eficiencia que las células de un cultivo en fase exponencial tardía (Figura 8). Por lo tanto la capacidad de eliminar el factor activo del ER resulta ser constitutiva en *R. meliloti* L5-30, y consiguientemente, este proceso de eliminación no resulta ser la etapa limitada por el estado de crecimiento de los rizobios en el proceso de estimulación de la adsorción.

Las curvas de dosis respuesta para la eliminación de la actividad estimuladora del ER de alfalfa por números crecientes de rizobios sugieren que cada célula (independientemente de su fase de crecimiento) posee una

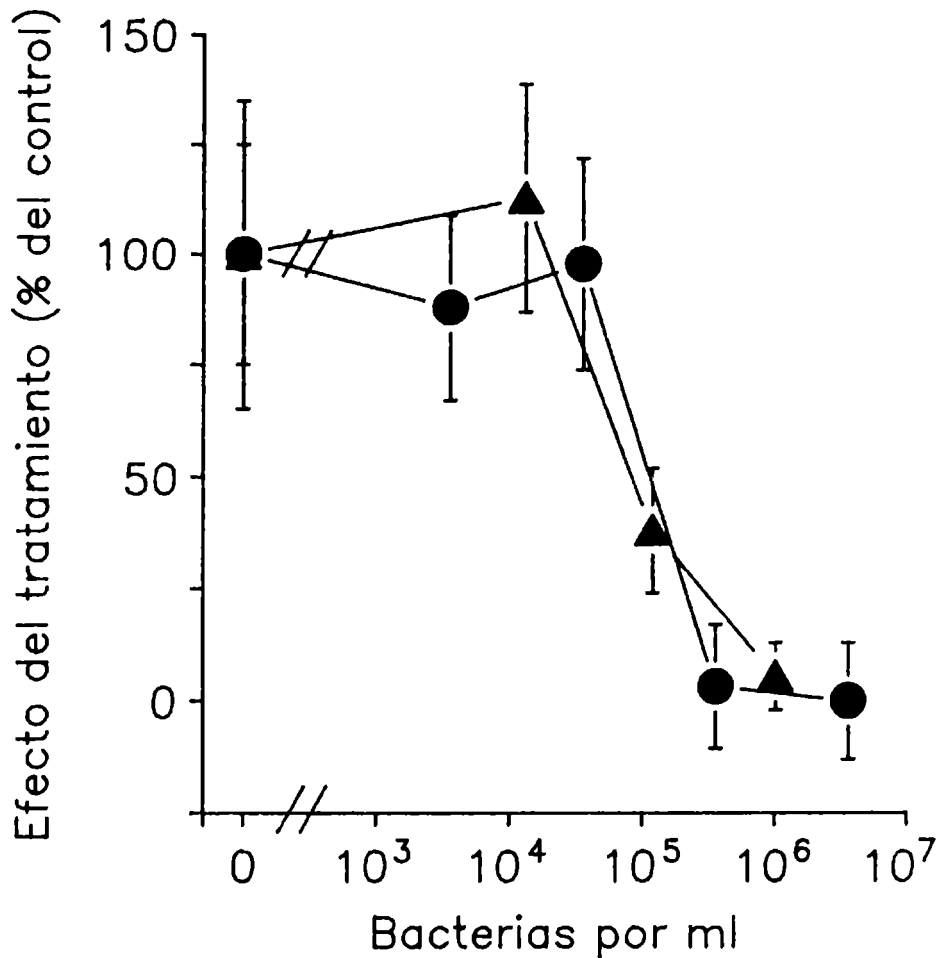


FIGURA 8: Eliminación de la actividad estimuladora presente en el exudado radicular de alfalfa por su pretratamiento con *R. meliloti*: influencia de la edad del cultivo de los rizobios.

Una preparación de ER de alfalfa se pretrató como se indica en la leyenda de la figura 7 con las concentraciones indicadas de células de *R. meliloti* L5-30, provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía (●), datos correspondientes a la figura 7) o de un cultivo en fase estacionaria (▲). Los resultados de actividad estimuladora remanente se expresaron como porcentaje del control (estimulación de la adhesividad de *R. meliloti* L5-30 obtenida con el exudado radicular pretratado en ausencia de bacterias). Las barras verticales indican intervalos de 95% de confianza.

cierta capacidad limitada de reacción con el factor (quizás debido a un número limitado de sitios receptores), caracterizada por una alta afinidad y poder discriminatorio. Por otra parte, una determinada cantidad de ER sería suficiente para reaccionar con, y estimular a un número limitado de rizobios. Dado que la capacidad de los rizobios para eliminar al factor activo del ER resultó ser constitutiva, manteniéndose en niveles similares en diferentes estados de crecimiento de los cultivos, se puede inferir que los componentes bacterianos involucrados en dicho fenómeno de eliminación, se encuentran presentes en los rizobios en proporciones constantes a lo largo de todo el ciclo de crecimiento del cultivo bacteriano.

La diferencia de comportamiento entre los rizobios en fase de crecimiento exponencial tardía y en la fase estacionaria ponen además en evidencia la existencia de al menos dos fenómenos en el proceso de interacción del rizobio con el factor activo del ER de alfalfa. Se puede aislar el fenómeno de eliminación de la actividad estimuladora, que es rápido y constitutivo, y separarlo del fenómeno de estimulación de la adsorción, más lento y dependiente de la fase de crecimiento. Más aún la realización del primero no implica necesariamente el desarrollo del segundo (volveré sobre esta idea en el capítulo 8).

5.4. - PREINCUBACION DE *R. meliloti* L5-30 CON EXUDADO RADICULAR DIALIZADO DE ALFALFA: EFECTOS SOBRE LA NODULACION TEMPRANA DE RAICES DE ALFALFA.

Como ya se ha visto, la preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa produce un aumento en la posterior adsorción de los rizobios a las raíces (ver Tabla 1). Esta estimulación no es inmediata y se observa con tres horas de preincubación.

Cuando se realiza un experimento de nodulación, los rizobios interactúan con el exudado recién a partir del momento de ser inoculados.

Si el fenómeno de interacción rizobio-ER que estimula la adsorción a raíces forma parte del camino de la asociación simbiótica hacia la nodulación, podría esperarse que la aparición de las primeras infecciones y nódulos de las raíces ocurra en forma adelantada cuando las plantas sean inoculadas con rizobios que han sufrido esa interacción por haber sido

preincubados en exudado radicular, respecto de lo que ocurriría con rizobios preincubados en solución mineral o en exudado radicular inactivo (ver más adelante métodos de inactivación por calentamiento, capítulo 6, sección 6.1.2.).

Para poder observar estos adelantos en la infección y nodulación se puede utilizar la propiedad de los fenómenos de nodulación en alfalfa y otras leguminosas, de tener lugar en una estrecha zona susceptible de la raíz situada entre el ápice radicular y los pelos recién emergentes, la cual se traslada acompañando al ápice en el crecimiento de la raíz. La posición de los nódulos (y los procesos de infección) marcan así el momento en que ocurrió la iniciación de la infección (Bhuvanewari *et al*, 1980; Bhuvanewari *et al*, 1981). Para implementar esta propiedad y hacer un datado de los eventos de infección se pueden realizar los experimentos de nodulación con plantas ubicadas sobre una hoja de papel absorbente dentro de una bolsa de polietileno, de modo que las raíces quedan dentro de la bolsa creciendo en forma recta hacia el fondo de la misma y la parte aérea de la planta queda hacia afuera. Así dispuestas las plantas, se puede marcar sobre la bolsa la posición del ápice radicular (marca RT) y la de los primeros pelos radiculares emergentes (marca ERH) inmediatamente antes del momento de la inoculación, quedando así también determinada para cada raíz una unidad de distancia que se denomina RU y que al momento de la inoculación marca el tamaño de la zona infectable de la raíz (Bhuvanewari *et al*, 1980; Bhuvanewari *et al*, 1981). De este modo se puede luego medir la posición de los nódulos que aparecen en la raíz principal respecto a la marca RT, y hacer un análisis de la distribución de los mismos resultantes en un lote de plantas inoculadas con rizobios pertenecientes a un determinado tratamiento. Como parámetros de la nodulación temprana se pueden medir: a) el promedio de la posición del primer nódulo que representaría en la raíz la posición promedio donde ocurrió el primer evento completo de infección y b) el número de nódulos arriba de RT por planta, es decir los nódulos que los rizobios inoculados formaron en la zona infectable de la raíz existente en el momento de la inoculación.

Los resultados de un experimento como el descrito se muestran en la Tabla 3. Los parámetros de crecimiento de las raíces fueron, unidad de distancia radicular RU (promedio) 3.6 mm, velocidad de crecimiento

TABLA 3: Efecto de la preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa, sobre la formación de nódulos precoces.

Medio de preincubación	Posición (mm) del primer nódulo respecto a RT \pm ETM	n ^o de nódulos arriba de la marca RT/planta \pm ETM	n ^o de nódulos por planta \pm ETM	n ^o de plantas
Medio de Fahraeus	-2.13 \pm 1.85 a	0.87 \pm 0.14 ab	2.42 \pm 0.23 a	45
Exudado Radicular	+1.70 \pm 1.03 b	1.02 \pm 0.16 b	2.41 \pm 0.22 a	49
Exudado Radicular calentado	-2.39 \pm 1.65 a	0.63 \pm 0.11 a	2.04 \pm 0.19 a	46

Un cultivo de *R. meliloti* L5-30 en fase exponencial tardía en medio YEM se diluyó hasta aproximadamente 2.5×10^5 bacterias por ml con los medios indicados y preincubadas durante tres horas (baño rotatorio, 50 rpm, 28°C). Finalizado este período se inocularon 5×10^4 rizobios preincubados por planta de alfalfa de 5 días. Las plantas se encontraban dispuestas sobre una hoja de papel absorbente dentro de una bolsa de polietileno (5 plantas por bolsa) de modo que se pudo marcar la posición del ápice radicular al momento de la inoculación (marca RT) y el comienzo de la zona de pelos emergentes (marca ERH), quedando determinada para cada raíz la unidad de distancia radicular (UR) (Bhuvaneswari y Bauer, 1980). 10 a 15 días después de la inoculación se analizó la nodulación determinando la posición de los nódulos de las raíces respecto a la marca RT. Las distancias se dan en mm. Valores positivos indican posiciones por encima de la marca RT (hacia la parte aérea de la planta). La unidad de distancia radicular promedio para la población de plantas fue de 3.6 mm. La velocidad de crecimiento (promedio) de las raíces fue de 0.5 mm por hora.

Valores con diferentes letras indican diferencias significativas: Test-t, $P < 0.05$.

(promedio) 0.5 mm/hora. Las plantas inoculadas con rizobios preincubados en solución mineral presentaron su primer nódulo en una posición promedio respecto de RT por debajo de la marca ($x_1 = -2.13$ mm), es decir en una zona de la raíz que aparece con posterioridad al momento de la inoculación de las plantas (4.3 horas después) y que recién 10 horas después alcanzó la condición de zona ERH. En cambio, la posición del primer nódulo correspondiente a las plantas inoculadas con rizobios preincubados con ER de alfalfa se encontró dentro de la zona infectable de la raíz al momento de realizada la inoculación ($x_1 = +1.70$ mm), cuya conversión a ERH había ocurrido a las 4 horas post inoculación. Este corrimiento en la posición del primer nódulo para los rizobios preincubados en el exudado radicular, no se observa si el exudado es previamente calentado a 100 °C durante 30 minutos ($x_1 = -2.39$ mm, es decir, una zona aparecida recién 4.8 horas post inoculación y que llegó a ser zona ERH a las 12 horas post inoculación): este tratamiento térmico del exudado destruye la actividad estimuladora de la adsorción de los rizobios (ver capítulo 6, sección 6.1.2.). En estas incubaciones el tiempo de generación de los rizobios ya inoculados fue de 3 horas, equivalente al tiempo para una elongación de la raíz (y traslación de sitios en la dirección apical) de 1.5 mm. Es decir que la distancia entre las posiciones promedio de los primeros nódulos para plantas inoculadas con rizobios preincubados en exudado radicular y en el exudado radicular previamente calentado, que fue de 4.09 mm, y corresponde a un intervalo de 8 horas, es decir, la preincubación con ER (durante 3 horas) confiere una ventaja de más del doble de tiempo.

El análisis de los números de nódulos que se produjeron por planta arriba de la marca RT muestra las mismas tendencias, siendo significativamente mayor (test *t*, $P < 0.05$) para las plantas inoculadas con rizobios preincubados en exudado radicular respecto de aquéllas donde se utilizó exudado previamente calentado (control).

La nodulación de las raíces es regulada por la planta con un mecanismo de retroalimentación negativa que determina que la nodulación de la raíz primaria se produzca mayoritariamente dentro de una extensión limitada de la misma (Pierce y Bauer, 1983); esto surge del estudio de la distribución de nódulos a lo largo de las raíces. Cuando se analiza la nodulación utilizando el sistema de bolsas de polietileno se puede medir la

posición de los nódulos sobre la raíz respecto de la marca RT y tomando como unidad de distancia para cada raíz la medida de la zona infectable de la misma al momento de la inoculación (RU). La distribución de las frecuencias de aparición de los nódulos a lo largo de la raíz determina un perfil de nodulación (Bhuvanewari *et al*, 1980; Bhuvanewari *et al*, 1981).

El análisis de los perfiles de nodulación para los diferentes tratamientos del experimento correspondiente a la Tabla 3, revela también un corrimiento hacia zonas superiores de la raíz del perfil de nodulación para el caso de plantas inoculadas con rizobios preincubados en exudado radicular, respecto de aquéllas donde los rizobios se preincubaron en el exudado caientado o en solución mineral (Figura 9).

Como se ha visto en la primera parte de esta tesis, se han descrito estimulaciones de los rizobios para la infección y nodulación temprana por acción de proteínas del exudado radicular en caupí (Bhagwat y Thomas, 1982, 1983), en trébol (Solheim, 1983) y en soja (Halverson y Stacey, 1984, 1985, 1986). En este último caso la proteína del exudado radicular ha podido ser reemplazada por lectina purificada de semilla, utilizada en concentraciones de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ frente a 4×10^7 bacterias ml^{-1} y la actividad estimulante de la nodulación precoz pudo ser detectada aún en proporciones tan bajas como 10 moléculas de lectina por bacteria (Halverson y Stacey, 1986a). Sin embargo en ningún caso se ha podido establecer cuál de los eventos que forman parte del proceso de infección y nodulación es el estimulado por acción del factor proteico del exudado en la preincubación de los rizobios: en caupí (Bhagwat y Thomas, 1982, 1983) y trébol (Solheim, 1983) no se investigaron, mientras que en soja (Halverson y Stacey, 1986a) no se encontraron efectos estimulatorios sobre la adsorción de los rizobios a las raíces, ni en la cantidad de enrulado de los pelos radiculares.

Considerando la conjunción de los efectos que produce la preincubación de *R. meliloti* L5-30 con ER de alfalfa sobre la adsorción de los rizobios a las raíces por una parte, y sobre la nodulación de éstas por otra, cabe la propuesta de que la interacción de *R. meliloti* con un componente del exudado radicular de alfalfa (cuya caracterización bioquímica se describe en el capítulo siguiente) -que produce un estímulo en la adsorción rizobiana a las raíces- constituiría un temprano evento en el

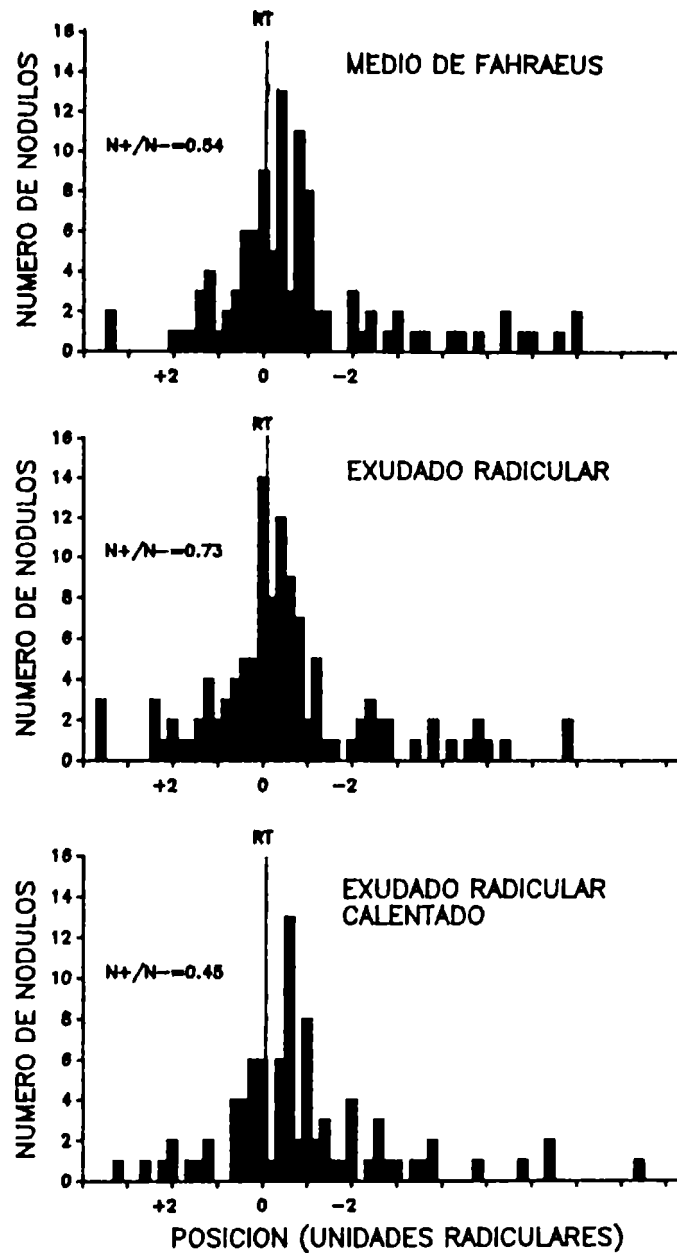


FIGURA 9: Perfiles de nodulación de raíces de alfalfa inoculadas con *R. meliloti* L5-30: efectos de la preincubación de los rizobios con exudado radicular.

Los resultados corresponden al experimento descrito en la Tabla 3, ver la nota respectiva. RT marca la posición del ápice radicular en el momento de la inoculación. Una unidad radicular se define como la distancia entre el ápice radicular y los primeros pelos radicales emergentes de cada raíz. Distancias positivas desde RT están orientadas en el sentido creciente hacia la parte aérea de la planta, e indican zonas de la raíz existentes al momento de la inoculación. Entre paréntesis se indica el valor de la relación N^0 de nódulos arriba de RT / N^0 de nódulos debajo de RT, correspondiente a cada perfil de nodulación.

camino de la asociación simbiótica hacia la nodulación (volveré sobre esta hipótesis en el capítulo 10).

CAPITULO 6

CARACTERIZACION DE LA ACTIVIDAD BIOLOGICA ENCONTRADA EN EL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA.

6.1. - CARACTERIZACION BIOQUIMICA DEL FACTOR ACTIVO.

6.1.1. - Diálisis.

Para eliminar componentes del exudado radicular de bajo tamaño molecular, el exudado radicular centrifugado y esterilizado por filtración (ver capítulo 2, sección 2.4.) se dializó contra medio mineral de Fahraeus durante 18 horas con tres cambios de las aguas de diálisis (25 volúmenes por volumen inicial de exudado) a intervalos regulares. La actividad estimuladora fue retenida dentro de la bolsa de diálisis, tanto utilizando membranas con límite de retención de 3.5, como de 12 kDa. Este resultado indica que el componente activo sería macromolécula. En general el exudado radicular dializado produjo estimulaciones mayores que el no dializado (con el mismo tiempo de conservación a 5°C), como se muestra en la Figura 10. Por esta razón se trabajó rutinariamente con exudado radicular dializado (ER).

Esta mayor actividad del exudado dializado sugiere la presencia en el exudado radicular sin dializar de sustancias de bajo peso molecular inhibitoras de la adsorción rizobiana a las raíces (o de su estimulación), cuya concentración en la preparación de exudado radicular sería significativamente disminuída por el proceso de diálisis. En relación a la posible existencia de sustancias inhibitoras de la adsorción rizobiana, o con efectos contrapuestos a la estimulación de la misma, más adelante se presentan otras evidencias independientes a las aquí discutidas (ver sección 6.1.4.).

6.1.2. - Tratamientos térmicos.

Ante la naturaleza macromolecular del componente activo del ER de alfalfa, se estudió su estabilidad frente a tratamientos térmicos. El calentamiento del ER de alfalfa a 100 °C durante 30 minutos, eliminó completamente del mismo la actividad estimuladora para la adsorción (Figura 11). Idénticos resultados se obtuvieron con exudado radicular no dializado (resultados no mostrados).

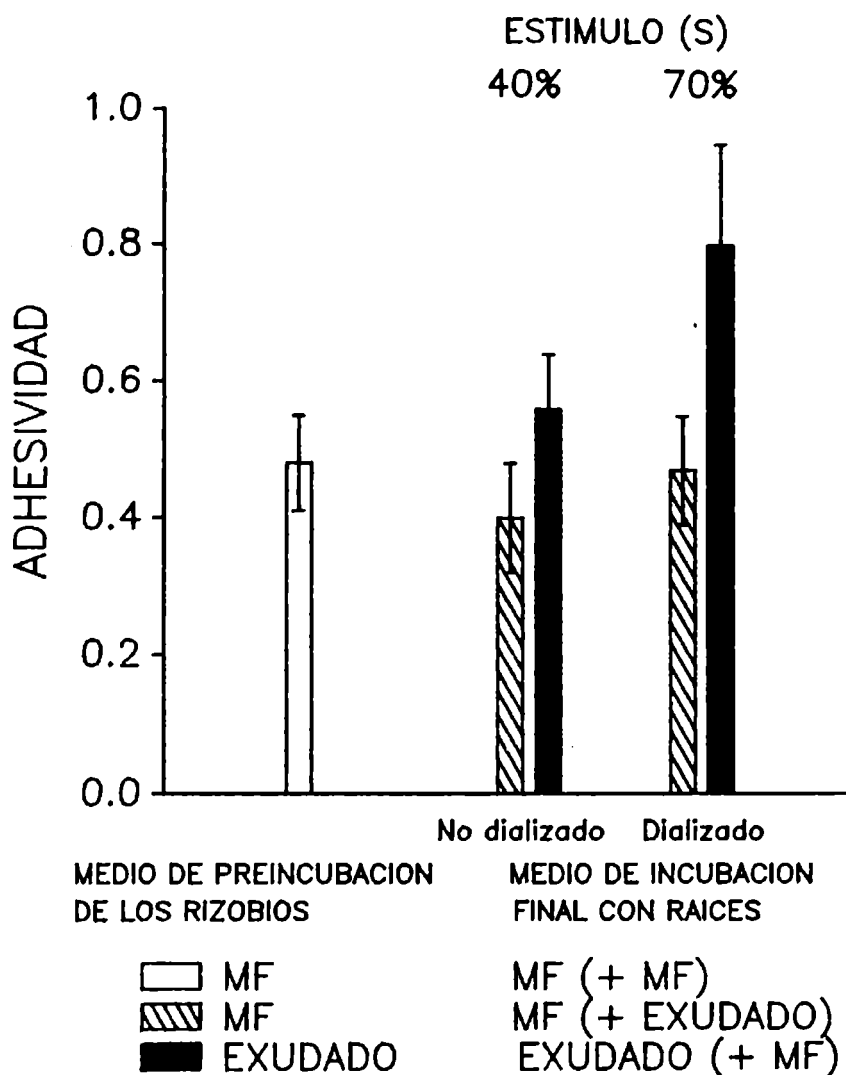


FIGURA 10: Efecto de la diálisis del exudado radicular de alfalfa sobre su actividad estimuladora de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a las raíces.

Una preparación de exudado radicular de alfalfa (Capítulo 2, sección 2.4.) se dializó contra medio de Fahraeus a 4°C utilizando una membrana que retuviese sustancias de peso molecular superior a 12 kDa (resultados similares se obtuvieron con membranas para 3.5 kDa). El líquido retenido dentro de la bolsa de diálisis se llamó exudado radicular dializado (no se observaron cambios de volumen). El control sin dializar se mantuvo a 4°C todo el tiempo que duró la diálisis. Estas preparaciones de exudado radicular de alfalfa se utilizaron, como se indica en la primer columna, para preincubar los rizobios provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía; como control se preincubaron los mismos rizobios en medio de Fahraeus (MF). Entre paréntesis se indica, en la segunda columna, el medio agregado durante la incubación final con las plantas. La adsorción de los rizobios se cuantificó como adhesividad (sección 2.6.1.) y la estimulación porcentual de la misma (S) por la preincubación con el exudado radicular se calculó respecto del control correspondiente (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.). Las barras verticales indican un intervalo de confianza del 95%.

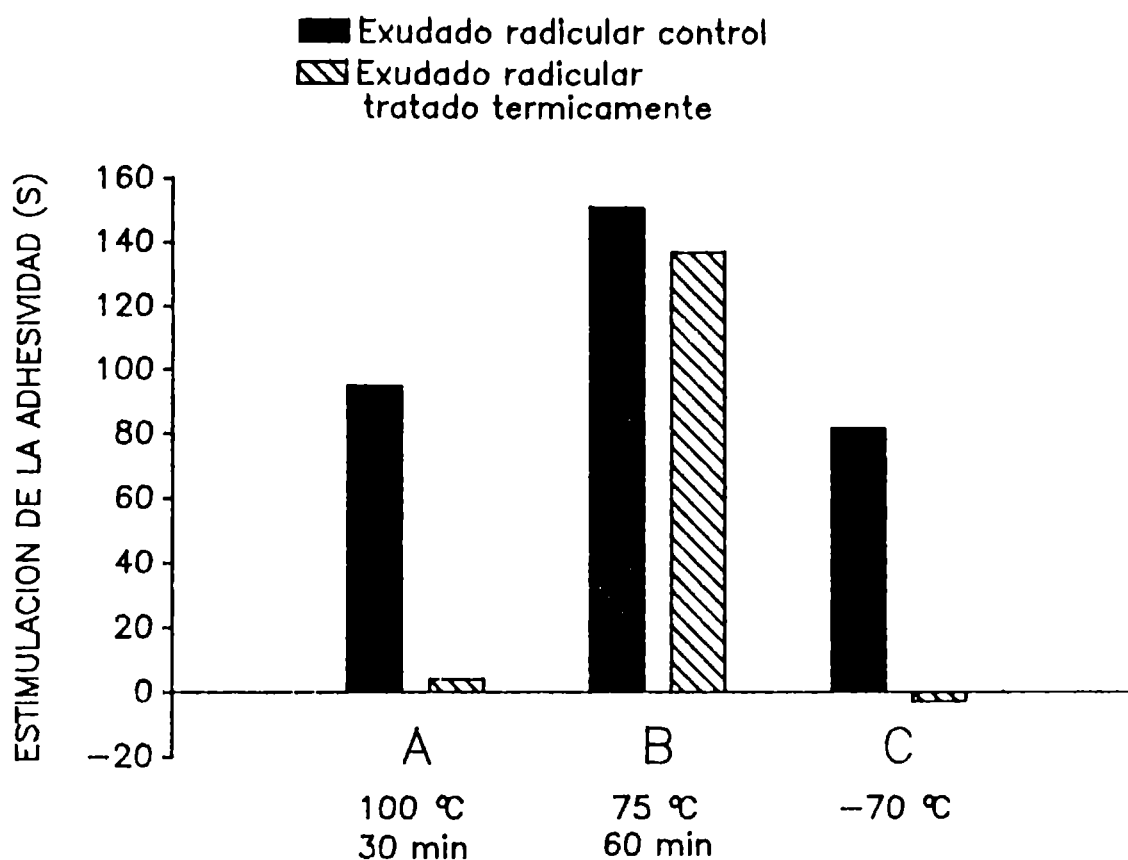


FIGURA 11: Diferentes tratamientos térmicos del exudado radicular dializado de alfalfa: efectos sobre su actividad estimuladora de la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a las raíces.

A, B y C indican tres experimentos independientes. En ellos la respectiva preparación de ER de alfalfa se sometió al tratamiento térmico indicado, inmediatamente antes de utilizarlo para preincubar una suspensión de *R. meliloti* L5-30 (Capítulo 2, sección 2.10.1 y 2.8.2.1.). La estimulación (S) de la adsorción de los rizobios corresponde al aumento respecto de un control donde los rizobios se preincubaron en medio mineral de Fahraeus y el exudado radicular tratado estuvo presente únicamente durante el período de incubación final con las plantas. La adsorción se cuantificó como adhesividad (sección 2.6.1.). Adesividad del control: 0.50 (A); 0.41 (B); 0.30 (C).

Resulta interesante sin embargo que después de un calentamiento del ER menos drástico, de 75 °C durante 60 minutos, la actividad estimuladora resultante no disminuyó respecto del control no calentado.

La actividad estimuladora se perdió por congelamiento del ER a -70 °C y descongelamiento una semana después; ésto obligó a descartar la conservación del ER por congelamiento, y a trabajar siempre con preparaciones frescas de ER. La causa de esta pérdida de actividad puede ser una inestabilidad conformacional de la proteína a bajas temperaturas, o simplemente podría deberse a la muy baja concentración de proteínas en el exudado (por debajo del límite de sensibilidad de los métodos corrientes de medida de proteínas, véase más abajo, sección 6.1.3.), resultando desnaturalizada en el proceso de congelación.

La actividad estimuladora no pudo ser conservada tampoco en el ER mantenido a 5°C durante una semana. En este caso no puede descartarse la degradación por acción de proteasas presentes en el exudado.

6.1.3 - Determinación de la naturaleza proteica del factor activo:

Tratamiento con tripsina.

La concentración de proteínas del ER de alfalfa resultó ser inferior a los límites de detección de los siguientes métodos de determinación de proteínas (Darbre, 1987): 1) absorción en el ultravioleta A_{280}/A_{260} (0.1 mg/ml), 2) A_{215}/A_{225} (1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y 3) método de Lowry *et al* (1957) (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (ver capítulo 2, sección 2.10.4.).

Para dilucidar si el factor activo del ER es de naturaleza proteica, se estudió la sensibilidad de la actividad estimuladora a tratamientos previos con tripsina. luego del tratamiento del ER, la actividad proteolítica de la tripsina fue inhibida totalmente por el agregado de un inhibidor específico de tripsina (ver capítulo 2, sección 2.10.2.). La eliminación de toda actividad proteolítica se consideró necesaria para poder llevar a cabo luego los ensayos de preincubación de los rizobios con el exudado tripsinado y la subsiguiente medida de la adsorción a raíces de los rizobios preincubados, preservando eventuales proteínas de la superficies bacteriana y de la planta que pudiesen estar involucrados en el proceso de adsorción.

El tratamiento con tripsina eliminó completamente la actividad estimuladora del ER en dos experimentos independientes (Figura 12).

→ Estos resultados (secciones 6.1.1., 6.1.2. y 6.1.3.) indican que el factor -o los factores- del ER de alfalfa responsable de la actividad estimuladora de la adsorción de los rizobios a las raíces de alfalfa, es macromolecular e involucra al menos una proteína con considerable estabilidad térmica. Además, estos resultados muestran que la actividad estimuladora no requiere de sustancias de bajo peso molecular presentes en el exudado radicular original y eliminadas por diálisis. La destrucción de la actividad por calentamiento o ataque triptico señala que la actividad estimuladora no reside en moléculas termoestables y no proteicas, tanto presentes en el exudado radicular original como en el ER luego de la diálisis.

Las características de este factor son por lo tanto muy diferentes a las de los compuestos flavonoides presentes en el exudado radicular de alfalfa, como la luteolina (Peters *et al*, 1985) o la metoxichalcona (Maxwell *et al*, 1989), involucrados en ciertos eventos de reconocimiento temprano entre los simbioses como la inducción de la expresión de los genes *nod*, y la quimiotaxis hacia las raíces (ver capítulo 1, sección 1.11.). Estos componentes son sustancias de bajo peso molecular, dializables y termoestables (Mulligan y Long, 1985; Peters *et al*, 1986). A pesar de tener características tan diferentes del factor estimulador de la adsorción, a modo de contraprueba se ensayó si estas sustancias inductoras de los genes *nod* podían actuar reemplazando al factor presente en el ER. Para ello se realizaron experimentos de preincubación de *R. meliloti* L5-30 donde el ER de alfalfa fue reemplazado por preparaciones de exudado de semilla (fuente de sustancias inductoras de los genes *nod*, preparado y utilizado en la concentración indicada por Mulligan y Long, 1985) o por luteolina pura (en concentración saturante para la inducción de los genes, 10^{-6} M) (Peters *et al*, 1986). Ninguno de los tratamientos produjo estimulación de la adsorción (Tabla 4). Por el contrario se observó una inhibición, probablemente debida a una disminución de los gradientes de luteolina que, como ya se mencionó, es un atrayente responsable de una fuerte respuesta quimiotáctica en *R. meliloti* (Caetano-Anolles *et al*, 1988a), la que contribuye a determinar una

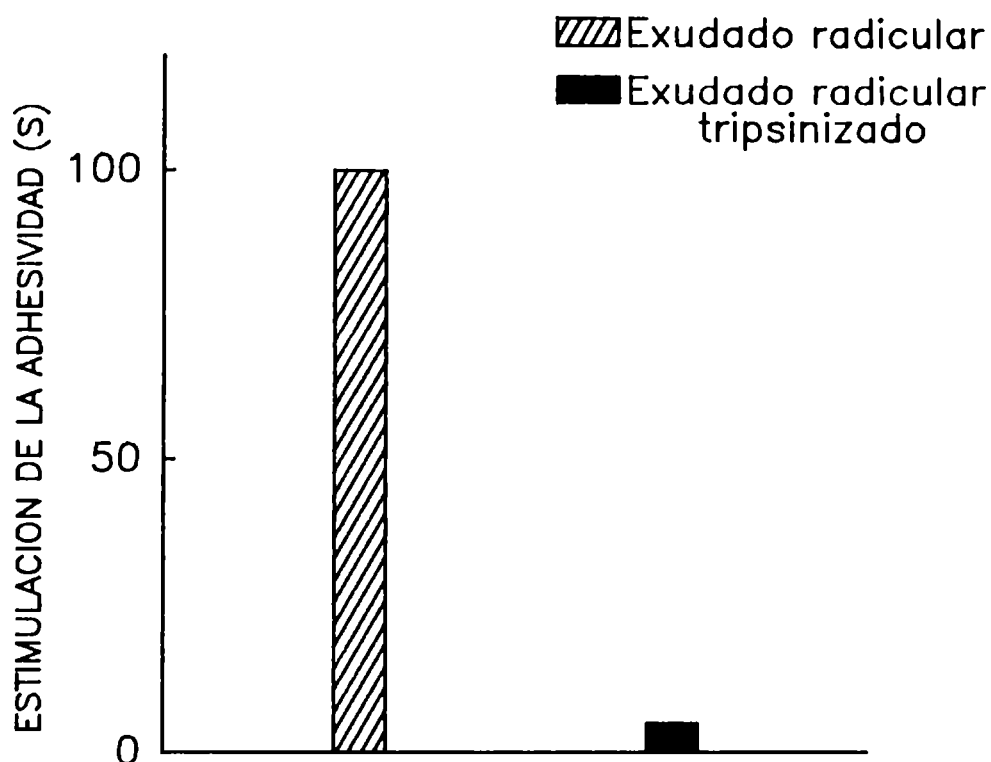


FIGURA 12: Eliminación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa por su pretratamiento con tripsina.

Una preparación de exudado radicular dializado de alfalfa y el medio mineral de Fahraeus utilizado como control, se trataron con tripsina soluble (Sigma) ($50 \mu\text{g/ml}$) a 28°C durante 60 minutos y a continuación se agregó inhibidor de tripsina tipo-I (Sigma) ($20 \mu\text{g/ml}$) (Capítulo 2, sección 2.10.2.). Estas soluciones así tratadas se utilizaron para preincubar *R. meliloti* L5-30 (sección 2.8.2.1.). La estimulación (S) de la adsorción de los rizobios corresponde al aumento porcentual de la misma respecto de un control donde los rizobios se preincubaron en medio mineral de Fahraeus y el exudado radicular tratado estuvo presente únicamente durante el período de incubación final con las plantas; los valores corresponden al promedio de los resultados de dos experimentos independientes. La adsorción se cuantificó como adhesividad (sección 2.6.1.).

TABLA 4: Preincubación de *R. meliloti* L5-30 con exudado de semillas de alfalfa o con luteolina: Efectos sobre su posterior adsorción a las raíces.

Medio para la preincubación de los rizobios ^a	Diluyente para la incubación final con las raíces ^b	Adhesividad A ^c
MF	MF	0.05 ± 0.05
MF	ES	0.26 ± 0.03
ES	MF	0.22 ± 0.06
MF	MF	0.44 ± 0.06
Luteolina	MF	0.15 ± 0.02

a., b. y c. Ver notas al pie correspondientes a la Tabla 1, para los medios indicados en esta tabla. MF: Medio de Fahraeus, ES: Exudado de semillas de alfalfa obtenido de acuerdo a Mulligan y Long (1985), luteolina 10^{-6} M, disuelta en MF.

óptima adsorción de los rizobios en las condiciones del ensayo de adsorción utilizado (Caetano Anollés *et al*, 1988b).

6.1.4 - Concentración y purificación del factor activo.

Dada las dificultades para la detección del componente proteico activo del ER de alfalfa, atribuidas a su baja concentración, se intentaron diferentes procedimientos de concentración del ER con recuperación de la actividad biológica y análisis electroforético de las fracciones obtenidas.

Procedimientos de ultrafiltración del ER utilizando membranas Amicon que retienen sustancias de peso molecular superior a 2 ó 10 kDa, en los que la solución retenida había sido concentrada 50-100 veces, no permitieron recuperar actividad estimuladora en la misma. Este resultado podría haberse debido a pérdidas del factor por fenómenos de adsorción inespecífica de proteínas al material de las membranas, más aún por tratarse de soluciones extremadamente diluídas. En un intento por superar este problema se utilizaron membranas previamente saturadas en sus capacidades de adsorción de proteínas, mediante el tratamiento con solución 3% de seroalbumina bovina. Sin embargo estos procedimientos no cambiaron los resultados negativos de la ultrafiltración.

Otro método de concentración empleado fue la liofilización de 200 ml de una muestra activa de exudado radicular estéril (sin dializar) y posterior redisolución del residuo sólido en 2 ml. Estos 2 ml conteniendo el material liofilizado se cromatografiaron por una columna de desalado de Sephadex G25 (columna PD10 de Pharmacia) y en el volumen muerto de la misma eluyó un material con señal de absorción de luz a 280 nm ($DO=0.16$). El análisis de esta fracción por electroforesis en geles delgados de poliacrilamida con SDS y tinción con plata (Phastsystem) presentó una banda con un peso molecular correspondiente de 15400 daltons (Figura 13). Sin embargo, este procesamiento del exudado radicular condujo a una pérdida total de su actividad, quizás debida al solo hecho de la congelación de la muestra (ver sección 4.1.2).

Es de esperar que las proteínas presenten propiedades anfotéricas (Lehninger, 1977). Por lo tanto, una vez establecida la naturaleza proteica del factor activo, se ensayaron materiales de intercambio iónico, para

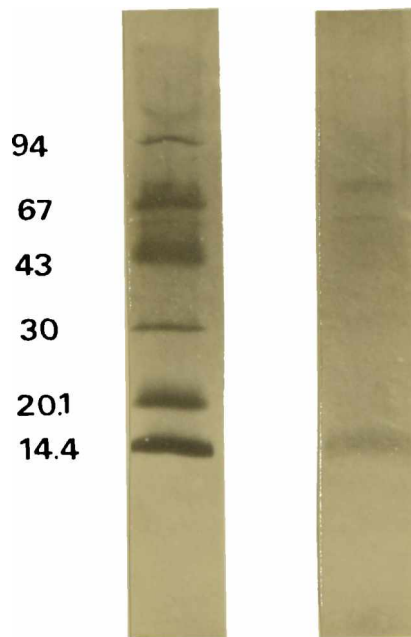


FIGURA 13: Análisis de una muestra concentrada de exudado radicular de alfalfa por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

200 ml de una preparación de exudado radicular de alfalfa, activa para la estimulación de la adsorción de los rizobios (corresponde a la preparación utilizada en el experimento de la Figura 14), se concentró por liofilización. El liofilizado se resuspendió en un volumen de 2.5 ml que se desaló en una columna PD-10 (Pharmacia), recuperando en el volumen muerto (3.5 ml) un material que presentó absorción a 280 nm ($DO=0.16$). 1-2 μ l de esta fracción se sembraron (calle de la derecha en un gel ultradelgado de poliacrilamida (gradiente 8-15%) y se corrió con un equipo Phastsystem. La tinción se realizó combinando los métodos de Coomassie blue y Plata (Phastsystem). En la calle de la izquierda se indican los tamaños moleculares correspondientes a sustancias patrones (kDa).

retener la actividad estimuladora del ER de alfalfa. Se utilizaron los siguientes: Q-Sepharosa (Pharmacia), intercambiador fuerte de aniones a pH 8.00, y S-Sepharosa (Pharmacia), intercambiador fuerte de cationes a pH 6.20. Ambos materiales fueron previamente equilibrados con medio mineral de Fahraeus ajustado al respectivo pH de trabajo.

En un primer experimento realizado en batch, ambas intercambiadores de iones retuvieron la actividad estimuladora que luego fue cualitativamente recuperada de cada una de ellos por elución en batch en un único paso utilizando alta fuerza iónica (0.5 M KCl) y cambiando el pH a 7.00 (Figura 14). De este modo quedaron en evidencia propiedades anfotéricas del factor activo.

Los resultados de la Figura 14 muestran que la actividad estimuladora del ER ensayado ($S=40\%$, columnas ER) se eliminó completamente por el tratamiento del mismo con cualquiera de ambos intercambiadores de iones. Los sobrenadantes de los tratamientos de ER con ambos intercambiadores no estimularon la adsorción de los rizobios, por el contrario el agregado de estos sobrenadantes al medio de incubación final con las plantas produjo una fuerte inhibición de la adsorción rizobiana (comparar los valores de las columnas sQ y sS con el de la columna MF). El material eluido de las intercambiadores de iones, en cambio, utilizados para preincubar los rizobios, produjeron una estimulación de la adsorción de estos últimos ($S=55\%$ y $S=86\%$), que evidencia la recuperación de la actividad estimuladora del ER original. Es interesante notar que esta estimulación de la adsorción ocurrió sobre un nivel de adhesividad basal superior al obtenido con la preparación de ER completa y similar al control de adsorción en medio mineral sin agregado alguno de exudado (comparar los valores de las columnas rayadas de eQ y eS con la de ER y con el control MF). Este análisis de los resultados muestra que la actividad estimuladora recuperada por elución de los intercambiadores de iones, se obtuvo separada de sustancias que actúan inhibiendo la adsorción de los rizobios y que no fueron retenidas por los intercambiadores de iones en las condiciones ensayadas. Así, con este experimento, se corroboraron resultados previos donde el agregado de algunas muestras de ER durante el período de incubación de los rizobios con las plantas producía una inhibición de la adsorción (ver capítulo 5, sección 5.1.), efecto que en este experimento es producido por los sobrenadantes del

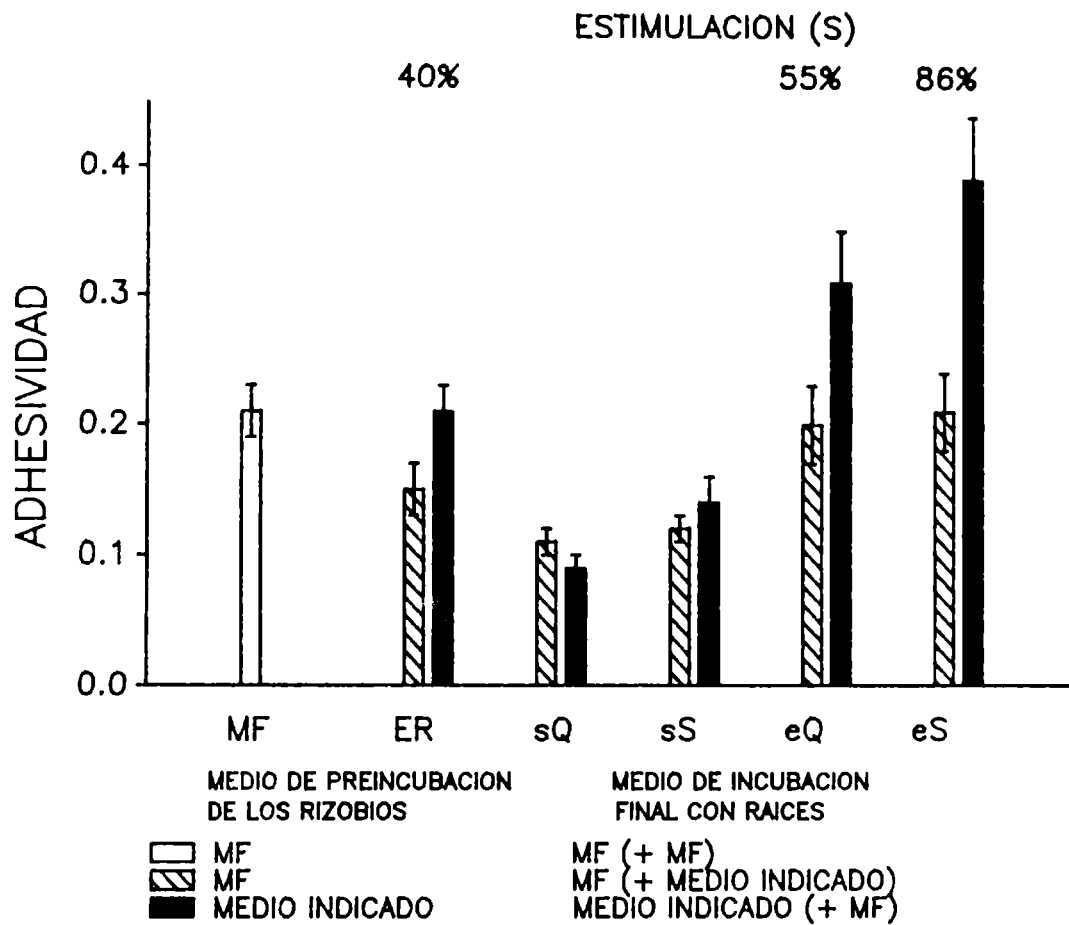


FIGURA 14: Separación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa utilizando resinas de intercambio iónico: recuperación de la actividad.

Alícuotas diferentes de 30 ml de exudado radicular dializado (ER) de alfalfa (originalmente a pH 7.0) se trataron con Q-Sepharosa (intercambiador fuerte de aniones) a pH 7.90 y con S-Sepharosa (intercambiador fuerte de cationes) a pH 6.20, apropiadamente equilibradas con medio de Fahraeus. Luego del tratamiento las resinas se separaron por centrifugación y filtración, obteniéndose los sobrenadantes que se denominaron sQ y sS para las alícuotas del ER tratadas con las resinas Q y S respectivamente. Las resinas utilizadas (0.2 ml) en el tratamiento del ER se eluyeron en batch con una solución 1M KCl a pH 7.00, (0.6 ml). Una vez eliminadas las resinas por filtración, las soluciones eluidas se dializaron exhaustivamente contra medio de Fahraeus, y se denominaron eQ y eS para los materiales provenientes de los tratamientos con las resinas Q y S respectivamente (Capítulo 2, sección 2.10.3.). Alícuotas de las diferentes soluciones resultantes, equivalentes a 10 ml del ER original, se utilizaron para preincubar *R. meliloti* L5-30 y ensayar los efectos sobre su posterior adsorción a raíces de alfalfa (sección 2.8.2.1.). La adsorción de los rizobios se cuantificó como adhesividad (sección 2.6.1.) y la estimulación porcentual de la misma (S) por la preincubación con el exudado radicular, se calculó respecto del control correspondiente preincubado en medio de Fahraeus (barras rayadas). Se realizó un control adicional (barra blanca) de rizobios preincubados en medio de Fahraeus (MF) donde no se agregó ER o fracción alguna durante la incubación final con las raíces. Las barras verticales indican intervalos de confianza de un 95%.

ER luego de su tratamiento con los intercambiadores de iones, que separa el factor activo para la estimulación.

De este modo se refuerza la hipótesis (esbozada en la sección 6.1.1.) que sostiene que cuando se mide la estimulación de la adsorción de *R. meliloti* por preincubación con ER de alfalfa, la estimulación observada sería el resultado de una sumatoria de efectos estimulantes e inhibitorios de la adsorción debidos a la presencia del ER en el medio de incubación.

En un intento posterior de purificación se realizó una cromatografía de intercambio iónico del ER de alfalfa utilizando una columna de 1 cm de diámetro con un lecho de 2 ml de S-Sepharosa, a pH 6.0 y 5°C. Esta columna se cargó haciendo pasar 2 litros de ER y luego se eluyó con 10 ml de un gradiente lineal de KCl (0.0-0.5 M) en buffer fosfato 10mM a pH 6.0. Las fracciones eluidas se monitorearon a 280 nm. Ninguna de las fracciones del cromatograma presentó absorción de luz a 280 nm, ni tuvieron actividad estimuladora sobre la adsorción de *R. meliloti* (resultados no mostrados). En este experimento el proceso de carga de la columna resultó muy lento (aproximadamente 10 horas) y el ensayo de actividad estimuladora de la adsorción rizobiana de las diferentes fracciones se realizó finalmente 72 horas después de haber sido cosechado el exudado radicular, tiempo suficiente, quizás, para permitir la pérdida de la actividad del ER (ver sección 1.6.2.).

Considerando que siempre se trabajó con preparaciones frescas de ER ensayadas 24 horas posteriores a su cosecha (post diálisis), y que su conservación a 5°C había dado resultados negativos (sección 6.1.2.), se buscó reducir el tiempo de desarrollo del proceso de concentración y purificación por intercambio iónico. Para ello se trató el ER con el intercambiador de iones y luego se dispuso este último dentro de una columna para eluir el material retenido utilizando un gradiente salino. La Figura 15 muestra los resultados de un experimento de este tipo donde 950 ml de ER se trataron en batch con 7 ml de S-Sepharosa a pH 6.0 (1 hora a temperatura ambiente, con agitación para mantener la resina en suspensión), que luego se dispusieron en una columna de 1 cm de diámetro y se eluyeron con 25 ml de un gradiente lineal de KCl (0.0-0.5 M) en buffer fosfato 10 mM a pH 6.0. Las fracciones eluidas fueron monitoreadas a 280 y 214 nm sin obtener señal a lo largo de todo el cromatograma y se dividieron en 6 fracciones arbitrarias de

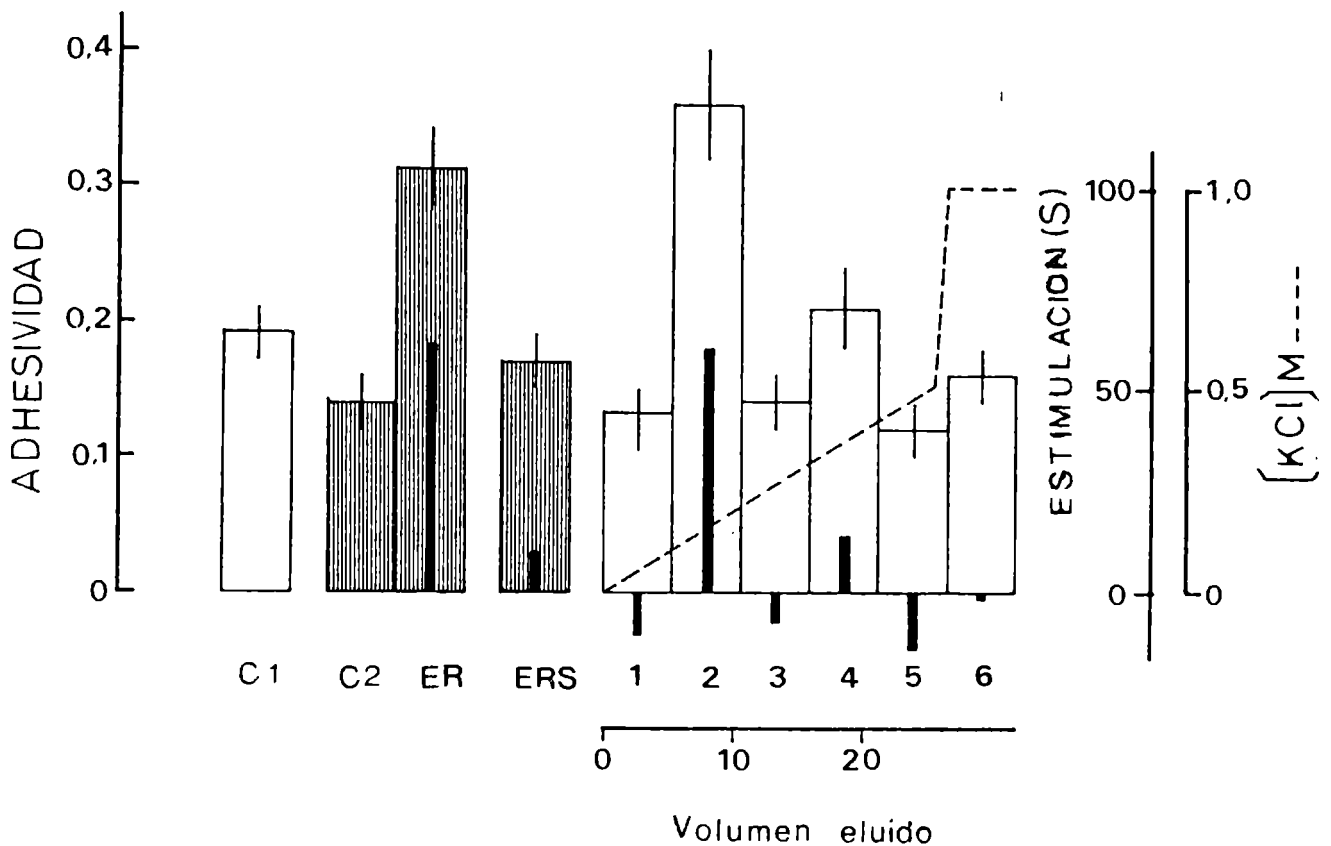


FIGURA 15: Separación de la actividad estimuladora del exudado radical de alfalfa por tratamiento en batch con S-Sepharosa y elución posterior con un gradiente salino.

950 ml de exudado radical dializado de alfalfa (ER) se trataron con 7 ml de resina S-Sepharosa (Pharmacia) a pH 6.00. La resina cargada se dispuso en una columna y se eluyó con un gradiente de KCl en buffer fosfato 10 mM (pH 6.00) a una velocidad de 9 ml por hora (Capítulo 2, sección 2.10.3.). Las fracciones eluidas (1 ml) se monitorearon a 214 nm. Al no observarse señal alguna a lo largo del cromatograma, los volúmenes eluidos se separaron arbitrariamente en las fracciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 indicadas (5 ml cada una) y se dializaron exhaustivamente contra medio mineral de Faraheus (pH 7.00) durante 20 horas. 1 ml de estas fracciones se utilizó para preincubar una suspensión de *R. meliloti* L5-30 y ensayar sus efectos sobre la posterior adsorción de los rizobios a las raíces (sección 2.8.2.1.). La adsorción se cuantificó como adhesividad (sección 2.6.1.). La estimulación de la adsorción (S) (barras negras) se calculó respecto de la adhesividad de los rizobios preincubados con medio de Fahraeus sin agregado posterior de exudado radical o fracción del mismo (C1); la actividad estimuladora del exudado radical original (ER) se midió respecto del control usual de rizobios preincubados en medio mineral donde el ER se agregó durante la incubación de los rizobios con las raíces (C2) (sección 2.8.2.1.). ERS: sobrenadante del ER tratado con la resina (su pH se corrigió nuevamente a 7.00). Las barras verticales indican intervalos de confianza de 95% de significación.

aproximadamente 5 ml cada una y dializadas contra medio de Fahraeus antes de su utilización para la preincubación de *R. meliloti*. Sólo la segunda fracción (correspondiente a la zona del gradiente 0.1-0.2 M KCl) presentó actividad estimuladora sobre la adsorción de los rizobios a raíces. El análisis de los resultados muestra que 1.0 ml de la fracción activa del cromatograma, cuyo volumen de 5.8 ml se correspondería con el volumen total de 950 ml de ER original, produjo la misma estimulación que 10 ml del ER control. Si se consideran únicamente las relaciones de volúmenes, el rendimiento obtenido fue muy bajo (6.1%). Sin embargo es difícil emitir un juicio definitivo sobre la concentración de la actividad estimuladora, o el rendimiento del proceso de separación, ya que este resultado contradice un rendimiento de aproximadamente 100% (recuperación de la actividad total) obtenido en los experimentos preliminares realizados en batch en un solo paso (Figura 14). Una explicación posible sería que el factor activo del ER original se encontrase en una concentración suficiente para saturar la capacidad de respuesta de los rizobios preincubados (aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml) como lo sugieren los resultados de eliminación del factor de ER por su pretratamiento con rizobios (ver capítulo 5, sección 5.2.). La falta de una curva dosis respuesta que permita cuantificar la actividad estimuladora en una forma directa y rápida imposibilitó la obtención de una respuesta clara para este punto.

El análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida ultradelgados con SDS y tinción con plata (Phastsystem, Pharmacia) de las fracciones eluidas del cromatograma fue negativo para la detección de bandas (sensibilidad del método, según los fabricantes, 0.3-0.5 ng/banda para un volumen de muestra sembrada de 1 μ l), indicando que la concentración del factor proteico en la preparación de ER sería menor a 2 ng/ml.

Este resultado negativo en el análisis por electroforesis de las diferentes fracciones del cromatograma, incluyendo la fracción activa -que se pueden considerar concentradas unas 160 veces respecto del material original (950 ml:5.8 ml)-, no está de acuerdo con el resultado, anteriormente mencionado, del análisis electroforético de otra muestra de exudado radicular concentrado 100 veces por liofilización, en el que se reveló la presencia de una proteína de 15 kDa.

La única diferencia remarcable entre ambas muestras de exudado es que la concentrada por liofilización se procesó en forma inmediata a su cosecha (centrifugación y esterilización por filtración, y no fue dializada), mientras que la separada (¿ y concentrada?) por intercambio iónico se procesó post diálisis. Esta observación señala al proceso de diálisis como responsable de una fuerte disminución en la concentración de proteínas revelables por electroforesis en geles. Sin embargo ya se ha mencionado que los exudados dializados mostraron siempre mayor actividad que los no dializados (con el mismo tiempo de conservación a 5°C) (sección 6.1.1.).

Esta discrepancia en los resultados, determina que la observación de la proteína de 15 kDa debe ser considerada sólo como una evidencia experimental muy preliminar en la identificación del factor de ER, responsable de la estimulación de la adsorción rizobiana.

6.2. - EFECTO DEL AGREGADO DE NO_3^- AL MEDIO DE CRECIMIENTO DE LAS PLANTAS SOBRE LA ACTIVIDAD ESTIMULATORIA DEL EXUDADO RADICULAR

Es bien sabido que cuando existe nitrógeno combinado como NO_3^- o NH_4^+ en el medio, disponible para la nutrición de las raíces de leguminosas, se produce una inhibición completa del proceso de asociación simbiótica con los rizobios (Dart, 1974; Streeter, 1988; ver Capítulo 1, sección 1.17.2.). Para estudiar la influencia de la nutrición nitrogenada de las plantas sobre el nivel de actividad estimuladora del ER de alfalfa, las plántulas se crecieron en hidroponía en medio mineral de Farhaeus suplementado con 5 mM KNO_3 . El ER obtenido en presencia de NO_3^- ($\text{ER}_{\text{NO}_3^-}$) fue procesado del mismo modo que el ER control obtenido de plantas crecidas en medio sin NO_3^- (ER), y fue dializado contra medio mineral de Fahraeus sin NO_3^- como se realizaba rutinariamente con el ER control.

No se detectó actividad estimuladora en el ER de plantas crecidas con NO_3^- , a diferencia del control que fue positivo (Tabla 5). Resultados similares se obtuvieron con el agregado de NH_4^+ 5 mM al medio de crecimiento de las plantas (Tabla 5).

TABLA 5: Efecto del estado de nutrición nitrogenada de las plantas de alfalfa sobre la actividad estimuladora del exudado radicular.

Medio de crecimiento de las plantas para la obtención del exudado	A(MF) ^a	A(ER) ^b	S ^c
Exp. #1			
Control sin NO ₃ ⁻	0.38 ± 0.06	0.67 ± 0.10	+76%
+ NO ₃ ⁻ 5mM	0.44 ± 0.07	0.38 ± 0.07	-13%
Exp. #2			
Control sin NH ₄ ⁺	0.35 ± 0.05	0.58 ± 0.08	+66%
+ NH ₄ ⁺ 5mM	0.40 ± 0.05	0.42 ± 0.06	+ 5%

Para la obtención del exudado radicular las plantas se crecieron en medio de Fahraeus suplementado con N donde se indica y los líquidos resultantes se procesaron para obtener las preparaciones de exudado dializado (ER) correspondientes, según se detalla en el Capítulo 2, sección 2.4. Las diálisis se realizaron contra medio de Fahraeus (sin N).

a., b. y c. Ver notas b., c. y d. correspondientes a la Tabla 2.

Las plantas utilizadas para el ensayo de adsorción fueron crecidas sobre agar-agua (sin N).

Los valores de adhesividad se dan con un intervalo de confianza de 95% de significación.

Estos resultados indican que al igual que la simbiosis en forma global, la actividad estimuladora del ER de alfalfa resultó estar bajo control de regulación negativa por el estado de nutrición nitrogenada de la planta.

CAPITULO 7

**LA INTERACCION *Rhizobium meliloti* - FACTOR
PROTEICO DEL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA
COMO UN EVENTO MUY TEMPRANO DE
RECONOCIMIENTO ENTRE LOS SIMBIONTES.**

7.1. - EXPRESION DE LA ESPECIFICIDAD SIMBIOTICA EN LA INTERACCION ENTRE EL EXUDADO RADICULAR DIALIZADO DE ALFALFA Y *R. meliloti*.

Para estudiar si la selectividad simbiótica ya se expresa en el fenómeno de estimulación de la adsorción rizobiana por acción del exudado radicular, se utilizaron dos grupos de inoculación cruzada: *R. meliloti*-alfalfa y *R. trifolii*-trébol blanco, cuyos integrantes respectivos son simbióticamente incompatibles con los del otro grupo. Se ensayó la preincubación de los rizobios con ER y la posterior adsorción a raíces en todas las combinaciones posibles: especie de *Rhizobium*, origen del exudado radicular y naturaleza de la superficie radicular sobre la que se ensayó la adsorción de los rizobios pretratados. Los resultados que se muestran en la Tabla 6 indican que se produjo estimulación de la adsorción de los rizobios únicamente por acción del exudado radicular homólogo (es decir proveniente de la planta susceptible de ser infectada por dicha especie de *Rhizobium*), pero inesperadamente esta estimulación se manifestó en forma independiente a la naturaleza de la superficie radicular, homóloga o heteróloga, donde se realizó la adsorción.

Estos resultados indican que la estimulación de la adsorción rizobiana por preincubación de los rizobios con ER expresa ya la selectividad propia de la asociación simbiótica. Resultados similares han sido publicados en trabajos donde una determinada acción del exudado radicular sobre los rizobios específicos no pudo ser reemplazada por exudado radicular de plantas heterólogas. Por ejemplo, la erosión de la cápsula de *R. trifolii* por enzimas glicosidásicas del exudado radicular de trébol no ocurre con exudados radiculares heterólogos de alfalfa soja o arveja (Dazzo *et al*, 1981); la degradación de preparaciones de polisacáridos de *R. leguminosarum* y *R. trifolii* por enzimas presentes en los exudados radiculares de arveja o trébol también refleja un cierto grado de especificidad simbiótica (Solheim y Fjellheim, 1984); la estimulación de la nodulación temprana de soja por preincubación de *B. japonicum* con exudado radicular de soja o lectina purificada de semilla de soja no pudo obtenerse cuando estos últimos fueron reemplazados por exudados radiculares de plantas heterólogas como alfalfa, trébol y arveja (Halverson y Stacey, 1986a).

TABLA 6: Estudio de la especificidad de la actividad estimuladora del exudado radicular sobre la adsorción de los rizobios utilizando dos sistemas simbióticos no compatibles, en forma cruzada.

	RAICES ^a			
	Alfalfa		Trébol	
	ER ^b	S ^c	ER ^b	S ^c
Cepa:				
R.me. L5-30	alfalfa	+ 85%	alfalfa	+ 64%
	trébol	- 9%	trébol	- 8%
R.tr. A118	alfalfa	- 49%	alfalfa	+ 31%
	trébol	+154%	trébol	+200%

Los rizobios provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía se preincubaron durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o con el exudado radicular (ER) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.), para luego ensayar su adsorción a raíces en una incubación final con las plantas de 1 hora (Capítulo 2, sección 2.6.1.).

^a. Plantas cuya superficie radicular fue utilizada para ensayar la adsorción de los rizobios preincubados.

^b. Origen del exudado radicular dializado (ER) utilizado para preincubar los rizobios.

^c. Estimulación de la adhesividad de los rizobios preincubados con el ER respecto de un control preincubado con MF (ver nota al pie ^d. correspondiente a la Tabla 2).

Los resultados de la Tabla 6 muestran estimulación de la adsorción de los rizobios por acción del exudado radicular homólogo sobre superficies radiculares heterólogas. Estos resultan sorprendentes en el sentido que indican que en la interacción estudiada en este trabajo, la superficie radicular presenta características inespecíficas. En el caso de *R. trifolii*-trébol se ha descrito un modo de adsorción específica de los rizobios a las raíces (Dazzo *et al*, 1976) que estaría mediado por una lectina denominada trifoliina A (Dazzo *et al*, 1978), que reconocería antígenos comunes en la superficie del rizobio y en la superficie de los pelos radiculares (Dazzo y Hubbell, 1975)(para una revisión ver Dazzo y Truchet, 1983). Estos mismos autores han descrito que la adsorción de *R. trifolii* a la superficie radicular de trébol pudo ser enormemente aumentada cuando los rizobios fueron recubiertos con la lectina trifoliina A, pero que este aumento de adsorción no se manifestó sobre raíces heterólogas. El estímulo de adsorción de *R. trifolii* que se muestra en la Tabla 6 podría estar relacionado con dicho efecto de la lectina trifoliina A (Dazzo *et al*, 1976) o con los efectos de las glicosidasas presentes en el exudado radicular de trébol que estimulan la adhesión polar (específica) de los rizobios a la superficie radicular (Dazzo *et al* 1984). Sin embargo los resultados obtenidos sobre la estimulación de la adsorción rizobiana a raíces heterólogas están en desacuerdo con lo previsto por la hipótesis de reconocimiento por lectina tan establecida en el sistema *R. trifolii*-trébol. Las diferencias que existen entre las metodologías utilizadas por estos autores y las usadas en el presente trabajo no permiten concluir sobre este punto. En este sentido podrían ser esclarecedores experimentos de estimulación de la adsorción de *R. trifolii* con ER de trébol utilizando el hapteno de la trifoliina A, la 2-deoxiglucosa, que inhibe las interacciones de la lectina con los rizobios (estos experimentos no fueron realizados dado que en este trabajo de tesis se centró la atención en el par simbiótico *R. meliloti*-alfalfa).

En una aproximación diferente, la hipótesis de una interacción primaria específica del factor del ER con el rizobio condujo a la pregunta si la especificidad opera también en el fenómeno más temprano de eliminación de la actividad estimuladora del ER de alfalfa por su pretratamiento con rizobios (capítulo 5, sección 5.2). Para contestar esta pregunta se realizaron los experimentos que figuran en la Tabla 7. En tres experimentos

TABLA 7: Actividad estimuladora remanente en el exudado radicular dializado de alfalfa luego de su pretratamiento con diferentes especies de rizobios.

Cepa usada para pretratar ER de alfalfa: ^a	Adhesividad de <i>R. meliloti</i> L5-30 ^b :			
	preincubada en MF	ó	preincubada en ER pretratado	
	A(MF)		A(ER)	
			S ^c	
Exp. A				
Ninguna	0.40 ± 0.06		1.00 ± 0.15	+150%
<i>R. meliloti</i> L5-30	0.40 ± 0.06		0.33 ± 0.05	-17%
<i>R. trifolii</i> A118	0.58 ± 0.08		1.36 ± 0.20	+134%
Exp. B				
Ninguna	0.30 ± 0.04		0.58 ± 0.07	+93%
<i>R. meliloti</i> L5-30	0.42 ± 0.05		0.42 ± 0.05	0%
<i>R. meliloti</i> 2011	0.45 ± 0.08		0.34 ± 0.06	-24%
Exp. C				
Ninguna	0.16 ± 0.03		0.26 ± 0.04	+62%
<i>R. trifolii</i> A118	0.17 ± 0.03		0.35 ± 0.05	+106%
<i>R. leguminosarum</i> 248	0.26 ± 0.04		0.49 ± 0.06	+88%
<i>R. phaseoli</i> CE-3	0.07 ± 0.01		0.24 ± 0.03	+243%

^a. Cultivos en fase exponencial tardía de las cepas indicadas se centrifugaron y los sedimentos se resuspendieron y diluyeron con ER de alfalfa hasta aproximadamente 10^6 - 10^7 bacterias por ml. Estas suspensiones se incubaron a 28°C durante 30-40 minutos. Las bacterias se separaron por centrifugación y los sobrenadantes se filtraron a través de membranas de policarbonato de 0.2 μ m de poro. El filtrado estéril se denominó ER pretratado (Capítulo 2, sección 2.9.).

^b. Rizobios provenientes de un cultivo de L5-30 en fase exponencial tardía se preincubaron durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o con el ER pretratado (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.), para luego ensayar su adsorción a raíces de alfalfa en una incubación final con las plantas de 1 hora. A(MF) y A(ER) corresponden a los valores de adhesividad respectivos (Capítulo 2, sección 2.6.1.).

^c. Estimulación porcentual de la adhesividad. Ver ^d. correspondiente a la Tabla 2.

independientes A, B, and C, el ER de alfalfa se pretrató con aproximadamente 10^7 bacterias por ml durante 40 minutos, tanto homólogas *R. meliloti* -A y B- como heterólogas -A y C-; luego de eliminar las bacterias por filtración se ensayó la actividad estimuladora remanente en el ER pretratado, utilizándolo para preincubar durante 3 horas nuevos *R. meliloti* L5-30 y ensayar luego la adsorción de estos últimos a raíces de alfalfa en incubaciones finales de 1 hora con las plantas. Los pretratamientos de ER de alfalfa con cepas homólogas *R. meliloti* L5-30 o 2011 -la primera en los experimentos A y B, la segunda en el experimento B, respectivamente- causaron la total eliminación de la actividad estimuladora, como se mencionó anteriormente (Figura 6). Por el contrario, cuando en el pretratamiento se utilizaron cepas heterólogas -*R. trifolii* A118 en el experimento A, y tanto *R. trifolii* A118, *R. leguminosarum* 248, o *R. phaseoli* CE-3 en el experimento C- no se produjo la eliminación de la actividad estimuladora del ER, que permaneció en el filtrado en niveles a veces más altos que en el control sin tratar (Tabla 7). La falta de eliminación se observó utilizando una alta concentración de los rizobios heterólogos, aproximadamente uno o dos órdenes de magnitud superior a los niveles de rizobios homólogos que causan la total eliminación (ver Figura 6).

Estos resultados indican un alto grado de selectividad y poder discriminatorio hacia los rizobios heterólogos en la interacción que conduce al fenómeno de eliminación, entre el factor del ER de alfalfa y el microsimbionte, aún antes de que se desarrolle el efecto estimulador de la adsorción.

Tomando en conjunto los resultados de manifestación de la especificidad simbiótica tanto en la estimulación de la adsorción de *R. meliloti* por el ER de alfalfa (Tabla 6), como en la eliminación específica del factor del ER de alfalfa por *R. meliloti* (Tabla 7), considero que la interacción de *R. meliloti* con un factor proteico del ER de alfalfa constituiría un evento de reconocimiento temprano entre la bacteria y la planta, dentro del proceso de asociación simbiótica que los involucra.

7.2. - PARTICIPACION DE LA INTERACCION ENTRE *R. meliloti* Y LA PROTEINA DEL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA EN LOS PROCESOS QUE DETERMINAN EL MODO DE ADSORCION ESPECIFICA DE *R. meliloti* A LAS RAICES DE ALFALFA.

Como ya se ha dicho, la adsorción de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa se realiza al menos en dos modos diferentes. Uno llamado inespecífico que puede ser competido por bacterias heterólogas, y un modo específico que puede ser competido únicamente por *R. meliloti* (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b). Por el momento no se conocen los eventos moleculares que determinan ambos tipos de adsorción.

La manifestación de la especificidad simbiótica en el fenómeno de eliminación mencionada en la sección anterior, es reminiscente de lo que ocurre con la inhibición de la adsorción de *R. meliloti* a raíces de alfalfa por cepas homólogas (inhibición total) o heterólogas (inhibición parcial).

Para tratar de contestar la pregunta si la interacción encontrada entre el factor proteico del exudado de alfalfa y *R. meliloti* forma parte de los eventos moleculares que determinan el modo de adsorción específica antes descrito, se estudió la estimulación de la adsorción por preincubación de los rizobios con ER, ensayando la posterior adsorción a las raíces en presencia de concentraciones saturantes del rizobio heterólogo *R. trifolii* A118. Los resultados de la Tabla 8 indican que el efecto estimulador opera aún en el modo específico de adsorción.

Por otra parte las curvas de eliminación de la actividad estimuladora del exudado radicular por concentraciones crecientes de *R. meliloti* muestran que 5×10^5 bacterias por ml son suficientes para eliminar en 30 minutos la actividad estimuladora del exudado radicular (Capítulo 5, sección 5.2.). Los mismos órdenes de concentraciones de rizobios producen una inhibición total de la adsorción de una cepa indicadora de *R. meliloti* (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b). Esta coincidencia se observa mejor en la Figura 16 donde la curva de eliminación del factor del ER por concentraciones crecientes de *R. meliloti* se superpone llamativamente con los valores convenientemente graficados de la inhibición de la adsorción de *R. meliloti* por otro *R. meliloti* (resultados tomados de Caetano-Anollés, Tesis Doctoral, 1985, Figura 5.1, página 148).

TABLA 8: Preincubación de *R. meliloti* L5-30-1 (Rif^r) con exudado radicular dializado de alfalfa: Efecto sobre la posterior adsorción de los rizobios a las raíces de alfalfa, en presencia de concentraciones saturantes de rizobios homólogos y heterólogos.

Cepa competidora	A(MF) ^a	A(ER) ^b	S ^c
Ninguna	0.23 ± 0.04	0.53 ± 0.08	+130%
<i>R. meliloti</i> L5-30	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.02	+150%
<i>R. trifolii</i> A118	0.08 ± 0.02	0.22 ± 0.04	+175%

Rizobios provenientes de un cultivo de L5-30-1 (cepa indicadora) en fase exponencial tardía se preincubaron (5×10^3 bacterias/ml) durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o exudado radicular dializado de alfalfa (ER), para luego ensayar su adsorción a raíces de alfalfa en una incubación final de 1 hora con las plantas en presencia de la cepa competidora indicada, que se agregó en concentraciones aproximadas a 10^7 bacterias por ml a la mezcla de incubación final de las plantas con los rizobios preincubados. Las cepas competidoras L5-30 y A118 son Rif sensibles. Los rizobios L5-30-1 que quedaron adsorbidos a las raíces se desarrollaron como microcolonias en presencia de Rifampicina (40 μ g/ml) (ver Capítulo 2, sección 2.6.2.).

a., b., y c. Ver notas ^b, ^c, y ^d. correspondientes a la Tabla 2.

Los valores de adhesividad se dan con un intervalo de confianza de 95% de significación.

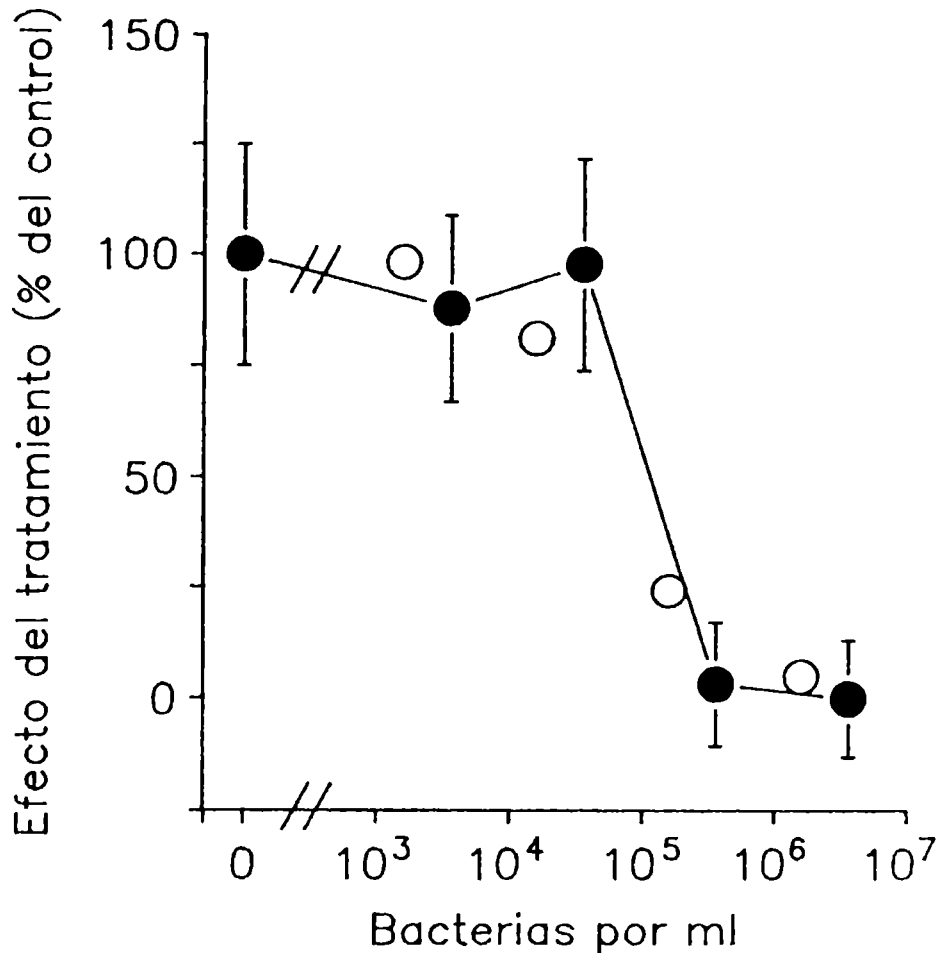


FIGURA 16: Eliminación de la actividad estimuladora presente en el exudado radicular de alfalfa por su pretratamiento con *R. meliloti*, comparación con la inhibición de la adsorción de *R. meliloti* a raíces de alfalfa por competición con una cepa homóloga.

(●) Actividad estimuladora remanente en el exudado radicular dializado de alfalfa luego de su tratamiento con las concentraciones indicadas de *R. meliloti* L5-30, los resultados corresponden al experimento de la Figura 7 (ver leyenda correspondiente); (○) porcentaje de la adhesividad de *R. meliloti* L5-30-1 (rif^r) a raíces de alfalfa en presencia de la cepa competidora homóloga L5-30 (Rif^s) en las concentraciones indicadas (resultados tomados de Caetano Anollés, Tesis Doctoral, 1985, véase el texto).

Otras coincidencias entre el modo de adsorción específica y la estimulación de la adsorción, se encuentran en que ambas son dependientes del estado de crecimiento de los rizobios, óptimas en fase exponencial tardía, y ambas dependen de un estado nutricional de las plantas deficiente en nitrógeno (ver capítulo 5, sección 5.3. y capítulo 6, sección 6.2.; Caetano-Anollés, 1985, Tesis Doctoral, Páginas 118 y 115).

Como ya se ha dicho en la sección anterior, la estimulación de la adsorción de *R. meliloti* por preincubación en el exudado radicular de alfalfa, se manifiesta aún sobre superficies radiculares heterólogas como trébol, que no exuda el factor activo presente en el exudado radicular de alfalfa.

Para estudiar esta hipotética participación de la interacción del rizobio con la proteína del exudado radicular en el modo específico de adsorción, se realizaron curvas de competición para la adsorción de *R. meliloti* L5-30 a raíces de la siguiente manera: se utilizó como cepa indicadora L5-30-1 (Rif^r) preincubada con ER de alfalfa, y como cepa competidora L5-30 (rif^s) sin preincubar. Se determinó la adsorción de la cepa indicadora, en presencia de concentraciones crecientes de la cepa competidora, sobre raíces de alfalfa y sobre raíces de trébol.

Durante la incubación de los rizobios con las raíces, en el caso de raíces de alfalfa existe un aporte endógeno de la proteína del exudado radicular por las mismas raíces, situación que no ocurre cuando se trata de raíces de trébol. En este último caso la proteína del exudado radicular de alfalfa es aportada a los rizobios de la cepa indicadora durante el período de preincubación de los rizobios con ER. Los rizobios competidores, en cambio, sólo tuvieron acceso a la proteína durante el período de incubación final con las plantas (1 hora), y dispusieron sólo de aquella proteína libre que hubiesen dejado los rizobios de la cepa indicadora, luego del período de tres horas correspondiente a su preincubación con ER.

Si la interacción con la proteína fuese lo que determina el carácter de cepa competidora homóloga (*R. meliloti*) para la adsorción a raíces, según lo definen Caetano Anollés y Favelukes (1986b), en este experimento la cepa competidora ensayada sobre trébol podría haberse comportado de dos maneras diferentes: a) como cepa heteróloga (es decir que por no disponer de la proteína del exudado no hubiese sido capaz de competir

un 100%), o b) como una cepa homóloga menos competitiva (es decir que necesite una concentración mayor de bacterias para producir el mismo efecto de inhibición que sobre raíces de alfalfa, quizás por disponer de menor cantidad de proteína del exudado radicular de alfalfa).

Los resultados que se muestran en la figura 17 indicaron que la situación se corresponde con la segunda suposición.

De todas estas observaciones se desprende la hipótesis que explicaría el modo de adsorción específica de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa (Caetano Anollés y Favelukes, 1986b), como la adsorción de los rizobios a las raíces que resulta de una previa interacción de los rizobios con la proteína del exudado radicular. Las curvas de inhibición de la adsorción por concentraciones crecientes de rizobios serían una manifestación de los efectos de la titulación, por los rizobios competidores, de la proteína del exudado radicular disponible en el medio de incubación final de los rizobios con las plántulas de alfalfa.

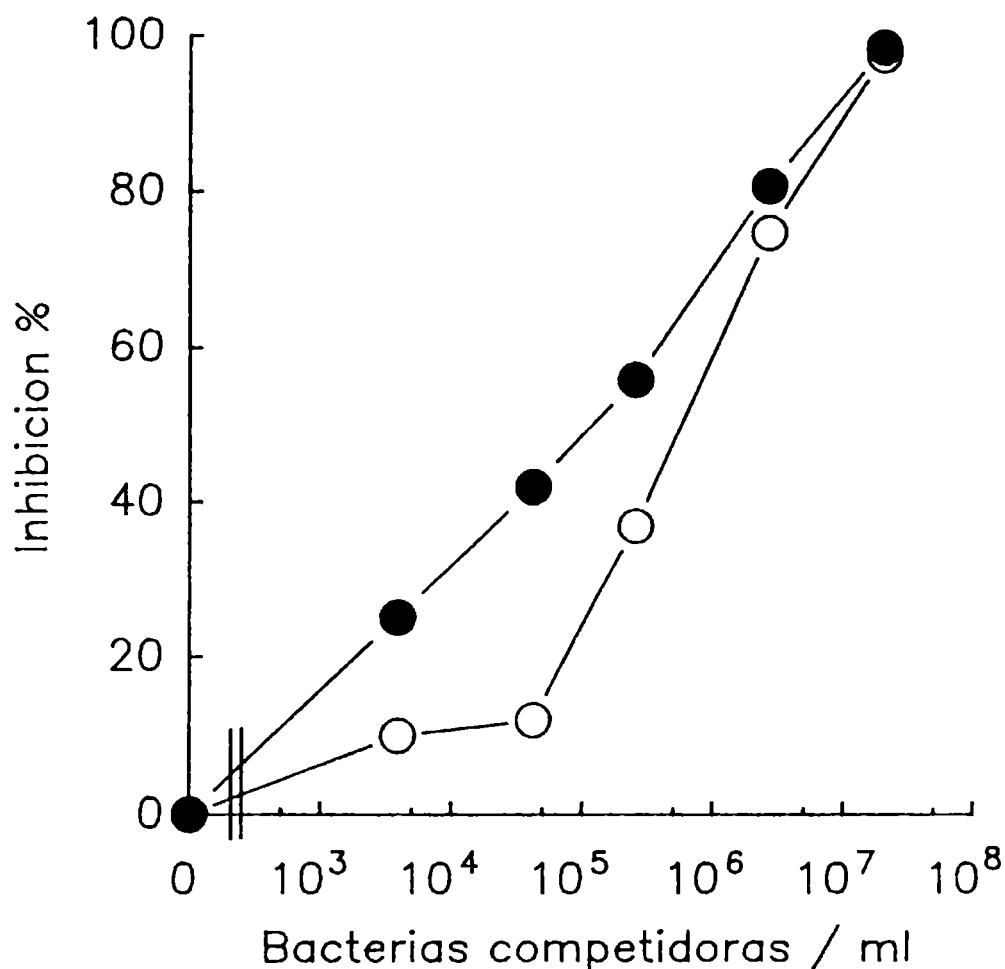


FIGURA 17: Adsorción de *R. meliloti* L5-30-1, preincubada con exudado radicular de alfalfa, a raíces homólogas o heterólogas competida por la presencia de una cepa homóloga.

Una suspensión de *R. meliloti* L5-30-1 (Rif^r) proveniente de un cultivo en fase exponencial tardía se preincubó con exudado radicular dializado de alfalfa (aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml) y se ensayó su posterior adsorción a las raíces de plántulas de alfalfa (●), o de trébol (○), en presencia de las concentraciones indicadas de la cepa competidora *R. meliloti* L5-30 (Rif^S) (capítulo 2, sección 2.6.2.). Se representan los valores de inhibición de la adhesividad de *R. meliloti* L5-30-1 comparada con la adhesividad obtenida en ausencia de bacterias competidoras.

CAPITULO 8

REQUERIMIENTOS GENETICOS DE *Rhizobium meliloti* PARA INTERACTUAR CON EL FACTOR PROTEICO DEL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA.

8.1. - ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DE DIFERENTES MUTANTES DE NODULACION DE *Rhizobium meliloti* EN SU INTERACCION CON EL FACTOR PROTEICO DEL EXUDADO RADICULAR DE ALFALFA.

El reconocimiento específico entre los rizobios y las raíces de leguminosas está determinado genéticamente en uno y otro simbionte, siendo el establecimiento de la asociación simbiótica, la manifestación de una compatibilidad genética entre ambos (Vincent, 1980).

Una vez establecida la existencia de una interacción entre *R. meliloti* y alfalfa que involucra la participación de un factor proteico del exudado radicular, con características de evento de reconocimiento temprano (Capítulo 7, sección 7.1.), surge la pregunta sobre cuáles serán los genes del rizobio que determinan dicha interacción. Para tratar de contestar esta pregunta y caracterizar algunos requerimientos genéticos de los rizobios que condicionan ese reconocimiento, se utilizaron las cepas y plásmidos que figuran en la Tabla 9.

El estudio de los requerimientos genéticos del rizobio para llevar a cabo esta interacción con la planta puede resultar muy útil para descifrar y entender los mecanismos de la misma.

En el presente trabajo se estudiaron los siguientes aspectos:

A.- La respuesta de la cepa en estudio a la preincubación con el ER de alfalfa, sobre su posterior adsorción a las raíces (Capítulo 5, sección 5.1.).

B.- La capacidad de producir la eliminación de la actividad estimuladora presente en el ER por pretratamiento del mismo con una suspensión de células de la cepa ensayada, posterior separación de las bacterias por filtración y ensayo de la actividad estimuladora remanente en el ER tratado, mediante la preincubación de la cepa salvaje *R. meliloti* L5-30 (Capítulo 5, sección 5.2.).

La cepa *R. meliloti* 1028 es un mutante afectado en la nodulación de las raíces de alfalfa, ya que su inoculación produce pseudonódulos en las raíces; y es además auxotrófico para isoleucina y valina (Buikema *et al*, 1983). Esta cepa se obtuvo por mutagénesis con transposón Tn5, cuya localización es cromosomal en el rizobio (Buikema *et al*, 1983; Grasso y Aguilar, 1988).

TABLA 9: Cepas y plásmidos utilizados en los ensayos de caracterización de los requerimientos genéticos de *R. meliloti* para su interacción con el factor del exudado radicular de alfalfa que estimula la adsorción rizobiana a las raíces.

Nombre Ref.	Característica	Infectividad en alfalfa
R. meliloti L5-30	Salvaje.	+
R. meliloti 1021	Salvaje.	+
R. meliloti 1028	Mutante Tn5 cromosomal derivado de 1021.	- ^a (Buikema et al, 1982)
R. meliloti 2011	Salvaje.	+
R. meliloti GMI766	Mutante derivada de 2011 deletada en el pSym, región que contiene a los genes nod y nif.	- (Truchet et al, 1985)
Agrobacterium tumefaciens GMI9050	Curado de su plásmido Ti	- (Truchet et al, 1984)
<u>Plasmidos</u>		
pGMI42	Contiene 290 kb del pSym de R. meliloti incluyendo la región de los genes nod. Confiere infectividad en alfalfa a Agrobacterium tumefaciens y complementa la deleción de la cepa GMI766 para la nodulación.	(Truchet et al, 1985)
pGMI149	Contiene la región de los genes nod de R. meliloti. Complementa la deleción de la cepa GMI766 para la nodulación.	(Debellé et al, 1986)

^a. Forma escasos nódulos vacíos

Esta cepa 1028 no fue estimulada en su adsorción a las raíces por preincubación con ER de alfalfa (Tabla 10). Cuando se la utilizó para pretratar el ER de alfalfa también fue incapaz de producir la eliminación de la actividad estimuladora presente en el ER (Tabla 11).

Estos resultados sugieren que la falta de respuesta de esta cepa a la estimulación de su adhesividad por acción del ER se debería a una incapacidad de reacción primaria con el factor activo del ER.

La cepa *R. meliloti* GMI766 es también un mutante de nodulación que posee una deleción en el plásmido pSyma que abarca las regiones *nod* y *nif* (Truchet *et al*, 1985). Esta cepa es incapaz de infectar y nodular a las raíces de alfalfa, como de producir ninguna reacción temprana en las mismas, es decir, ni deformación de los pelos radiculares, ni inducción del desarrollo meristemático en el cortex interno de la raíz (Truchet *et al*, 1985). Los resultados aquí obtenidos con la cepa GMI766 (Tabla 11) muestran que la misma es capaz de producir la reacción de eliminación del factor del ER. Eso indica que los genes *nod* ausentes en GMI766 no son necesarios para esa interacción con el factor.

Es importante remarcar que estos experimentos de eliminación de la actividad estimuladora del ER fueron realizados con concentraciones saturantes de bacterias (aproximadamente 10^7 /ml). De este modo pudo haberse enmascarado una diferencia en la eficiencia de la capacidad de eliminación, ya que cuando ésta se estudió en función de la concentración de rizobios salvajes (cepa L5-30) se encontró que 5×10^5 bacterias por ml eran suficientes para lograr la remoción total de la actividad estimuladora (ver Figura 6). Esta cuestión, por el momento pendiente, podría resolverse realizando con las cepas mutantes curvas de eliminación de la actividad estimuladora del ER en función de la concentración bacteriana.

Los resultados de las preincubaciones de la cepa GMI766 con ER no fueron muy claros, debido al comportamiento del control, es decir su cepa parental *R. meliloti* 2011 Sp^r. La preincubación del mutante GMI766 con ER de alfalfa produjo una fuerte inhibición de la adsorción a las raíces respecto al comportamiento de su cepa parental. Esta cepa 2011 Sp^r, infectiva en alfalfa, considerada salvaje, presenta sin embargo comportamientos anómalos en interacciones tempranas con las raíces de alfalfa. Así, no pudo ser estimulada en su adsorción a raíces por preincubación con ER (Tabla 10) y se

TABLA 10: Efectos de la preincubación de diferentes mutantes de *R. meliloti* con exudado radicular dializado de alfalfa sobre su posterior adsorción a raíces.

Cepa	A(MF) ^a	A(ER) ^b	S ^c
1021	0.35 ± 0.04	0.63 ± 0.05	+171%
1028	0.14 ± 0.03	0.15 ± 0.03	+ 7%
2011	0.36 ± 0.05	0.37 ± 0.05	+ 3%
GMI766	0.36 ± 0.05	0.13 ± 0.02	- 64%
GMI766(p149)	0.34 ± 0.05	0.39 ± 0.05	+ 15%

Los rizobios provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía se preincubaron durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o con exudado radicular dializado de alfalfa (ER) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.).

a., b. y c. Ver notas ^{b.}, ^{c.} y ^{d.} correspondientes a la Tabla 2.

TABLA 11: Eliminación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa por pretratamiento del mismo con una suspensión de bacterias. Comportamiento de diferentes mutantes de *R. meliloti*.

Cepa utilizada para pretratar el ER de alfalfa. ^a	S ^b
Ninguna	+107%
2011	- 24%
766	- 36%
1028	+105%

a. Ver nota ^a de la Tabla 7.

b. Estimulación porcentual de la adhesividad de *R. meliloti* L5-30 (Actividad estimuladora remanente). Ver notas ^b y ^c de la tabla 7.

comporta en forma anómala cuando se la utiliza como cepa indicadora en ensayos de adsorción específica de *R. meliloti* a raíces de alfalfa (ensayos realizados en este laboratorio por Antonio Lagares, comunicación personal).

Pese a estos resultados inesperados, resultó muy interesante que la inhibición manifestada por la cepa mutante deletada GMI766 fuese revertida por complementación de esta cepa con el plásmido pGMI149 (Debellé *et al*, 1986) que contiene las funciones de los genes *nod*, ausentes en la cepa GMI766. Este plásmido comprende la región de los genes *nod* D₁, ABC, IJ o región II_a, PQ, FEG, H, y D₃ (Long, 1989a y 1989b; ver Capítulo 1, sección 1.5.) y complementa a la cepa GMI766 confiriéndole capacidad de infectar y nodular las raíces de alfalfa (Debellé *et al*, 1986). De este modo aparece la sugerencia de un posible rol de esta región génica de los rizobios en la interacción con el factor activo del ER de alfalfa.

Teniendo en cuenta que el comportamiento de las cepas 2011 Sp^r y su mutante GMI766 resultaba anómalo para el estudio del efecto de estimulación de la adsorción por preincubación con ER, se decidió ensayar el comportamiento de otra bacteria de la familia *Rhizobiaceae*, *Agrobacterium tumefaciens* GMI9050 (una cepa curada de su plásmido Ti), complementada por un plásmido denominado pGMI42, que contiene una amplia región del pSym de *R. meliloti* que incluye la región *nod* (más extensa que la presente en el pGMI149), y que de ese modo adquiere la capacidad de formar nódulos vacíos en alfalfa (Hirsch *et al*, 1984; Truchet *et al*, 1984).

Cuando se estudió la estimulación de la adsorción por acción del ER, se encontró que mientras la adsorción de la cepa GMI9050 no manifestaba ninguna modificación por preincubación de las bacterias con ER de alfalfa, la cepa complementada por el plásmido pGMI42 presentaba una fuerte estimulación de la adsorción a las raíces (Tabla 12, experimento 1).

En forma similar, la cepa no complementada *A. tumefaciens* GMI9050 no fue capaz de eliminar el factor activo presente en el ER de alfalfa, pero la incorporación del plásmido pGMI42 confirió al *Agrobacterium* la capacidad de producir dicha eliminación (Tabla 13, experimento 1).

Estos resultados indican que la presencia en *A. tumefaciens* de los genes *nod* -o genes relacionados a ellos- de *R. meliloti*, confiere al primero, tanto la capacidad de interacción primaria con el factor del ER de alfalfa (efecto de "eliminación") como la capacidad de ser estimulada en su

TABLA 12: Preincubación de *Agrobacterium tumefaciens* -conteniendo genes del pSym de *R. meliloti*- con exudado radicular dializado de alfalfa: efectos sobre su posterior adsorción a las raíces.

Cepa	A(MF) ^a	A(ER) ^b	S ^c
Exp. 1			
9050	2.79 ± 0.23	2.75 ± 0.22	- 1%
9050(p42)	1.84 ± 0.20	3.13 ± 0.28	+ 70%
Exp. 2			
sin luteolina^d			
9050	0.32 ± 0.06	0.27 ± 0.05	- 17%
9050(p42)	0.06 ± 0.02	0.16 ± 0.03	+179%
con luteolina^d			
9050	0.60 ± 0.10	0.53 ± 0.09	- 11%
9050(p42)	0.06 ± 0.02	0.29 ± 0.05	+380%

Las bacterias provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía se preincubaron durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o con exudado radicular dializado de alfalfa (ER) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.).

a., b. y c. Ver notas b., c. y d. correspondientes a la Tabla 2.

d. Los cultivos en fase exponencial tardía se diluyeron con MF hasta aproximadamente 10^5 bacterias por ml y se dejaron crecer así diluidos durante 3 horas más, con el agregado de luteolina 10^{-6} M (donde se indica). Luego las bacterias se diluyeron y se ensayaron como se indica más arriba.

Los valores de adhesividad se dan con un intervalo de confianza de 95% de significación.

TABLA 13: Eliminación de la actividad estimuladora del exudado radicular de alfalfa por pretratamiento del mismo con una suspensión de bacterias. Comportamiento de *Agrobacterium tumefaciens* complementada con genes del pSym de *R. meliloti*

Cepa utilizada para pretratar el ER de alfalfa. ^a	s ^b
Exp. 1	
Ninguna	+209%
GMI9050	+210%
Exp. 2	
Ninguna	+107%
GMI9050 (p42)	0%
GMI9050 (p149)	+ 14%

a. Ver nota ^a de la Tabla 7.

b. Estimulación porcentual de la adhesividad de *R. meliloti* L5-30 (Actividad estimuladora remanente). Ver notas ^b y ^c de la tabla 7.

adsorción a raíces por preincubación en ER de alfalfa; y están de acuerdo con la hipótesis de participación de los genes *nod* (o relacionados) en la interacción de *R. meliloti* con el factor proteico del exudado de alfalfa.

Los genes *nod* de *Rhizobium* son inducidos por sustancias de tipo flavonas provenientes de la planta con la participación del producto del gen *nodD* (Mulligan y Long, 1985, Rolfe y Gresshoff, 1988)). Sin embargo los cultivos de *Agrobacterium* utilizados en los experimentos descritos más arriba fueron crecidos en ausencia de estas sustancias, indicando que, o bien los niveles basales de expresión de estos genes son suficientes para el éxito de la interacción del rizobio con el factor del ER, o su inducción durante el período de incubación final con las plantas es determinante para la expresión final de la estimulación de la adsorción por acción de la preincubación de las bacterias con el exudado dializado.

A modo de aproximación para apoyar la hipótesis de la participación de los genes *nod* en la expresión de la interacción de las bacterias con el factor activo del ER, se ensayó la respuesta de las cepas de *Agrobacterium* (complementadas o no con el plásmido pGMI42) incubadas previamente con luteolina, uno de los inductores de los genes *nod* de *R. meliloti* (Peters *et al*, 1986; Hartwig *et al*, 1990a). Para ello se pretrataron 10^5 bacterias/ml diluidas en medio de Fahraeus con luteolina 10^{-6} M durante 3 horas a 28°C, previas a su dilución (hasta 5×10^3 bacterias por ml) para ensayar su preincubación con ER. El pretratamiento con luteolina no tuvo efectos sobre la cepa GMI9050 que no posee genes *nod* de *R. meliloti*, pero sí sobre la cepa GMI9050 complementada con el plásmido pGMI42, aumentando la estimulación obtenida en la adsorción bacteriana a las raíces por la preincubación con ER de alfalfa, (Tabla 12, experimento 2).

Estos resultados constituyen una nueva corroboración de la hipótesis plantada más arriba, ya que la condición experimental que produce un aumento en el nivel de expresión de los genes *nod* (presencia de luteolina) se corresponde con una mayor estimulación de la adsorción de las bacterias que poseen estos genes, al ser preincubadas con ER de alfalfa.

Al final del Capítulo 5 (sección 5.3.) se plantea otra hipótesis que, teniendo en cuenta los resultados de la influencia del estado de crecimiento de los rizobios en su interacción con el factor del ER, postula dos etapas para esta interacción: una primer etapa rápida de interacción por

la cual el factor activo desaparece del medio, y una segunda etapa más lenta que podría corresponder a la transducción de esta señal de la planta por el rizobio, dando como resultado una mayor capacidad de adsorción de los rizobios a la superficie radicular. Los resultados obtenidos con los mutantes de *R. meliloti* confirman la existencia de las dos etapas postuladas, ya que se requieren diferentes genes para el desarrollo de las mismas.

La incapacidad de interacción inicial del mutante *R. meliloti* 1028 con el factor proteico, evidenciada por su falta de eliminación del factor en solución, indica que esa interacción inicial requeriría genes cromosomales ausentes en la cepa *R. meliloti* 1028. Resulta muy interesante que esta cepa 1028 es igualmente incapaz de reaccionar con la aglutinina de semillas de alfalfa (Paau *et al*, 1981), resultado que se discutirá más adelante (ver Capítulo 9).

La interacción inicial del factor con el rizobio en cambio no necesitaría la participación de genes del pSym de *R. meliloti* ausentes en la cepa GMI766, ya que esta cepa, con una deleción que abarca a los genes *nod* y *nif*, fue capaz de eliminar la actividad estimuladora del exudado.

Sin embargo genes del pSyma, probablemente correspondientes a la familia de genes *nod* inducibles por luteolina, participarían en la expresión de la estimulación de la adsorción debida a la acción del factor proteico del exudado. Así lo indican los resultados obtenidos con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GMI9050 complementada con el plásmido pGMI42 que lleva la región *nod* del pSyma de *R. meliloti*. Esta cepa heteróloga y quimérica fue estimulada en su adsorción a raíces de alfalfa por preincubación con el exudado radicular dializado de alfalfa. Pero en *A. tumefaciens* GMI9050, la presencia de esta misma región del pSyma confiere a la bacteria la capacidad de eliminar al factor de la solución.

Así se llega a una situación paradójica, dado que los genes *nod* ausentes en GMI766, que en éste no son necesarios para la interacción inicial con el factor, si complementan al *Agrobacterium* para cumplir esta etapa (además de la posterior estimulación).

Para resolver esta paradoja, es necesario al menos postular que *Agrobacterium* posea funciones genéticas similares a las que normalmente presentes en *R. meliloti* (salvaje), se han perdido en el mutante cromosomal

1028. Sin embargo esto resulta una condición necesaria pero no suficiente, ya que la cepa de *Agrobacterium* GMI9050 no complementada fue incapaz de remover la actividad del exudado de alfalfa. Los resultados indican que genes del pSym de *R. meliloti*, presentes en el pGMI42 y ausentes en la cepa GMI766, son necesarios en *Agrobacterium* pero no en *R. meliloti* para que ocurra la primer interacción con el factor. En este sentido, se ha descrito que en la expresión de los genes *nodDABC* de *R. meliloti* en *Agrobacterium* participan otros genes además de los propios *nodDABC*, que no se encuentran por ejemplo en *Escherichia coli* (Yelton *et al*, 1987).

Es concebible que haya copias extras de los genes de la región *nod* necesarios para producir la eliminación del factor del ER de la solución, presentes en *R. meliloti* GMI766 pero no en *A. tumefaciens* GMI9050.

Por el momento no poseemos elementos que permitan describir el mecanismo de la interacción del rizobio con la proteína del exudado, y de los procesos que se desencadenarían produciendo finalmente un aumento en la capacidad de adsorción a las raíces. Se puede especular que la proteína de la planta actúa como una señal específica para el rizobio, señal que una vez recibida debe ser transducida para que se exprese una mayor capacidad de adsorción de los rizobios a la superficie de las raíces.

Resulta importante hacer notar que la cepa GMI766 presenta un comportamiento peculiar y consistente en manifestar una inhibición de la adsorción por efecto de la preincubación de las bacterias con el ER de alfalfa. En este trabajo no se ha continuado la investigación de este comportamiento, por lo cual no existen suficientes elementos de juicio que permitan elaborar una hipótesis que explique dicho comportamiento.

Como ya se ha dicho anteriormente (Capítulo 5, sección 5.1), se puede formular una hipótesis que sostenga que la estimulación de la adsorción sea producto de la inducción de respuestas quimiotácticas específicas del rizobio hacia la raíz, función bacteriana que participa en el proceso de adsorción en las condiciones del ensayo aquí utilizado (Caetano-Anollés *et al*, 1988). En este sentido son sugerentes los resultados obtenidos con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* GMI9050 complementada con el plásmido pGMI42. Se sabe que este plásmido confiere al *Agrobacterium* capacidades de respuesta quimiotáctica hacia componentes propios de la raíz de alfalfa como la luteolina (Caetano-Anollés *et al*, 1988b). Dado que este

plásmido pGMI42 también complementa al *Agrobacterium* para la estimulación de su adsorción a raíces por preincubación con ER de alfalfa, es concebible que la interacción de la bacteria con el factor proteico del exudado este relacionado con los mecanismos de regulación de las respuestas quimiotácticas específicas hacia la raíz de alfalfa.

Si bien los resultados aquí descritos revelan la participación de algunos genes no identificados de *R. meliloti* -previamente detectados como físicamente asociados a los genes para el proceso de nodulación- en la interacción del rizobio con la proteína del exudado de la raíz de alfalfa, son muchos los interrogantes que quedan por contestar. Por ejemplo ¿cuales de los genes de *R. meliloti* contenidos en los 290 kb del pGMI42, son los responsables de conferir al *Agrobacterium* la capacidad de ser estimulado para su adsorción a raíces por el exudado de alfalfa?, ¿qué otros genes participan en esta interacción?.

8.2. - COMPORTAMIENTO DE MUTANTES DE MOVILIDAD ALTERADA.

Como ya se dijo, una de las primeras etapas en el proceso de preinfección es el acercamiento quimiotáctico de los rizobios a la superficie radicular. Ya se ha discutido en la primera parte de esta tesis que esta propiedad de los rizobios no es imprescindible para que se lleve a cabo la nodulación pero determina una mayor competitividad de los rizobios (Ames y Bergman, 1981) y una eficiencia más alta del proceso de nodulación (Caetano-Anollés *et al*, 1988b).

En el marco de este trabajo mencionado en último término (realizado en colaboración con Caetano-Anollés y otros) se estudió el curso temporal de la adsorción específica de mutantes de movilidad y quimiotaxis de *R. meliloti* L5-30, obtenidas en este laboratorio por A. De Micheli y caracterizadas en sus propiedades de movilidad por Caetano-Anollés (Tesis Doctoral, 1985): la cepa no flagelada LP101 (Fla⁻), la cepa no móvil LP206 (Mot⁻) y la cepa no quimiotáctica LP302 (Che⁻). El comportamiento de los mutantes resultó ser muy diferente al de la cepa parental. Los valores de adsorción a las raíces a 1 hora fueron de un 10 a un 20% del valor obtenido con la cepa parental y su incremento en función del tiempo de incubación con las plantas (Figura 18) fue muy lento o nulo; en particular no se observó la

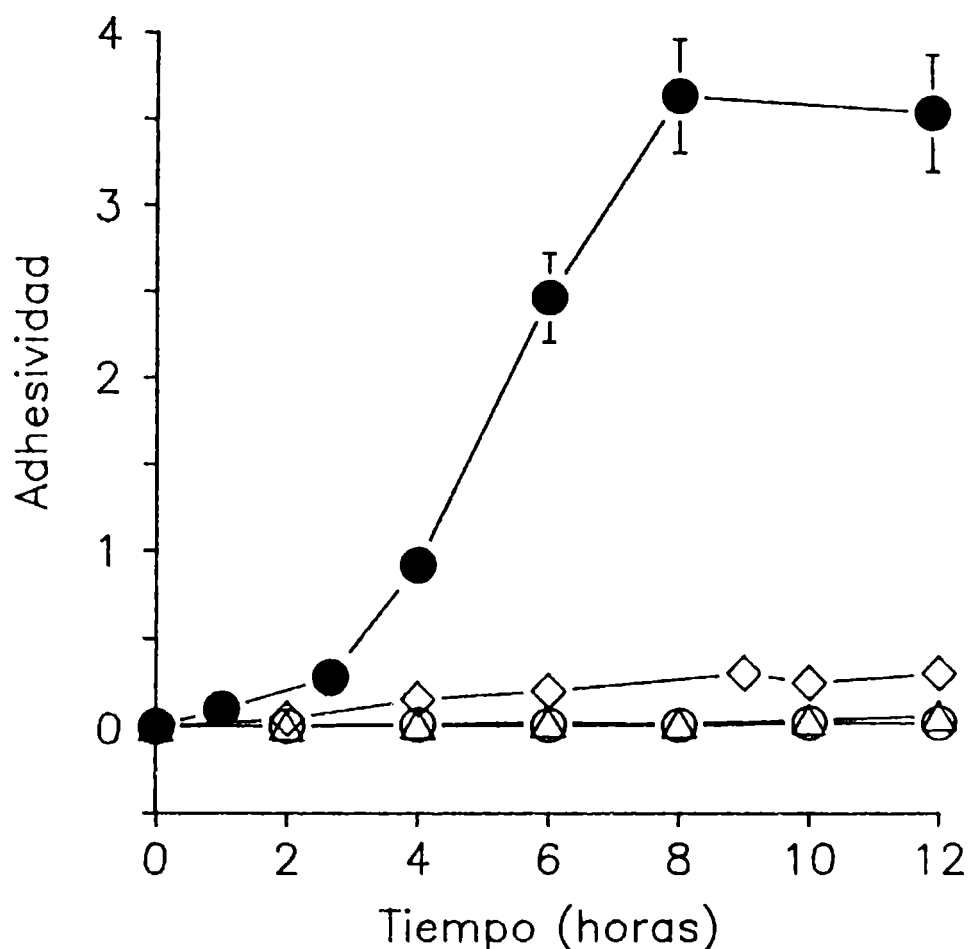


FIGURA 18: Curso temporal de la adsorción específica de mutantes con la movilidad alterada de *R. meliloti* a la superficie radicular de alfalfa.

Quince plántulas de alfalfa de 5 días se incubaron a 28°C con una agitación de 50 rpm, durante los tiempos indicados, con 22.5 ml de una suspensión de bacterias provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía diluido con medio de Fahraeus hasta una concentración de 10^3 - 10^4 células por ml para la cepa salvaje o aproximadamente 5×10^4 células por ml para los mutantes, en presencia de concentraciones saturantes de la cepa heteróloga *R. trifolii* A118 (aproximadamente 10^7 bacterias por ml). La adsorción rizobiana se expresa como adhesividad (Capítulo 2, sección 2.6.2.). (●) L5-30, cepa salvaje; (○) LP101, mutante no flagelado; (◇) LP206, mutante no móvil; (△) LP302, mutante no quimiotáctico. Las barras verticales indican intervalos de 95% de confianza, en algunos casos el tamaño de los símbolos es superior al de las barras.

diferida aceleración de la adsorción, típica de las cepas salvajes. Así, para los mutantes, no se pudo diferenciar las dos etapas ya descritas para la cepa salvaje (un primer período de latencia seguido de una etapa de franco aumento de la capacidad de adsorción que termina en un período donde el aumento del número de bacterias adsorbidas a las raíces es menor al producido por la multiplicación bacteriana en el inóculo, ver Capítulo 3).

Dada la incapacidad de estas cepas para realizar un acercamiento quimiotáctico hacia la raíz, los resultados anteriores apoyan la hipótesis ya enunciada (Capítulo 5, sección 5.1) que atribuye el período inicial de latencia observado para la cepa salvaje (al menos en parte) a la falta inicial de los gradientes de atrayentes alrededor de la superficie radicular y al tiempo necesario para la formación de los mismos, una vez sumergidas las plántulas en el medio de incubación. Estos gradientes condicionarían el posterior comportamiento de los rizobios salvajes (activamente quimiotácticos) en su proceso hacia la adsorción, pero su existencia no modificaría el comportamiento de los mutantes de movilidad incapaces de responder a la presencia de dichos gradientes.

Ante este comportamiento de los mutantes de movilidad en su proceso de adsorción a la superficie de las raíces, se planteó la pregunta si la adhesividad de estas cepas podría ser estimulada por acción del factor del ER de alfalfa.

Para ello se preincubaron las cepas con ER de alfalfa durante 3 horas (aproximadamente 3×10^4 bacterias por ml) en la forma habitual y se ensayó su posterior adsorción a las raíces de alfalfa en 1 hora. Ninguna de las tres mutantes fue estimulada por el ER de alfalfa, por el contrario manifestaron una inhibición sobre su ya baja capacidad de adsorción a las raíces (Tabla 14). En un experimento independiente, se pudo demostrar que al menos la cepa no flagelada LP101 mantiene intacta su capacidad de interactuar primariamente con el factor de exudado ya que utilizada para pretratar el ER de alfalfa fue capaz de producir la eliminación total de su actividad estimuladora (resultado no mostrado).

Estos resultados indican que las funciones de movilidad y quimiotaxis serían necesarias para la manifestación de la estimulación de la adsorción a corto tiempo (1 hora) por efecto del ER de alfalfa sobre los rizobios.

TABLA 14: Efectos de la preincubación de diferentes mutantes de movilidad de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa sobre su posterior adsorción a raíces.

Cepa (fenotipo)	A(MF) ^a	A(ER) ^b	S ^c
L5-30 (salvaje)	0.41 ± 0.05	0.75 ± 0.08	+ 82%
LP101 (Fla ⁻)	0.08 ± 0.01	0.04 ± 0.005	- 47%
LP206 (Mot ⁻)	0.06 ± 0.01	0.02 ± 0.003	- 68%
LP302 (Che ⁻)	0.07 ± 0.01	0.03 ± 0.004	- 61%
LP101R (Mot ⁺) ^d	0.65 ± 0.08	1.45 ± 0.18	+123%

Los rizobios provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía se preincubaron (aproximadamente 3×10^4 bacterias/ml para los no móviles y 5×10^3 bacterias/ml para los móviles) durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o con exudado radicular dializado de alfalfa (ER) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.).

a., b. y c. Ver notas b., c. y d. correspondientes a la Tabla 2.

d. Revertante espontáneo de la cepa LP101 (Fla⁻) seleccionado para la movilidad positiva por crecimiento en medio YEM con agar 0.3% .

Para corroborar esta última idea se buscó obtener un revertante espontáneo de la cepa no flagelada LP101 y estudiar su comportamiento en preincubaciones con ER de alfalfa.

El revertante se aisló dejando crecer una colonia de *R. meliloti* LP101 en YEM-agar 0,3% durante una semana. De este modo se esperaba detectar un posible revertante para la movilidad ya que el mismo crecería en el medio de cultivo produciendo un halo expandido a partir de la colonia condensada del mutante no flagelado. Efectivamente se obtuvieron cinco halos independientes que aparecieron a partir del cuarto día de siembra. A partir de uno de ellos se realizó un repique en medio nuevo comprobando uniformidad de colonia con características propias de la cepa parental, y confirmándose su carácter móvil en medio con agar 0,3% y por observación microscópica.

Esta nueva cepa revertante para su carácter móvil presentó en su adsorción a las raíces y en su capacidad de ser estimulada por preincubación en ER de alfalfa un comportamiento similar al de la cepa parenta *R. meliloti* L5-30 (Tabla 14).

Estos resultados constituyen un fuerte apoyo a la idea ya expresada sobre la participación de las funciones quimiotácticas en la expresión de la estimulación de la adsorción por el factor proteico del exudado radicular de alfalfa.

En un ensayo independiente (Tabla 15) se preincubó la cepa no flagelada LP101 con ER de alfalfa (2×10^4 bacterias por ml) en la forma usual, pero el posterior período de incubación final con las raíces se extendió a 4 horas. En estas condiciones la adhesividad de la cepa mutante fue estimulada en proporciones semejantes a las obtenidas con la cepa salvaje ensayada en iguales condiciones. Estos resultados indican que la movilidad y quimiotaxis rizobiana no serían funciones imprescindibles para la estimulación de la adsorción por el factor del ER.

Una interpretación simple de estos resultados sería la siguiente: el factor proteico del exudado modifica la reactividad superficial de los rizobios haciéndolos más adhesivos, pero esta adhesividad estimulada específicamente, se manifiesta sobre sitios de la raíz que el rizobio alcanza por movimientos quimiotácticos. Esta quimiotaxis aumentaría la velocidad de encuentro de las superficies reaccionantes, aspecto que se magnifica para períodos cortos de incubación de los rizobios con las plantas

TABLA 15: Efectos de la preincubación de un mutante no flagelado de *R. meliloti* L5-30 con exudado radicular dializado de alfalfa sobre su posterior adsorción a raíces, para incubaciones finales con las plantas más prolongadas.

Cepa (fenotipo)	A(MF) ^a	A(ER) ^b	S ^c
L5-30 (salvaje)	2.81 ± 0.26	4.25 ± 0.42	+ 51%
LP101 (Fla ⁻)	0.21 ± 0.02	0.31 ± 0.03	+ 47%

Los rizobios provenientes de un cultivo en fase exponencial tardía se preincubaron (L5-30: 2×10^3 bacterias/ml; LP101: 2×10^4 bacterias/ml) durante tres horas con medio de Fahraeus (MF) o con exudado radicular dializado de alfalfa (ER) (Capítulo 2, sección 2.8.2.1.).

a., b. y c. Ver notas b., c. y d. correspondientes a la Tabla 2.

En este experimento el período de incubación final de los rizobios pretratados con las plantas fue de 4 horas.

(1 hora) y que se compensa por simples encuentros al azar cuando el tiempo de incubación se hace más prolongado (4 horas) (Tabla 15).

CAPITULO 9

**PREINCUBACION DE R. meliloti L5-30 CON
AGLUTININA DE SEMILLAS DE ALFALFA. EFECTOS
SOBRE LA ADSORCION DE LOS RIZOBIOS A LAS
RAICES Y LA NODULACION DE LAS MISMAS.**

Es muy aceptada la hipótesis que sostiene la participación de proteínas producidas por la raíz, en especial las lectinas, en el proceso de reconocimiento entre los simbioses (ver Capítulo 1, sección 1.13).

Los resultados obtenidos en soja donde un factor proteico del exudado radicular capaz de estimular la infección y nodulación temprana de *B. japonicum* pudo ser reemplazado por lectina purificada de semilla (Halverson y Stacey, 1985, 1986a) sugirieron la posibilidad de encontrar una proteína de semilla de alfalfa capaz de reemplazar al factor proteico del exudado radicular de alfalfa descrito en este trabajo.

Paau y colaboradores (1981) habían obtenido de las semillas de alfalfa una proteína que presenta la propiedad de aglutinar a *Rhizobium meliloti* y no a rizobios heterólogos a la que denominaron aglutinina de alfalfa.

Como ya se ha discutido en el Capítulo 1, sección 1.13, diversos resultados ponen en tela de juicio a la reacción de aglutinación como indicador de reconocimiento específico entre *R. meliloti* las raíces de alfalfa (Seegers y La Rues, 1985; Lepek, 1989; Lepek y Marechal, 1989). Sin embargo no puede descartarse la posibilidad de algún rol biológico para esta proteína en la simbiosis, no conocido por el momento.

Algunos resultados presentados en esta tesis, sobre la interacción de un factor proteico del exudado radicular de alfalfa con *R. meliloti*, muestran similitudes con algunas propiedades descritas para la aglutinina de semilla de alfalfa. Por ejemplo: a) la capacidad de eliminación del factor del exudado por los rizobios que resultó ser constitutiva en las bacterias (Capítulo 5, sección 5.3, Figura 8) tiene un paralelo en la reactividad de los rizobios con la aglutinina de semillas, que está presente a todo lo largo del ciclo de crecimiento (Lepeck, 1989; Lepek y Marechal, 1989); b) la cepa *R. meliloti* 1028 fue incapaz de producir la eliminación del factor del exudado de alfalfa (Capítulo 8, sección 8.1, Tabla 10) y no es aglutinada por la aglutinina de semilla (Paau et al, 1981).

Con estos antecedentes se ensayó la preincubación a pH 7.0 de *R. meliloti* L5-30 con preparaciones de aglutinina de alfalfa obtenida según Paau et al (1981), utilizando diferentes concentraciones de proteína, y estudiando los efectos de esta preincubación sobre la posterior adsorción de los rizobios pretratados a las raíces de alfalfa y sobre su velocidad de

infección y nodulación. Las suspensiones bacterianas se preincubaron con la aglutinina en una concentración de 2.5×10^5 rizobios / ml, a 28°C con una agitación rotatoria de 50 rpm. Para la elección de las concentraciones de aglutinina utilizadas se tomó como límite superior la máxima relación de proteína/bacterias que no alcanzaba a producir aglutinación a pH 4.0 ($100 \mu\text{g}/10^9$ bacterias/ml), aproximadamente 10 ng/ml, que se diluyó en forma seriada con un factor 1:100 en el medio de Fahraeus utilizado para la preincubación de los rizobios. A partir de la suspensión de rizobios preincubados se realizaron dos tipos de experimentos: 1) con ellos se inocularon plántulas de alfalfa de 5 días convenientemente acondicionadas sobre papel en bolsas de polietileno (Bhuvanewari *et al*, 1980) con 5×10^4 rizobios por planta, para examinar la distribución sobre las raíces de los nódulos resultantes; 2) por otra parte los rizobios preincubados se diluyeron de inmediato (aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml) para ensayar, con el procedimiento estándar (Capítulo 2, sección 2.6.1.), su adsorción a raíces de alfalfa.

La preincubación de 5×10^5 rizobios con la preparación de aglutinina de alfalfa, produjo un aumento significativo en la adsorción posterior de estos rizobios a las raíces de alfalfa comparado con rizobios preincubados en medio mineral (Tabla 16). Esta estimulación es tanto más significativa si se considera la extraordinaria dilución de la proteína presenta : sólo 10 fg/ 5×10^5 bacterias/ml.

En forma similar se observó un estímulo de la nodulación temprana, caracterizado por un corrimiento de la posición promedio del primer nódulo hacia zonas superiores de la raíz y un aumento en el número de nódulos por planta formados arriba de la marca RT, diferencias que resultaron significativas en un test *t*, con un nivel $P < 0.025$ (Tabla 16). También pudo observarse el aumento en la velocidad de infección por un corrimiento del perfil de nodulación hacia zonas superiores de la raíz (Figura 19). Concentraciones 100 veces mayores o menores no produjeron ningún efecto respecto del comportamiento de los rizobios preincubados en solución mineral. En algunos parámetros como la posición promedio del primer nódulo, se observó un efecto inhibitorio para concentraciones superiores de aglutinina.

TABLA 16: Efecto de la preincubación de *R. meliloti* L5-30 con aglutinina de semillas de alfalfa sobre su posterior adsorción a las raíces y sobre la formación de nódulos precoces.

Medio de preincubación	A	Posición (mm) del primer nódulo respecto a RT \pm ETM	n ^o de nódulos arriba de la marca RT \pm ETM	n ^o de nódulos por planta \pm ETM	n ^o de plantas
Medio de Fahraeus	0.61 \pm 0.08	-1.26 \pm 0.65 a	0.41 \pm 0.12 a	1.86 \pm 0.22 a	44
Aglutinina	1.15 \pm 0.12	+0.94 \pm 0.82 b	0.89 \pm 0.21 b	2.34 \pm 0.27 a	38
Aglutinina calentada	0.73 \pm 0.09	-0.10 \pm 0.91	0.53 \pm 0.17	1.83 \pm 0.26	36
Aglutinina tripsinizada	0.79 \pm 0.09	-1.16 \pm 0.80	0.49 \pm 0.15	2.09 \pm 0.26	35
Aglutinina + tripsina inhibida	1.80 \pm 0.19	+0.10 \pm 0.96	0.79 \pm 0.27	2.28 \pm 0.31	29

Un cultivo de *R. meliloti* L5-30 en fase exponencial tardía en medio YEM se diluyó hasta aproximadamente 2.5×10^5 bacterias por ml con medio de Fahraeus. La aglutinina de semillas de alfalfa se agregó en una concentración final de 70 fg por ml de proteína. El calentamiento de la aglutinina diluida fue a 100 °C durante 30 minutos previo al agregado de los rizobios. El tratamiento con tripsina se realizó sobre la aglutinina diluida según se explica en el Capítulo 2, sección 2.10.2. Los rizobios se preincubaron durante tres horas (baño rotatorio 50 rpm, 28°C). Finalizado este período, de cada mezcla de preincubación se diluyó una alícuota con medio de Fahraeus hasta aproximadamente 5×10^3 bacterias por ml para ensayar la adsorción de los rizobios a las raíces de alfalfa (Capítulo 2, sección 2.6.1.). Por otra parte, a partir de las diferentes mezclas de preincubación se inocularon 5×10^4 rizobios por planta de alfalfa de 5 días, para analizar la nodulación según el método de Bhuvanewari y Bauer (1980) (Capítulo 2, sección 2.7.). Las plantas estaban dispuestas sobre una hoja de papel absorbente dentro de una bolsa de polietileno (5 plantas por bolsa) de modo que se pudo marcar la posición del ápice radicular al momento de la inoculación (marca RT) y el comienzo de la zona de pelos emergentes (marca ERH), quedando determinada para cada raíz la unidad de distancia radicular (UR). 10 a 15 días después de la inoculación se analizó la nodulación determinando la posición de los nódulos de las raíces respecto a la marca RT. Las distancias se dan en mm. Valores positivos indican posiciones por encima de la marca RT (hacia la parte aérea de la planta). La unidad de distancia radicular promedio para la población de plantas fue de 3.6 mm. La velocidad de crecimiento de las raíces fue de 0.5 mm por hora. Valores con diferentes letras indican diferencias significativas: Test-t, $P < 0.025$.

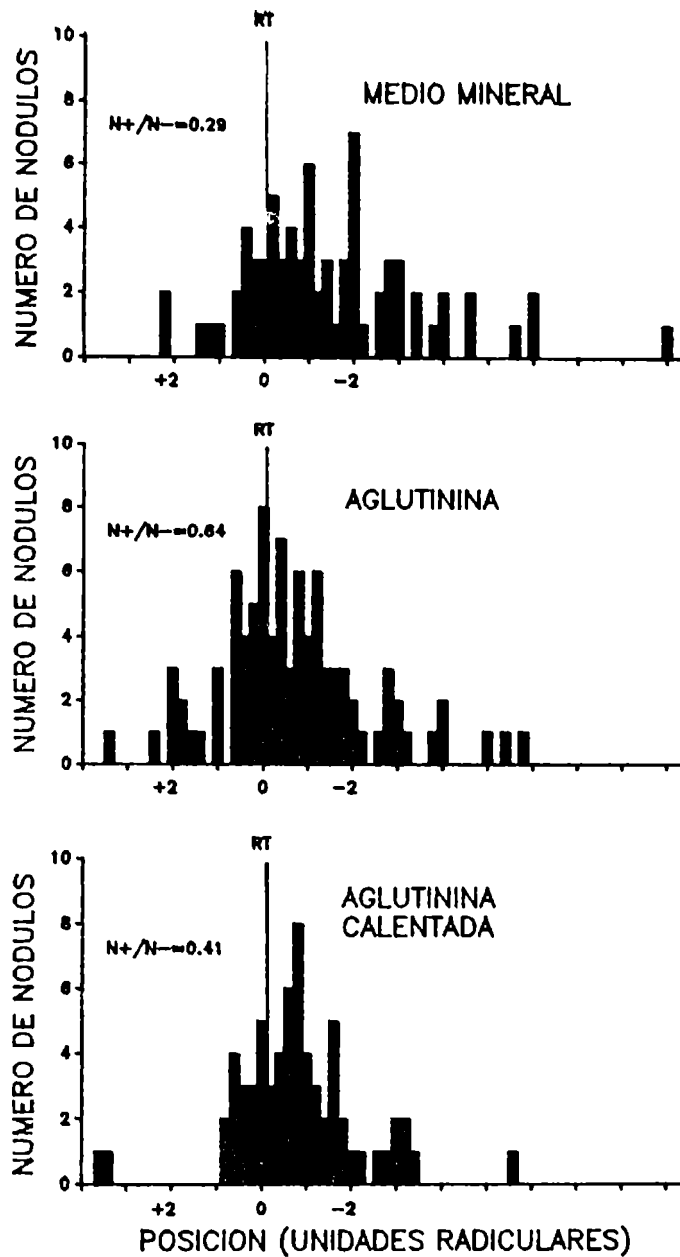


FIGURA 19: Perfiles de nodulación de raíces de alfalfa inoculadas con *R. meliloti* L5-30: efectos de la preincubación de los rizobios con aglutinina de semillas de alfalfa.

Los resultados corresponden al experimento descrito en la Tabla 16, ver nota respectiva. RT marca la posición del ápice radicular en el momento de la inoculación. Una unidad radicular se define como la distancia entre el ápice radicular y los primeros pelos radiculares emergentes de cada raíz. Distancias positivas desde RT están orientadas en el sentido creciente hacia la parte aérea de la planta, e indican zonas de la raíz existentes al momento de la inoculación. Entre paréntesis se indica el valor de la relación N^0 de nódulos arriba de RT / N^0 de nódulos debajo de RT, correspondiente a cada perfil de nodulación.

La actividad estimuladora de la preparación de la aglutinina de alfalfa fue destruída por calentamiento a 100°C durante 30 minutos una vez diluída a la concentración utilizada en el ensayo (Tabla 16). El mismo efecto produjo el pretratamiento de la aglutinina con tripsina (con la adecuada inhibición posterior de la actividad de tripsina para evitar su actividad de proteasa durante la preincubación de los rizobios y los posteriores ensayos de adsorción y nodulación) (Tabla 16). Estas características resultan idénticas a las que presenta el factor proteico del exudado radicular de alfalfa (ver Capítulo 6, secciones 6.1.2 y 6.1.3).

El análisis de la aglutinina por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS y posterior tinción con Ag, reveló la presencia de tres componentes, con una banda mayoritaria de 13.4 kDa (Figura 20), valor que coincide con el reportado para la aglutinina de semilla por diferentes autores (Paau *et al*, 1981; Seegers y La Rue, 1985; Lepeck, Tesis Doctoral, 1989).

Un análisis del espectro UV de la aglutinina indicó una contaminación con ácidos nucleicos menor al 5% en la preparación.

La aglutinación de *R. meliloti* por la aglutinina de semillas de alfalfa fue detalladamente estudiada por Viviana Lepek (Lepek, 1989). Esta autora arribó a la conclusión que el fenómeno de aglutinación es inespecífico y que consistiría principalmente en un fenómeno de interacciones electrostáticas, donde el pI de la proteína aglutinante ensayada debe ser superior a 4, pH correspondiente al ensayo de aglutinación. Es así que se encontró que la albúmina bovina fue capaz de producir la aglutinación de una suspensión de *R. meliloti* en forma similar a la proteína obtenida de semillas de alfalfa, a pH 4.0. Debe remarcarse que la dependencia con el pH de la reacción de aglutinación de *R. meliloti* por diferentes proteínas mostró que no se obtiene aglutinación por la aglutinina de alfalfa ni por la albúmina bovina a pH 7.0 (Lepek, 1989; Lepek y Marechal, 1989), pH utilizado en las preincubaciones de los rizobios aquí discutidas.

Teniendo en cuenta estos antecedentes se ensayó como control inespecífico la preincubación de *R. meliloti* L5-30 con seroalbumina bovina en una concentración proteica igual a la utilizada para la preparación de aglutinina de semilla, a pH 7.0. La preincubación con albúmina no produjo

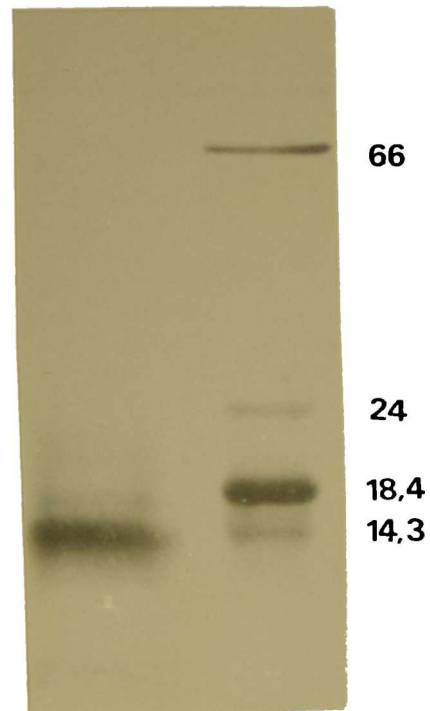


FIGURA 20: Análisis de la preparación de aglutinina de semillas de alfalfa por electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS.

La calle de la izquierda corresponde a la muestra de aglutinina de semillas de alfalfa; en la calle de la derecha se indican los tamaños moleculares correspondientes a sustancias patrones (kDa).

estímulos en la adsorción rizobiana, siendo los resultados similares a los del control preincubado en medio de Fahraeus: $A(MF) = 0.48 \pm 0.08$; $A(\text{aglutinina}) = 0.84 \pm 0.13$; $A(\text{albúmina}) = 0.52 \pm 0.07$.

Las proporciones relativas de proteína a rizobios para observar el fenómeno de aglutinación fueron del orden de 3×10^6 ng/ 10^4 bacterias; en cambio fue suficiente una proporción 2×10^6 veces menor, 1.5 fg/ 10^4 bacterias, para observar los fenómenos de estimulación de la adsorción y de la nodulación. Suponiendo un peso molecular de 15000Da y teniendo en cuenta esta baja proporción 1.5 fg/ 10^4 bacterias/ml, se obtiene un valor de 6 moléculas por bacteria necesario para la manifestación de esta segunda interacción. Este valor resulta ser del mismo orden que el obtenido por Halverson y Stacey (1986) en el estudio de la interacción de *B. japonicum* con la lectina de soja, que produce un estímulo en la velocidad de nodulación temprana.

Estas observaciones sugieren fuertemente que la estimulación de la adsorción y nodulación, y la aglutinación, serían fenómenos que probablemente involucren diferentes receptores en los rizobios.

Los resultados experimentales aquí presentados señalan que una proteína de semilla de alfalfa es capaz de actuar sobre *R. meliloti* estimulando funciones rizobianas que determinan una mayor capacidad de adsorción de los rizobios a las raíces y una mayor velocidad de infección y nodulación de las mismas. Esta proteína podría cumplir un rol muy importante en la esfermosfera durante el proceso de colonización de la radícula emergente, que quizás resulte determinante en la colonización final de la raíz de la planta (Lynch, 1983).

Es probable que la proteína del exudado radicular que estimula las mismas funciones en los rizobios, resulte ser una forma radicular de la proteína obtenida de semilla, ya que además de los resultados presentados en esta sección, apoyan también esta hipótesis el resultado del análisis por electroforesis de una muestra concentrada por liofilización del exudado radicular de alfalfa, que reveló la presencia de una banda con un peso molecular correspondiente de 15 kDa (ver Capítulo 6, sección 6.1.4), valor muy cercano al de 13.4 kDa obtenido en forma independiente para la aglutinina de semilla de alfalfa.

CUARTA PARTE

CAPITULO 10
CONCLUSIONES FINALES.

En esta sección se analizan los resultados presentados en los capítulos anteriores, en el marco del estado actual de conocimientos acerca de la fisiología y biología molecular de las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa presentado en el Capítulo 1. Finalmente se propone un modelo de interacciones entre los rizobios y las raíces de leguminosas para las etapas tempranas de la preinfección, en el que se da cabida a la interacción rizobio-proteína del exudado radicular descrita en esta tesis.

Estudios previos a este trabajo han demostrado que la especificidad de la asociación simbiótica entre *Rhizobium meliloti* y las raíces de alfalfa ya se expresa en el temprano proceso de adsorción de los rizobios a la superficie radicular (Caetano-Anollés, 1985).

Estos resultados implican la existencia de interacciones moleculares muy tempranas que determinan mecanismos de reconocimiento entre los simbioses. Estos eventos de reconocimiento a través del intercambio de señales determinarían a su vez que la asociación avance en el camino simbiótico hasta el desarrollo final del nódulo fijador de nitrógeno (Bauer, 1981; Halverson y Stacey, 1986; ver Capítulo 1).

En el sistema *R. meliloti*-alfalfa, estudiado en este trabajo, la complejidad de las interacciones tempranas fue sugerida por el retardo inicial observado en el curso temporal de la adsorción de los rizobios a las raíces. Este retardo fue interpretado como un acondicionamiento de uno o ambos simbioses para el proceso de adsorción (Capítulo 3), y esta interpretación constituyó una hipótesis de trabajo inicial.

Los primeros intentos de acondicionamiento de los simbioses para el proceso de adsorción se realizaron por preincubación de los mismos en medio mineral. Estos estudios evidenciaron por una parte la participación de componentes estructurales frágiles de los rizobios (¿flagelos?, ¿fimbrias?) en dicho proceso, afectados por el simple tratamiento de centrifugación y resuspensión de las bacterias -aún en el mismo medio sobrenadante-, y por otra parte señalaron la probable participación del exudado radicular en el proceso de adsorción, sugiriendo que el hipotético acondicionamiento requeriría de la interacción de ambos simbioses, o de componentes de los mismos (Capítulo 4).

El posterior estudio de la preincubación de *R. meliloti* con el exudado radicular de alfalfa reveló la existencia de una interacción capaz

de modificar el posterior comportamiento de los rizobios, aumentando su adsorción a la superficie radicular (Capítulo 5). De esta manera se demostró que: 1) El exudado radicular se encuentra involucrado en el proceso de adsorción, estimulando la capacidad de adsorción de los rizobios; 2) Esta estimulación de la adhesividad rizobiana resulta de una interacción muy temprana en la rizosfera entre el exudado radicular y los rizobios aún en vida libre, previa el contacto de las superficies.

Esta interacción exudado radicular de alfalfa - *Rhizobium meliloti* (estudiada con exudado radicular dializado), estimulante de la adhesividad rizobiana presentó las siguientes características:

- 1) Requiere tiempo (horas), (Capítulo 5).
- 2) Ocurre en un medio homogéneo, isotrópico, en ausencia de gradientes, (Capítulo 5).
- 3) No requiere la presencia física de las raíces y parece ser independiente de la naturaleza de la superficie radicular donde se desarrolla el posterior proceso de adsorción, (Capítulo 5 y 7).
- 4) Las sustancias de bajo peso molecular presentes en el exudado radicular parecen ser no necesarias (nutrientes inespecíficos, quimioattractantes y sustancias reguladoras de la expresión de los genes *nod*, todos los cuales habrían sido mayormente eliminados por el procedimiento de diálisis) (Capítulo 5 y 6).
- 5) Depende del estado de crecimiento de los rizobios, que deben ser utilizados en una estrecha ventana temporal alrededor de la etapa exponencial tardía de crecimiento (Capítulo 5).
- 6) Además de la estimulación en la adsorción rizobiana a las raíces, se pudo observar un estímulo en la nodulación temprana de la raíz por los rizobios pretratados con el factor termolábil del exudado radicular (Capítulo 5).
- 7) La interacción requiere al menos un factor proteico termolábil, componente del exudado radicular (Capítulo 6).
- 8) La actividad estimuladora se encuentra sujeta a regulación negativa por el estado nutricio nitrogenado de la planta (Capítulo 6).
- 9) Refleja la selectividad simbiótica, tanto en alfalfa como en trébol (Capítulo 7).

10) La aglutinina de semillas de alfalfa produce en *R. meliloti* efectos semejantes a los del factor de exudado de raíz: estimulación de la adsorción a raíces, y estímulo de la nodulación precoz (Capítulo 9). Estas similitudes sugieren que la aglutinina y el factor de exudado están relacionados.

En este sistema *R. meliloti*-alfalfa, resultan notorias las coincidencias entre la estimulación de la adsorción rizobiana por el exudado radicular (este trabajo), el modo de adsorción específica (Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b) y el proceso global de nodulación: a) todas se suprimen por rizobios solamente homólogos (Capítulo 5 y 7; Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b; Favelukes y Caetano-Anollés, 1985), b) todas resultan dependientes del estado nutricional nitrogenado de las plantas (Capítulo 6; Caetano-Anollés, 1985; Streeter, 1988), c) todas varían también con el estado fisiológico de los rizobios (etapa de crecimiento del cultivo) (Capítulo 5; Caetano-Anollés, 1985; Bhuvaneshwari *et al*, 1983), d) la movilidad y quimiotaxis de los rizobios determinan también el éxito de estos procesos: la estimulación de la adhesividad rizobiana por el exudado radicular para incubaciones cortas con las plantas (1 hora) (Capítulo 8), un óptimo nivel de adhesividad total y específica (Caetano Anollés *et al*, 1988), una mayor eficiencia de nodulación (Caetano Anollés *et al*, 1988) y ventajas competitivas para la nodulación (Ames y Bergman, 1981). Estas coincidencias sugieren un modelo de interacciones tempranas donde el modo de adsorción específica (Caetano Anollés y Favelukes, 1986b) sería consecuencia de una previa interacción específica de los rizobios, aún en vida libre, con un factor proteico del exudado radicular de alfalfa. De este modo, dentro de la etapa de preinfección, ambos eventos adquieren la categoría de precursores de la infección y desarrollo del nódulo fijador de nitrógeno. Esta hipótesis se apoya en los resultados de estimulación de la nodulación temprana por pretratamiento de los rizobios con un factor termolábil del exudado de alfalfa (Capítulo 5). Por otra parte, también resultan consistentes con esta hipótesis los resultados experimentales obtenidos con la cepa mutante 1028, no nodulante, incapaz de interaccionar primariamente con el factor del exudado (Capítulo 8), cuyo comportamiento en la competición por la adsorción específica de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa y su nodulación, habían dado origen a una propuesta que sostenía a

la adsorción específica en este sistema como un precursor obligado en el camino hacia la nodulación (Favelukes y Caetano-Anollés, 1985).

La interacción encontrada presenta características propias de una interacción primaria y espontánea entre los organismos que van a asociarse en forma simbiótica ya que ocurre sin la necesidad de un previo contacto entre los mismos. Ambos organismos, la planta y el microsimbionte poseen la necesaria información genética, que a su vez es debidamente expresada en vida libre, para permitir el desarrollo de esta interacción entre el factor proteico del exudado radicular y los rizobios. A partir de esta interacción primaria deviene un cambio en el comportamiento del rizobio que comienza su asociación con la raíz reconocida. Este comportamiento fue encontrado y estudiado en alfalfa (esta tesis) y detectado también en trébol (Capítulo 7) y en poroto (Lodeiro y Favelukes, comunicación personal), pudiendo quizás tratarse de un evento general en las asociaciones simbióticas rizobio-leguminosa.

Una situación similar de interacción primaria se encuentra en la inducción de los genes *nod* del rizobio por acción de sustancias flavonoideas exudadas por la semilla o la raíz que interactúan primariamente con el producto de los genes *nodD*, de expresión constitutiva en el rizobio (Capítulo 1).

Este otro enfoque de estudio de las simbiosis rizobio-leguminosa a través de la genética del rizobio, ha resultado exitoso en la dilucidación de al menos dos mecanismos de reconocimiento por intercambio de señales: la interacción específica tripartita del producto del gen *nodD* y promotores *nod* restantes con el conjunto de sustancias flavonoideas exudadas por la raíz, y como consecuencia de esta primera interacción, a partir de la inducción de los otros genes *nod*, la síntesis de sustancias que actúan como señales específicas para la planta huésped que a su turno son determinantes de eventos posteriores conducentes a la infección de la raíz a través de los pelos radiculares (Capítulo 1).

Estos eventos de reconocimiento a través del conjunto de flavonoides de la planta y los genes *nod* podría ocurrir en forma paralela y contemporánea a la interacción del rizobio con el factor proteico de la planta. Los resultados experimentales existentes hasta el momento no permiten determinar una clara independencia, o por el contrario una relación

causal o temporal, entre estos dos eventos de reconocimiento temprano (ver más adelante). Es remarcable la existencia de estos dos circuitos de reconocimiento, que en caso de funcionar inicialmente en forma paralela, resultan finalmente concurrentes en el desarrollo de los cambios citológicos propios de la infección y el desarrollo del nódulo.

La complejidad del proceso de estimulación de la adsorción por el factor proteico del exudado radicular quedó sugerida también por el comportamiento de diferentes mutantes de *R. meliloti* (Capítulo 8). Con estos estudios de caracterización, se revelaron requerimientos genéticos en el rizobio que implican la existencia de al menos dos etapas en la interacción con el factor de exudado en el proceso de estimulación de la adsorción: una primera etapa, o interacción inicial, donde se evidenció la participación de genes cromosomales (alterados en la cepa 1028), que determina la posterior eliminación por los rizobios de la actividad estimuladora de la solución. Por otra parte, evidencias indirectas que se obtuvieron sobre la necesidad de algunos genes *nod* del plásmido Syma (o asociados a ellos), indicaron la existencia de una subsiguiente etapa, el posterior proceso de desarrollo del estímulo de la adsorción en que dichos genes participarían.

Finalmente, teniendo en cuenta lo expuesto hasta el momento (resultados de otros estudios sobre la simbiosis rizobio-leguminosa existentes en la bibliografía -Capítulo 1- y resultados de este trabajo -Capítulos 3 a 9-) se puede establecer como hipótesis de trabajo para futuros estudios sobre la etapa de preinfección en la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno *Rhizobium meliloti*-alfalfa, el siguiente modelo de interacciones tempranas entre los simbiosis:

Los rizobios son atraídos inicialmente hacia la raíz en la rizosfera por sustancias de bajo peso molecular exudadas por la raíz, algunas inespecíficas y otras específicas, dentro de las cuales la quimiotaxis hacia las flavonas y compuestos relacionados implicaría ya la participación de los genes *nod*. En la rizosfera y con los rizobios aún en vida libre ocurriría un evento de reconocimiento basado en una compleja interacción de los rizobios con un factor proteico del exudado radicular. Como consecuencia de una interacción inicial específica (recepción de la señal) se estimularían funciones del rizobio (¿aumento de reactividad superficial de los rizobios?, ¿nuevas respuestas quimiotácticas

específicas?, ¿síntesis de nuevas señales que actúen sobre la raíz modificando la reactividad superficial de la misma?) que determinan una mayor adsorción de los mismos a la superficie radicular (transducción de la señal). La manifestación de este estímulo de la adhesividad de los rizobios se facilitaría por las propiedades de movilidad y quimiotaxis rizobiana. En el proceso de adsorción superficial participarían los lipopolisacáridos del rizobio como otro factor determinante de la especificidad simbiótica. Con la estimulación específica de la adsorción, quizás se aumente la localización rizobiana en las células blanco infectables de la raíz, donde ocurrirían nuevas etapas de reconocimiento. Así, quizás en forma paralela a estos eventos, y debido a la inducción de los genes *nod* por acción de las sustancias flavonoideas exudadas por la raíz, se generarían respuestas bacterianas que determinan la producción de nuevas señales para la planta, involucradas éstas en la inducción de los cambios citológicos de la raíz necesarios para que se desarrolle el proceso de infección y nodulación. En estas etapas avanzadas de la asociación, los componentes superficiales de los rizobios (exopolisacáridos y lipopolisacáridos) desempeñarían funciones de reconocimiento entre los simbioses tendientes a evitar la inducción de mecanismos de defensa en la planta que pudiesen producir el rechazo de la infección.

Como parte de este modelo de interacciones tempranas, el poder discriminatorio del factor proteico del exudado radicular (descrito en esta tesis) a favor de los rizobios homólogos y en contra de los rizobios heterólogos aparece como un importante paso de reconocimiento en la asociación. Así, haciendo selectivo un estímulo para la adsorción a la superficie radicular, la planta prevendría, en cierta forma, la ocupación de la misma y de sus sitios blanco por microorganismos heterólogos, y facilitaría su colonización por el microsimbionte infectivo, que de ese modo continúa su asociación con la raíz sin la interferencia de otros microorganismos presentes en la rizosfera.

Desde las primeras hipótesis sobre los mecanismos de reconocimiento entre los rizobios y las leguminosas (Albersheim y Anderson Prouty, 1975) y los primeros modelos de intercambio de señales (Bauer, 1981), son varios los eventos moleculares que han sido reconocidos como ejemplos de esas ideas, y que constituyen piezas del modelo más arriba

propuesto. Fue el propósito de esta tesis aportar una pieza más a ese rompecabezas que constituye la asociación simbiótica fijadora de nitrógeno entre rizobios y raíces de leguminosas y de ese modo contribuir a la articulación del paradigma de la especificidad simbiótica en estos sistemas biológicos.

APENDICE

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE LAS CONCENTRACIONES DE BACTERIAS UTILIZADAS EN LOS ESTUDIOS DE INTERACCION *Rhizobium*-LEGUMINOSAS.

Como ya se ha mencionado anteriormente, los fenómenos de especificidad entre los simbioses serían consecuencia de un reconocimiento entre algunas moléculas producidas por ambas partes, a través de un encaje estereoquímico. Estos fenómenos en general involucran la participación de macromoléculas y se caracterizan por presentar el fenómeno de saturación. Por lo tanto las concentraciones de esas macromoléculas, y los números de bacterias que las poseen, utilizados en los estudios de interacciones rizobio-leguminosa son aspectos importantes de esa cuestión general que deben ser objeto de consideración cuidadosa.

Una condición experimental frecuentemente encontrada en la bibliografía es el uso de una alta concentración del inóculo rizobiano (del orden de las 10^8 bacterias por ml), apropiada para la observación directa al microscopio óptico de bacterias unidas a las raíces (Dazzo et al, 1976; Stacey et al, 1980; Smit et al, 1986). Este enfoque experimental tiene la importante ventaja de permitir la localización bacteriana en relación a sitios anatómicos particulares de la raíz, como los pelos radiculares. Sin embargo una alta concentración en el inóculo, además de ser no fisiológica ya que en el suelo no se encuentran concentraciones superiores a 10^5 bacterias por gramo e incluso en la rizosfera la concentración no supera las 10^6 bacterias por gramo, puede enmascarar cualquier efecto específico en la interacción del rizobio con la raíz. En el caso de la adsorción específica de *R. meliloti* a las raíces de alfalfa, ésta se pudo revelar solamente utilizando bajas concentraciones de bacterias en el inóculo (10^3 rizobios por ml)(Caetano-Anollés y Favelukes, 1986b). Una dependencia similar con las bajas concentraciones de rizobios en el inóculo se encuentra en algunos pocos otros estudios sobre fenómenos tempranos de la simbiosis: la estimulación de la nodulación temprana de raíces de soja se pudo poner de manifiesto con la cepa salvaje *B. japonicum* 110 sólo cuando se preincubaron con altas diluciones de la lectina de soja ($10 \mu\text{g}$ por ml/ 4×10^7 bacterias por ml) y se inoculó apenas 10^4 bacterias por planta (Halverson y Stacey, 1986); en otro trabajo la nodulación de raíces de alfalfa en hidroponia resultó máxima cuando la concentración del inóculo de *R. meliloti* alcanzó 10^3

rizobios por ml (Olivares *et al*, 1980); la adhesión específica de *R. trifolii* a los pelos radiculares de trébol se observó sólo cuando se utilizaron relativamente bajas concentraciones de rizobios en el inóculo (10^5 - 10^6 bacterias por planta) (Dazzo *et al*, 1984).

En las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo de tesis, la proteína activa del ER de alfalfa resultó ser un factor limitante en la interacción con *R. meliloti* (Capítulo 5, sección 5.1.). De hecho, las proteínas contenidas en las preparaciones de ER resultaron encontrarse muy diluídas, aún por debajo de los límites de detección de los procedimientos analíticos comunes (ver sección 6.1.3.). Los resultados de la Figura 6 (Capítulo 5, sección 5.2.) muestran que 5×10^5 bacterias de *R. meliloti* L5-30 son suficientes para eliminar completamente la actividad estimuladora del ER de alfalfa. Por lo tanto el uso de concentraciones más altas de rizobios podría implicar que sólo una fracción de la población rizobiana resulte sujeta a la estimulación por el factor activo del ER, mientras que una gran mayoría de rizobios no interactuarían con dicho factor. Sin embargo estas bacterias podrían adsorberse posteriormente la superficie radicular en modos no específicos, en números que excedería al número limitado de rizobios unidos provenientes de la fracción estimulada, que de ese modo quedarían enmascarados por la otra parte de la población rizobiana. Esta condición experimental supone que no se produzcan fenómenos de saturación de la adsorción rizobiana a la superficie radicular aún para altos números de bacterias. Esta suposición se cumple al menos en el caso de adsorción de *B. japonicum* a raíces de soja (Pueppke, 1984). De los datos de la Figura 6 pueden estimarse también que la cantidad de factor obtenido en el ER de una raíz luego de tres días de crecimiento de la planta en hidroponia es equivalente a una capacidad de eliminación del factor del ER de aproximadamente 10^6 *R. meliloti* L5-30. Si se asume que la cantidad de moléculas del factor activo del ER eliminadas por un sólo rizobio refleja sus propios requerimientos de factor para ser estimulado en su adsorción a raíces, entonces el número de rizobios que puede ser estimulado por el exudado radicular de una raíz debería ser de ese orden y no mayor. Esto indica un límite al que deben acomodarse los números de bacterias en experimentos de interacción rizobios-raíces si se quiere poner en evidencia fenómenos de especificidad como el aquí descrito; inóculos con

concentraciones superiores tenderían a enmascarar estos efectos a través de efectos concurrentes no específicos.

BIBLIOGRAFIA

- Adler, M. T., A. T. De Micheli, D. A. Sorgentini y G. Favelukes. 1984. "Interaction between Rhizobium meliloti and alfalfa agglutinin." En "Advances in Nitrogen Fixation Research", editors C. Veeger y W. E. Newton. p.408. The Hague: Nijhoff-Junk-Pudoc.
- Aguilar, O. M. 1989. "Los genes de nodulación comunes no son inducidos por luteolina en mutantes nod/Ilv de R. meliloti." XXV SAIB, Buenos Aires, 22-24 octubre, mostración 249.
- Albersheim, P. y A. J. Anderson-Prouty. 1975. "Carbohydrates, proteins, cell surfaces, and the biochemistry of pathogenesis." Ann. Rev. Plant Physiol. 26:31-52.
- All-Mallah, M. K., M. R. Davey y E. C. Cocking. 1987. "Enzymatic treatment of clover root hairs removes a barrier to Rhizobium-host specificity." Biotechnology 5:1319-1322.
- Ames, P. y K. Bergman. 1981. "Competitive advantage provided by bacterial motility in the formation of nodules by Rhizobium meliloti." J. Bacteriol. 148:728-729.
- Badenoch-Jones, J., D. J. Flanders y B. G. Rolfe. 1985. "Association of Rhizobium strains with roots of trifolium repens." Appl. Environ. Microbiol. 49:1511-1520.
- Bakhuizen, R., P. C. van Spronsen, C. L. Diaz y J. W. Kijne. 1988. "Crossing of pea root cortical cell walls by a growing infection thread, induced by Rhizobium leguminosarum." En "Nitrogen Fixation: Hundred Years After", editors H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. p.449. Stuggart. New York: Gustav Fisher.
- Banfalvi, Z., E. Kondorosi y K. Kondorosi. 1985. "Rhizobium meliloti carries two megaplasmids." Plasmid 13:129-138.
- Barondes, S. H. 1988. "Bifunctional properties of lectins: lectins redefined." Trends Biochem. Sci. 13:480-482.
- Bauer, W. D. 1981. "Infection of legumes by rhizobia." Ann. Rev. Plant Physiol. 32:407-449.
- Bender, G. L., W. Goydych, B. G. Rolfe y M. Nayudu. 1987. "The role of Rhizobium conserved and host specific nodulation genes in the infection of the non -legume Parasponia andersonii." Mol. Gen. Genet. 210:299-306.
- Bergman, K., M. Gulash-Hoffee, R. E. Hovestadt, R. C. Larosiliere, P. G. Ronco II y L. Su. 1988. "Physiology of behavioral mutants in Rhizobium meliloti: evidence for a dual chemotaxis pathway." J. Bacteriol. 170:3249-3254.
- Bhagwat, A. A. y J. Thomas. 1982. "Legume-Rhizobium interactions: Cowpea root exudate elicits faster nodulation response by Rhizobium species." Appl. Environ. Microbiol. 43:800-805.
- Bhagwat, A. A. y J. Thomas. 1983. "Legume-Rhizobium interactions: role of cowpea root exudate in polysaccharide synthesis and infectivity of Rhizobium species." Arch. Microbiol. 136:102-105.
- Bhuvanewari, T. V., S. G. Pueppke y W. D. Bauer. 1977. "Role of lectins in plant-microorganism interactions." Plant Physiol. 60:486-491.

- Bhuvanewari, T. V. y W. D. Bauer. 1978. "Role of lectins in plant-microorganism interactions. III. Influence of rhizosphere/rhizoplane culture conditions on the soybean lectin-binding properties of rhizobia." *Plant Physiol.* 62:71-74.
- Bhuvanewari, T. V., B. G. Turgeon y W. D. Bauer. 1980. "Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum*. I. Localization of infectible root cells." *Plant Physiol.* 66:1027-1031.
- Bhuvanewari, T. V., Bhagwat A. A. y W. D. Bauer. 1981. "Transient susceptibility of root cells in four common legumes to nodulation by rhizobia." *Plant Physiol.* 68:1144-1149.
- Bhuvanewari, T. V., K. K. Mills, D. K. Crist, W. R. Evans y W. D. Bauer. 1983. "Effect of culture age on symbiotic infectivity of *Rhizobium japonicum*." *J. Bacteriol.* 153:527-531.
- Bhuvanewari, T. V. y B. Solheim. 1985. "Root Hair deformation in the white clover/*Rhizobium trifolii* symbiosis." *Physiol. Plant.* 63:25-34.
- Bohlool, B. B. y E. L. Schmidt. 1974. "Lectins: a possible basis for specificity in the *Rhizobium*-legume root nodule symbiosis." *Science* 185:269-271.
- Bowen, G. D. 1982. "The root-microorganism ecosystem." En "Biological and chemical interactions in the rhizosphere", editor Ecological research committee of NFR. pp.3-42. Sweden: Swedish National Science Resesarch Counsil.
- Bowra, B. J. y M. J. Dilworth. 1981. "Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*." *J. Gen. Microbiol.* 126:231-235.
- Buikema, W. J., S. R. Long, S. E. Brown, R. C. van den Bos, C. Earl y F. M. Ausubel. 1983. *J. Mol. Appl. Gen.* 2:249-260.
- Burg, D., J. Guillaume y R. Tailliez. 1982. "Chemotaxis by *Rhizobium meliloti*." *Arch. Microbiol.* 133:162-163.
- Caetano-Anollés, G. 1985. "La asociación simbiótica de rizobios y leguminosas". Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Caetano-Anollés, G. y G. Favelukes. 1986a. "Host-symbiont specificity expressed during early adsorption of *Rhizobium meliloti* to the root surface of alfalfa." *Appl. Environ. Microbiol.* 52:377-382.
- Caetano-Anollés, G. y G. Favelukes. 1986b. "Quantitation of adsorption of rhizobia in low numbers to small legume roots." *Appl. Environ. Microbiol.* 52:371-376.
- Caetano-Anollés, G., D. K. Crist-Estes y W. D. Bauer. 1988a. "Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes." *J. Bacteriol.* 170:3164-3169.
- Caetano-Anollés, G., L. G. Wall, A. T. De Micheli, E. M. Macchi, W. D. Bauer y G. Favelukes. 1988b. "Role of motility and chemotaxis in efficiency of nodulation by *Rhizobium meliloti*." *Plant Physiol.* 86:1228-1235.
- Caetano-Anollés, G., A. Lagares y G. Favelukes. 1989. "Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: dependence on divalent cations and pH." *Plant Soil* 117:67-74.

- Caetano-Anollés, G., P. A. Joshi y P. M. Gresshoff. 1990. "Spontaneous nodules induce autorregulation of nodule formation in alfalfa." 8th International Congress on Nitrogen Fixation, may 20-26, Knoxville, Tennessee, USA. Abstract G-47.
- Cavaignac, S. 1988. "Superficie celular y competitividad de Rhizobium meliloti." Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto. Argentina.
- Cervantes, E., S. B. Sharma, F. Maillet, J. Vasse, G. Truchet y C. Rosenberg. 1989. "The Rhizobium meliloti host range nodQ gene encodes a protein which shares homology with translation elongation and initiation factors." *Mol. Microbiol.* 3:745-755.
- Chen, A. T. y D. A. Phillips. 1976. "Attachment of Rhizobium to legume roots as the basis for specific interactions." *Physiol. Plant.* 38:83-88.
- Clover, R., J. Keiber y E. R. Signer. 1989. "Lypopolysaccharide mutants of Rhizobium meliloti are not defective in symbiosis." *J. Bacteriol.* 171:3961-3967.
- Coira, J. A., S. Cavaignac y R. A. Ugalde. 1987. "Structure of a polysaccharide containing galactose and galacturonic acid from Rhizobium meliloti. Characterization and partial purification of a 2-O-methyltransferase." *J. Biol. Chem.* 262:10601-10607.
- Currier, W. W. y G. A. Strobel. 1976. "Chemotaxis of Rhizobium spp. to plant root exudates." *Plant Physiol.* 57:820-823.
- Currier, W. W. y G. A. Strobel. 1977. "Chemotaxis of Rhizobium spp to a glycoprotein produced by birdsfoot trefoil roots." *Science* 196:434-436.
- Currier, W. W. y G. A. Strobel. 1981. "Characterization and biological activity of trefoil chemotactin." *Plant Sci. Lett.* 21:159-165.
- Darbre, A. 1986. "Practical protein chemistry. A handbook." Chichester. New York. Brisbane. Toronto. Singapore: John Wiley & Sons.
- Dart, P. J. y F. V. Mercer. 1964. "The legume rhizosphere." *Arch. Mikrobiol.* 47:344-378.
- Dart, P. J. 1974. "The infection process." En "The biology of nitrogen fixation", editor A. Quispel. pp.381-429. North-Holland Pub. Company.
- Davis, E. O., I. J. Evans y A. W. B. Johnston. 1988. "Identification of nodX, a gene that allows Rhizobium leguminosarum biovar viciae strain TOM to nodulate Afganistan peas." *Mol. Gen. Genet.* 212:531-535.
- Dazzo, F. B. y D. H. Hubell. 1975. "Croos-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the Rhizobium-clover association." *Appl. Microbiol.* 30:1017-1033.
- Dazzo, F. B., C. A. Napoli y D. H. Hubbell. 1976. "Adsorption of bacteria to roots as related to host specificity in the Rhizobium-clover symbiosis." *Appl. Environ. Microbiol.* 32:166-171.
- Dazzo, F. B. y W. J. Brill. 1977. "Receptor site on clover and alfalfa roots for Rhizobium." *Appl. Environ. Microbiol.* 33:132-136.
- Dazzo, F. B. y W. J. Brill. 1978. "Regulation by fixed nitrogen of host-symbiont recognition in the Rhizobium-clover symbiosis." *Plant Physiol.* 62:18-21.

- Dazzo, F. B., M. R. Urbano y W. J. Brill. 1979. "Transient appearance of lectin receptors on Rhizobium trifolii." *Current Microbiol.* 2:15-20.
- Dazzo, F. B. y E. M. Hrabak. 1982a. "Lack of a direct nitrate-trifoliin A interaction in the Rhizobium-clover symbiosis." *Plant Soil* 69:259-264.
- Dazzo, F. B., G. L. Truchet, J. E. Sherwood, E. M. Hrabak y A. E. Gardiol. 1982b. "Alteration of the trifoliin A binding capsule of Rhizobium trifolii 0403 by enzymes released from clover roots." *Appl. Environ. Microbiol.* 44:478-490.
- Dazzo, F. B. y G. L. Truchet. 1983. "Interactions of lectins and their saccharide receptors in the Rhizobium-legume symbiosis." *J. Membrane Biol.* 73:1-16.
- Dazzo, F. B., G. L. Truchet, J. E. Sherwood, E. M. Hrabak, M. Abe y S. H. Pankratz. 1984. "Specific phases of root hairs attachment in the Rhizobium trifolii-clover symbiosis." *Appl. Environ. Microbiol.* 48:1140-1150.
- Dazzo, F. B., R. I. Hollingsworth, J. E. Sherwood, M. Abe, E. M. Hrabak, A. E. Gardiol, H. S. Pankratz, K. B. Smith y H. Yang. 1985. "Recognition and infection of clover root hairs by Rhizobium trifolii." En "Nitrogen fixation research progress", editors H. J. Evans, P. J. Bottomlet y W. E. Newton. pp.239-245. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- de Maagd, R. A., C. A. Wijffelman, E. Pees y B. J. J. Lugtenberg. 1988. "Detection and subcellular localization of two Sym plasmid-dependent proteins of Rhizobium leguminosarum biovar viciae." *J. Bacteriol.* 170:4424-4427.
- de Maagd, R. A., H. P. Spaink, E. Pees, I. H. M. Mulders, A. Wijfes, C. A. Wijffelman, R. J. H. Okker y B. J. J. Lugtenberg. 1989a. "Localization and symbiotic function of a region on the Rhizobium leguminosarum sym plasmid pRL1JI responsible for a secreted, flavonoid-inducible 50-kilodalton protein." *J. Bacteriol.* 171:1151-1157.
- de Maagd, R. A., A. H. M. Wijfes, H. P. Spaink, J. E. Ruizsainz, C. A. Wijffelman, R. J. H. Okker y B. J. J. Lugtenberg. 1989b. "NodO, a new nod gene of the Rhizobium leguminosarum biovar viciae Sym plasmid pRL1Ji, encodes a secreted protein." *J. Bacteriol.* 171:6764-6770.
- Debellé, F., C. Rosenberg, J. Vasse, F. Maillet, E. Martinez, J. Dénarié y G. Truchet. 1986. "Assignment of symbiotic developmental phenotypes to common and specific nodulation (nod) genetic loci of Rhizobium meliloti." *J. Bacteriol.* 168:1075-1086.
- Debellé, F., F. Maillet, J. Vasse, C. Rosenberg, F. de Billy, G. Truchet, J. Dénarié y F. Ausubel. 1988. "Interference between Rhizobium meliloti and Rhizobium trifolii nodulation genes: genetic basis of R. meliloti dominance." *J. Bacteriol.* 170:5718-5727.
- Delves, A. C., A. Mathews, D. A. Day, A. S. Carter, B. J. Carol y P. M. Gresshoff. 1986. "Regulation of the soybean-Rhizobium nodule symbiosis by shoot and root factors." *Plant Physiol.* 82:588-590.
- Diaz, C. L., P. Lems-van Kan, I. A. M. van der Schaal y J. W. Kijne. 1984. "Determination of pea (Pisum sativum L.) root lectin using an enzyme-linked immunoassay." *Planta* 161:302-307.
- Diaz, C. L., P. C. van Spronsen, R. Bakhuizen, G. J. J. Logman, B. J. J. Lugtenberg y J. W. Kijne. 1986. "Correlation between infection by Rhizobium leguminosarum and lectin on the surface of Pisum sativum L. roots." *Planta* 168:350-359.

- Diaz, C. L., L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg y J. W. Kijne. 1989. "Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the Rhizobium-legume symbiosis." *Nature* 338:579-581.
- Dibb, N. J., A. Downie y N. J. Brewin. 1984. "Identification of a rhizosphere protein encoded by the symbiotic plasmid of Rhizobium leguminosarum." *J. Bacteriol.* 158(2):621-627.
- Djordjevic, M. A., P. R. Schofield, R. W. Ridge, N. A. Morrison, B. J. Bassam, J. Planzinski, J. M. Watson y B. G. Rolfe. 1985. "Rhizobium nodulation genes involved in root hair curling (Hac) are functionally conserved." *Plant Mol. Biol.* 4:147-160.
- Djordjevic, M. A., J. W. Redmond, M. Batley y B. G. Rolfe. 1987. "Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in Rhizobium trifolii." *EMBO J.* 6:1173-1179.
- Dudley, M. E., T. W. Jacobs y S. R. Long. 1987. "Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by Rhizobium meliloti." *Planta* 171:289-301.
- Dylan, T., L. Ielpi, S. Stanfield, L. Kashyap, C. Douglas y et al. 1986. "Rhizobium meliloti genes required for nodule development are related to chromosomal virulence genes in Agrobacterium tumefaciens." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:4403-4407.
- Dylan, T., D. R. Helinski y G. S. Ditta. 1990. "Hypoosmotic adaptation in Rhizobium meliloti requires $\beta(1-2)$ glucan." *J. Bacteriol.* 172:1400-1408.
- Economou, A. H., F. K. L., J. A. Downie y A. W. B. Johnston. 1989. "Transcription of *rhiA*, a gene on a Rhizobium leguminosarum bv. *viciae* sym plasmid, requires *rhiR* and is repressed by flavonoids that induce *nod* genes." *Mol. Microbiol.* 3:87-93.
- Economou, A., W. D. O. Hamilton, A. W. B. Johnston y J. A. Downie. 1990. "The Rhizobium nodulation gene *nodO* encodes a Ca^{+2} -binding protein that is exported without N-terminal cleavage and is homologous to hemolysin and related proteins." *EMBO J.* 9:349-354.
- Egelhoff, T. T. y S. R. Long. 1985. "Rhizobium meliloti nodulation genes: identification of *nodDABC* products, purification of *NodA* protein and expression of *nodA* in Rhizobium meliloti." *J. Bacteriol.* 164:591-599.
- Ervin, S. E. y D. H. Hubbell. 1985. "Root hair deformation associated with fractionated extracts from Rhizobium trifolii." *Appl. Environ. Microbiol.* 49:61-68.
- Evans, I. J. y J. A. Downie. 1986. "The *nodI* gene product of Rhizobium leguminosarum is closely related to ATP-binding bacterial transport proteins; nucleotide sequence analysis of the *nodI* and the *nodJ* genes." *Gene* 43:95-101.
- Fahraeus, G. 1957. "The infection of clover root hair by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique." *J. Gen. Microbiol.* 16:374-381.
- Fantauzzo, F. y S. Mutaftschiev. 1988. "Soybean cell culture specifically induce the competence of Bradyrhizobium to stimulate plant cell growth." En "Nitrogen Fixation: Hundred Years After", Editors H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. p:450. New York - Stugart: Gustav Fisher.

- Faucher, C., F. Maillet, J. Vasse, C. Rosenberg, A. A. N. van Brussel, G. Truchet y J. Dénarié. 1988. "Rhizobium meliloti host range nodH gene determines production of an alfalfa-specific extracellular signal." J. Bacteriol. 170(12):5489-5499.
- Faucher, C., S. Camut, J. Dénarié y G. Truchet. 1989. "The nodH and nodQ host range genes of Rhizobium meliloti behave as avirulent genes in R. leguminosarum bv viciae and determine changes in the production of plant-specific extracellular signals." Mol. Plant-Microbe Interact. 2:291-300.
- Favelukes, G. y G. Caetano-Anollés. 1985. "Rhizobium meliloti specifically attached to alfalfa roots, obligatory precursor towards nodulation." En "Nitrogen fixation research progress", editors H. J. Evans, P. J. Bottomlet y W. E. Newton. p.259. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers.
- Finan, T. M., A. M. Hirsch, J. A. Leigh, E. Johansen, G. A. Kuldán, S. Deegan, G. C. Walker y E. R. Signer. 1985. "Symbiotic mutants of Rhizobium meliloti that uncouple plant from bacterial differentiation." Cell 40:869-877.
- Firmin, J. L., K. E. Wilson, L. Rossen y A. W. B. Johnston. 1986. "Flavonoid activation of nodulation genes in Rhizobium reversed by other compounds present in plants." Nature 324:90-92.
- Fisher, R. F., T. T. Egelhoff, T. Mulligan y S. R. Long. 1988. "Specific binding of protein from Rhizobium meliloti cell-free extracts containing nodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes." Genes Dev. 2:289-293.
- Foster, R. C. 1986. "The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere." Ann. Rev. Phytopathol. 24:211-234.
- Gallon, J. R. y Chaplin, D. E. 1987. An introduction to Nitrogen Fixation.
- Gaworzewska, E. T. y M. J. Carlile. 1982. "Positive chemotaxis of Rhizobium leguminosarum and other bacteria towards root exudates from legumes and other plants." J. Gen. Microbiol. 128:1179-1188.
- Geremía, R. A., S. Cavaignac, A. Zorreguieta, N. Toro, J. Olivares y R. A. Ugalde. 1987. "A Rhizobium meliloti mutant that form ineffective pseudonodules in alfalfa produces exopolysaccharide but fails to form $\beta(1-2)$ -glucan." J. Bacteriol. 169:880-884.
- Gitte, R. R., P. Vittal Rai y R. B. Patil. 1978. "Chemotaxis of Rhizobium sp. towards root exudate of Cicer arietinum L." Plant Soil 50:553-566.
- Glazebrook, J. y G. C. Walker. 1989. "A novel exopolysaccharide can function in place of the calcofluor-binding exopolysaccharide in nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti." Cell 56:661-672.
- Götz, R., N. Limmer, K. Ober y R. Schmitt. 1982. "Motility and chemotaxis in two strains of Rhizobium with complex flagella." J. Gen. Microbiol. 128:789-798.
- Götz, R. y R. Schmitt. 1987. "Rhizobium meliloti swims by unidirectional, intermittent rotation of right-handed flagellar helices." J. Bacteriol. 169:3146-3150.
- Grasso, D. H., G. Favelukes y O. M. Aguilar. 1988. Análisis molecular de mutantes Ilv^- de R. meliloti defectivos en simbiosis." XXIV Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Huerta Grande, Córdoba, mostración 65
- Gulash, M., P. Ames, R. C. Larosiliere y K. Bergman. 1984. "Rhizobia are attracted to localized sites on legume roots." Appl. Environ. Microbiol. 48:149-152.

- Györgypal, Z., N. Iyer y A. Kondorosi. 1988. "Three regulatory *nodD* alleles of diverged flavonoid-specificity are involved in host-dependent nodulation by Rhizobium meliloti." Mol. Gen. Genet. 212:85-92.
- Hale, M. G., L. D. Moore y G. J. Griffin. 1982. "Factors affecting root exudation and significance for the rhizosphere ecosystem." En "Biological and chemical interactions in the rhizosphere", editor Ecological research committee of NFR. pp.43-72. Sweden: Swedish National Science Resesarch Council.
- Halverson, L. J. y G. Stacey. 1984. "Host recognition in the Rhizobium-soybean symbiosis. Detection of a protein factor in soybean root exudate which is involved in the nodulation process." Plant Physiol. 74:84-89.
- Halverson, L. J. y G. Stacey. 1985. "Host recognition in the Rhizobium-soybean symbiosis. Evidence for the involvement of lectin in nodulation." Plant Physiol. 77:621-625.
- Halverson, L. J. y G. Stacey. 1986a. "Effect of lectin on nodulation by wild-type Bradyrhizobium japonicum and a nodulation-defective mutant." Appl. Environ. Microbiol. 51:753-760.
- Halverson, L. J. y G. Stacey. 1986b. "Signal exchange in plant-microbe interactions." Microbiol. Rev. 50:193-225.
- Hamblin, J. y S. P. Kent. 1973. "Possible role of phytohaemagglutinin in Phaseolus vulgaris L." Nature(New Biol) 245:28-30.
- Handelsman, J., R. Ugalde y W. J. Brill. 1984. "Rhizobium meliloti competitiveness and the alfalfa agglutinin." J. Bacteriol. 157:703-707.
- Handelsman, J. y W. J. Brill. 1985. "Erwinia herbicola isolates from alfalfa plants may play a role in nodulation of alfalfa by Rhizobium meliloti." Appl. Environ. Microbiol. 49:818-821.
- Hartwig, U. A., C. A. Maxwell, C. M. Joseph y D. A. Phillips. 1989. "Interactions among flavonoid nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots." Plant Physiol. 91:1138-1142.
- Hartwig, U. A., C. A. Maxwell, C. M. Joseph y D. A. Phillips. 1990a. "Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce *nod* genes in Rhizobium meliloti." Plant Physiol. 92:116-122.
- Hartwig, U. A., C. A. Maxwell, C. M. Joseph y D. A. Phillips. 1990b. "Effects of alfalfa nod gene-inducing flavonoids on *nodABC* transcription in Rhizobium meliloti strains containing different *nodD* genes." J. Bacteriol. 172:2769-2773.
- Heumann, W. 1983. "The historical background of the bacteria-plant interaction." En "Molecular genetics of the bacteria-plant interaction", editor A. Pühler. pp.3-8. Berlin. Heidelberg.: Springer Verlag.
- Hirsch, A. M., K. J. Wilson, J. D. G. Jones, M. Bang, U. V. Walker y F. M. Ausubel. 1984. "Rhizobium meliloti nodulation genes allow Agrobacterium tumefaciens and Escherichia coli to form pseudonodules on alfalfa." J. Bacteriol. 158:1133-1143.
- Hirsch, A. M., T. V. Bhuvanewari, J. G. Torrey y T. Bisseling. 1989. "Early nodulins genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors." Proc. Natn. Acad. Sci. USA 86:1244-1248.

- Honma, M. A. y F. M. Ausubel. 1987. "Rhizobium meliloti has three functional copies of the nodD symbiotic regulatory gene." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8558-8562.
- Honma, M. A., M. Asomanmig y F. M. Ausubel. 1990. "Rhizobium meliloti nodD genes mediated host specific activation of nodABC." J. Bacteriol. 172:901-911.
- Horvath, B., E. Kondorosi, M. John, J. Schmidt, I. Török, Z. Györgypal, I. Barabas, U. Wieneke, J. Schell y A. Kondorosi. 1986. "Organization structure and symbiotic function of Rhizobium meliloti nodulation genes determining host specificity for alfalfa." Cell 46:335-343.
- ▼ Horvath, B., C. W. B. Bachem, J. Schell y A. Kondorosi. 1987. "Host-specific regulation of nodulation genes in Rhizobium is mediated by a plant-signal, interacting with the nodD gene product." EMBO J. 6:841-848.
- Hunter, W. J. y C. J. Fahring. 1980. "Movement by Rhizobium and nodulation of legumes." Soil Biol. Biochem. 12:537-542.
- Hynes, M. F. y N. F. Mc. Gregor. 1990. "Two plasmids other than the nodulation plasmid are necessary or formation of nitrogen-fixing nodules by Rhizobium leguminosarum." Mol. Microbiol. 4:567-574.
- Imbert, A. y S. Mutaftschiev. 1988. "Soybean lectins elicit a novel physiological function in Bradyrhizobium japonicum." En "Nitrogen Fixation: Hundred Years After", Editors H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. p:451. New York - Stugart: Gustav Fisher.
- John, M., J. Schmidt, U. Wieneke, H. D. Krúsmann y J. Schell. 1988. "Transmembrane orientation and receptor-like structure of the Rhizobium meliloti common nodulation protein NodC." EMBO J. 7:583-588.
- Kamberger. 1978. "Binding specificity and purification of Medicago sativa lectin." En "Affinity Chromatography", editors Hoffhan y Ostenhoff. pp:295-298. Pergamon Pres.
- Kapp, D., K. Niehans, J. Quandt, P. Müller y A. Pühler. 1990. "Cooperative action of Rhizobium meliloti nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected alfalfa nodules." Plant Cell 2:139-151.
- Kapulnik, Y., C. M. Joseph y D. A. Philips. 1987. "Flavone limitations to root nodulation and symbiotic nitrogen fixation in alfalfa." Plant Physiol. 84:1193-1196.
- Kato, G., Y. Maruyama y M. Nakamura. 1981. "Involvement of lectins in Rhizobium-pea recognition." Plant Cell Physiol. 22:759-771.
- Kijne, J. W., I. A. M. van der Schaal y G. E. de Vries. 1980. "Pea lectins and the recognition of Rhizobium leguminosarum." Plant Sci. Lett. 18:65-74.
- Kijne, J. W., G. Smit, C. L. Diaz y B. J. J. Lugtenberg. 1988a. "A two-step mechanism for the attachment of Rhizobium leguminosarum to pea root hair tips." En "Nitrogen Fixation: Hundred Years After", Editors H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. p:452. New York - Stugart: Gustav Fisher.
- Kijne, J. W., G. Smit, C. L. Diaz y B. J. J. Lugtenberg. 1988b. "Lectin-enhanced accumulation of manganese-limited Rhizobium leguminosarum cells on pea root hair tips." J. Bacteriol. 170:2994-3000.

- Kondorosi, E., Z. Banfalvi y A. Kondorosi. 1984. "Physical and genetic analysis of a symbiotic region of Rhizobium meliloti: identification of nodulation genes." Mol. Gen. Genet. 193:445-452.
- Kondorosi, E. y A. Kondorosi. 1986. "Nodule induction on plant roots by Rhizobium." Trends Biochem. Sci. 11:296-299.
- Koshland Jr., D. G. 1981. "Biochemistry of sensing and adaptation in a simple bacterial system." Ann. Rev. Biochem. 50:765-782.
- Kosslak, R. M. y B. B. Bohlool. 1984. "Suppression of nodule development of one site of a split-root system of soybeans caused by prior inoculation of the other site." Plant Physiol. 75:125-130.
- Kosslak, R. M., R. Bookland, J. Barkei, H. E. Paaren y E. R. Appelbaum. 1987. "Induction of Bradyrhizobium japonicum common nod genes by isoflavones isolated from Glycine max." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7428-7432.
- Kuhn, T. S. 1971. "La estructura de las revoluciones científicas." Mexico D. F.: Fondo de Cultura Económica.
- Kush, A. K. y K. R. Dadarwal. 1981. "Root exudate as pre-invasive factor in the nodulation of chick pea varieties." Soil Biol. Biochem. 13:51-55.
- Lagares, A. 1989. "La asociación simbiótica Rhizobium-leguminosas: Componentes superficiales bacterianos involucrados en las etapas tempranas." Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata. Argentina.
- Lameta, A. D. y M. Jay. 1987. "Study of soybean and lentil root exudates. III. Influence of soybean isoflavonoids on the growth of rhizobia and some rhizospheric microorganisms." Plant Soil 101:267-272.
- Legocki, R. P. y D. P. S. Verma. 1980. "Identification of nodule-specific host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium-legume symbiosis." Cell 20:153-163.
- Leigh, J. A., E. R. Signer y G. C. Walker. 1985. "Exopolisaccharide deficient mutants of Rhizobium meliloti that form ineffective nodules." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6231-6235.
- Leigh, J. A., J. W. Reed, J. F. Hanks, A. M. Hirsch y G. C. Walker. 1987. "Rhizobium meliloti mutants that fail to succinylate their calcofluor-binding exopolisaccharide are defective in nodule invasion." Cell 51:579-587.
- Lehninger, A. L. 1980. "Bioquímica". 2^a edición. Worth Publishers, Inc. Ediciones Omega, S. A. Barcelona.
- Lepek, V. C. y L. R. Marechal. 1989. "Alfalfa agglutinin - Rhizobium meliloti: an interaction revisited." An. Asoc. Quím. Argent. 77:159-167.
- Lepek, V. 1989. "Estudios bioquímicos y fisiológicos de la interacción bacteria-planta." Tesis doctoral. Universidad Nacional de Buenos Aires. Argentina.
- Lerouge, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J. C. Promé y J. Dénarié. 1990. "Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal." Nature 344:781-784.
- Ljunggren, H. 1969. "Mechanism and pattern of Rhizobium invasion into leguminous root hairs." Physiol. Plant. Supp. V

- Lodeiro, A., E. N. Martínez y G. Favelukes. 1989. "Selectividad temprana en la asociación simbiótica de poroto y rizobios: influencia de Ca^{+2} y Mg^{+2} ." XXV Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Buenos Aires, 22-24 octubre, mostración 251
- Long, S. R. y J. Cooper. 1988. "Overview of symbiosis." En "Molecular genetics of plant-microbe interactions", editors R. Palacios y D. P. S. Verma. pp.163-178. APS Press.
- Long, S. R. y D. W. Ehrhardt. 1989. "New route to a sticky subject." *Nature* 338:545-546.
- Long, S. R. 1989a. "Rhizobium-legume nodulation: Life together in the underground." *Cell* 56:203-214.
- Long, S. R. 1989b. "Rhizobium genetics." *Annu. Rev. Genet.* 23:483-506.
- Lopez, M. F. y E. R. Signer. 1986. "Hydrolytic enzymes in Rhizobium meliloti." En "Third International Symposium on the molecular genetics of plant-microbe interactions. Book of Abstracts", p.101. Montreal, Canada:
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr y R. J. Randall. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
- Lynch, J. M. 1983. "Soil Biotechnology." Blackwell Scientific.
- Malek, W. 1989. "Chemotaxis in Rhizobium meliloti strain L5-30." *Arch. Microbiol.* 152:611-612.
- Martínez, E. N. y G. Favelukes. 22-24 de octubre, 1987. "Caracterización de agregados Rhizobium meliloti-raíz de alfalfa." XXIII Reunión Nacional de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica, Huerta Grande, Córdoba, mostración 103
- Maxwell, C. A., U. A. Hartwig, C. M. Joseph y D. A. Philips. 1990. "A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of Rhizobium meliloti." *Plant Physiol.* 91:842-847.
- Mellor, H. Y., A. R. Glenn, R. Arwas y M. J. Dilworth. 1987. "Symbiotic and competitive properties of motility mutants of Rhizobium trifolii TA1." *Arch. Microbiol.* 148:34-39.
- Monod, J. 1981. "El azar y la necesidad. Ensayo sobre la filosofía natural de la biología moderna". Barcelona: Tusquets Editores, S. A.
- Morrissey, J. H. 1981. "Silver stain for proteins in polyacrilamide gels: A modified procedure with enhanced uniform sensitivity." *Anal. Biochem.* 117:307-310.
- Mulligan, J. T. y S. R. Long. 1985. "Induction of Rhizobium meliloti nodC expression by plant exudate requires nodD." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:6609-6613.
- Mulligan, J. T. y S. R. Long. 1989. "Extended nodulation gene region in Rhizobium meliloti 1021. III. Interaction of three copies of nodD and regulatory locus in the control of Rhizobium meliloti nodulation and exopolysaccharide genes." *Genetics* 85:6602-6606.
- Munns, D. N. 1968. "Nodulation of Medicago sativa in solution culture. I. Acid-sensitive steps." *Plant Soil* 28:129-146.
- Munns, D. N. 1970. "Nodulation of Medicago sativa in solution culture. V. Calcium and pH requirements during infection." *Plant Soil* 32:90-102.

- Mutaftschiev, S., J. Vasse y G. Truchet. 1982. "Exostructures of Rhizobium meliloti." FEMS Microbiol. Lett. 13:171-175.
- Nap, J. P., C. van de Wiel, H. P. Spaink, M. Moerman, M. van den Heuvel, M. A. Djordjevic, A. A. M. van Lammeren, A. van Kamman y T. Bisseling. 1989. "The relationship between nodulin gene expression and the Rhizobium nod genes in Vicia sativa root nodule development." Mol. Plant-Microbe Interact. 2:53-63.
- Napoli, C. y P. Albersheim. 1980. "Infection and nodulation of clover by nonmotile Rhizobium trifolij." J. Bacteriol. 141:979-980.
- Norris, J. H., L. A. Macol y A. M. Hirsch. 1988. "Nodulin gene expression in effective alfalfa nodules and in nodules arrested at three different stages of development." Plant Physiol. 88:321-328.
- Odufa, S. A. y D. Werner. 1981. "Root exudates in relation to growth and nitrogenase activity of Rhizobium japonicum." Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie 21:601-606.
- Olivares, J., J. Casadeus y E. J. Bedmar. 1980. "Method for testing degree of infectivity of Rhizobium meliloti strains." Appl. Environ. Microbiol. 39:967-970.
- Olsson, S. 1987. "Effects of root exudation on growth of bacteria and fungal pathogens in the rhizosphere." Ph. D. Thesis. University Lund: Sweden.
- Paau, A. S., W. T. Leps y W. J. Brill. 1981. "Agglutinin from alfalfa necessary for binding and nodulation by Rhizobium meliloti." Science 213:1513-1515.
- Parke, D., M. Rivelli y L. N. Ornston. 1985. "Chemotaxis to aromatic and hydroaromatic acids: comparison of Bradyrhizobium japonicum and Rhizobium trifolij." J. Bacteriol. 163:417-422.
- Peters, N. K., J. W. Frost y S. R. Long. 1986. "A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nodulation genes." Science 233:977-979.
- Peters, N. K. y S. R. Long. 1988. "Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of Rhizobium meliloti nodulation genes." Plant Physiol. 88:396-400.
- Peters, N. K. y D. P. S. Verma. 1990. "Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions." Mol. Plant-Microbe Interact. 3:4-8.
- Peters, R. J. y M. Alexander. 1966. "Effect of legume exudates on the root nodule bacteria." Soil Sci. 102:380-385.
- Philip-Hollingsworth, S., R. I. Hollingsworth, F. B. Dazzo, M. A. Djordjevic y B. G. Rolfe. 1989. "The effect of interspecies transfer of Rhizobium host-specific nodulation genes on acidic polysaccharide structure and in situ binding by host lectin." J. Biol. Chem. 264:5710-5714.
- Phillips, D. A., C. A. Maxwell, C. M. Joseph y U. A. Hartwig. 1988. "Flavonoid nodulation signals in alfalfa." En Nitrogen Fixation: Hundred Years After, Editors H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. 411-415. New York - Stuttgart: Gustav Fisher.
- Pierce, M. y W. D. Bauer. 1983. "A rapid regulatory response governing nodulation in soybean." Plant Physiol. 73:286-290.

- Priefer, U. B. 1989. "Genes involved in lypopolysaccharide production and symbiosis are clustered on the chromosome of Rhizobium leguminosarum biovar viciae VF 39." J. Bacteriol. 171:6161-6168.
- Pueppke, S. 1984. "Adsorption of slow- and fast-growing rhizobia to soybean and cowpea roots." Plant Physiol. 75:924-928.
- Pühler, A., M. F. Hynes, D. Kapp y P. Müller. 1986. "Infection mutants of Rhizobium meliloti are altered in acidic exopolysaccharide production." En "Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interaction", editor B. B. J. Lugtenberg. 29-37. H4,
- Quispel, A. 1988. "Hellriegel and Wilfarth's discovery of (symbiotic) nitrogen fixation hundred years ago." En "Nitrogen Fixation: Hundred Years After", Editors H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. 3-12. New York - Stuttgart: Gustav Fisher.
- Recourt, K., A. A. N. van Brussel, A. J. M. Driessen y B. J. J. Lugtenberg. 1989. "Accumulation of a nod gene inducer, the flavonoid naringenin, in the cytoplasmic membrane of Rhizobium leguminosarum biovar viciae is caused by the pH-dependent hydrophobicity of naringenin." J. Bacteriol. 171:4370-4377.
- Redmon, J. W., M. Batley, M. A. Djordjevic, R. W. Innes, P. L. Kuempel y B. G. Rolfe. 1986. "Flavones induce expression of nodulation genes in Rhizobium." Nature 323:632-634.
- Robertson, J. G., P. Lyttleton y C. E. Pankhurst. 1981. "Preinfection and infection process in the legume-Rhizobium symbiosis." En "Current perspectives in nitrogen fixation", editors A. H. Gibson y W. E. Newton. Canberra: Australian Academy of Science.
- Rolfe, B. G. y J. Shine. 1984. "Rhizobium-Leguminosae symbiosis: the bacterial point of view." En "Genes involved in Microbe-Plant interaction. Plant Gene Research.", editors D. P. S. Verma y Th. Hohn. pp:95-128. Wien. New York: Springer.
- Rolfe, B. G. y P. M. Gresshoff. 1988. "Genetic Analysis of legume nodule initiation." Ann. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol. 39:297-319.
- Rossen, L., A. W. B. Johnston y J. A. Downie. 1984. "DNA sequence of the Rhizobium leguminosarum nodulation genes nodAB and C required for root hair curling." Nucl. Acids Res. 12:9497-9508.
- Rossen, L., C. A. Shearman, A. W. B. Johnston y J. A. Downie. 1985. "The nodD gene of Rhizobium leguminosarum is autoregulatory and in the presence of plant exudate induces the nodABC genes." EMBO J. 4:3369-3373.
- Rostas, K., E. Kondorosi, B. Horvath, A. Simoncsits y K. Kondorosi. 1986. "Conservation of extended promoter regions of nodulation genes in Rhizobium." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:1757-1761.
- Rovira, A. D. 1969. "Plant root exudates." Bot. Rev. 35:35-57.
- Rovira, A. D. 1979. "Biology of the soil-root interface." En "The soil-root interface", editors J. L. Harley y R. Scott Russell. 145-160. London: Academic Press.
- Rovira, A. D., R. C. Foster y J. K. Martin. 1979. "Origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere." En "The soil-root interface", editors J. L. Harley y R. Scott Russell. 145-160. London: Academic Press.

- Sargent, L., S. Z. Huang, B. G. Rolfe y M. A. Djordjevic. 1987. "Split-root assay using Trifolium subterraneum show that Rhizobium infection induces a systemic response that can inhibit nodulation of another invasive Rhizobium strain." *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1611-1619.
- Schmidt, J., R. Wingender, M. John, V. Wieneke y J. Schell. 1988. "Rhizobium meliloti nodA and nodB genes are involved in generating compounds that stimulate mitosis of plant cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:8578-8582.
- Seaton, P. J. y W. W. Currier. 1979. "Chemotaxis of Rhizobium spp. to alfalfa roots and seeds exudates." *Plant Physiol.* 63(suppl):abstract 630.
- Seegers, R. y T. A. La Rue. 1985. "Legume agglutinins that bind to Rhizobium meliloti." *J. Bacteriol.* 162:784-789.
- Sharon, N. y H. Lis. 1989. "Lectins as cell recognition molecules." *Science* 246:227-234.
- Shearman, C. A., L. Rossen, A. W. B. Johnston y J. A. Downie. 1986. "The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nodF encodes a polypeptide similar to acyl-carrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate." *EMBO J.* 5:647-652.
- Smit, G., J. W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg. 1986. "Correlation between extracellular fibrils and attachment of Rhizobium leguminosarum to pea root hair tips." *J. Bacteriol.* 168:821-827.
- Smit, G., J. W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg. 1987. "Involvement of both cellulose fibrils and a Ca²⁺-dependent adhesion in the attachment of Rhizobium leguminosarum to pea root hair tips." *J. Bacteriol.* 169:4294-4301.
- Soby, S. y K. Bergman. 1983. "Motility and chemotaxis of Rhizobium meliloti in soil." *Appl. Environ. Microbiol.* 46(5):995.
- Solheim, B. 1983. "Possible role of lectins in binding rhizobia to host roots." En "Lectins", editor T. C. Bog-Hansen y G. A. Spengler. pp:539-547. Berlin. New York: Walter de Gruyter & Co.
- Solheim, B. y K. E. Fjellheim. 1984. "Rhizobial polysaccharides-degrading enzymes from roots of legumes." *Physiol. Plant.* 62:11-17.
- Spalink, H. P., C. A. Wijffelman, E. Pees, R. J. H. Okker y B. J. J. Lugtenberg. 1987. "Rhizobium nodulation gene nodD as a determinant of host specificity." *Nature* 328:337-339.
- Sprent, J. I. 1979. *The biology of nitrogen fixing organisms*. Maidenhead, England: Mc. Graw - Hill Ltd.
- Stacey, G., A. S. Paau y W. Brill. 1980. "Host recognition in the Rhizobium-soybean symbiosis." *Plant Physiol.* 66:609-614.
- Streeter, J. G. 1988. "Inhibition of legume nodule formation and nitrogen fixation by nitrate." *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 7:1-23.
- Tepfer, D., A. Goldman, N. Pamboukdjian, M. Maille, A. Lepingle, D. Chevalier, J. Dénarié y C. Rosenberg. 1988. "A plasmid of Rhizobium meliloti 41 encodes catabolism of two compounds from root exudate of Calystegium sepium." *J. Bacteriol.* 170:1153-1161.

- Truchet, G., M. Michel y J. Dénarié. 1980. "Sequential analysis of the organogenesis of lucerne (*Medicago sativa*) root nodules using symbiotically-defective mutants of *Rhizobium meliloti*." *Differentiation* 16:163-172.
- Truchet, G. L. y F. B. Dazzo. 1982. "Morphogenesis of lucerne root nodules incited by *Rhizobium meliloti* in the presence of combined nitrogen." *Planta* 154:352-360.
- Truchet, G., C. Rosenberg, J. Vasse, J. S. Julliot, S. Camut y J. Dénarié. 1984. "Transfer of *Rhizobium meliloti* pSym genes into *Agrobacterium tumefaciens*: Host-specific nodulation by atypical infection." *J. Bacteriol.* 157:134-142.
- Truchet, G., F. Debellé, J. Vasse, B. Terzaghi, A. M. Garnerone, C. Rosenberg, J. Batut, F. Maillet y J. Dénarié. 1985. "Identification of a *Rhizobium meliloti* pSym 2011 region controlling the host specificity of root hair curling and nodulation." *J. Bacteriol.* 164:1200-1210.
- Truchet, G. L., J. E. Sherwood, H. S. Pankratz y F. B. Dazzo. 1986. "Clover root exudate contains a particulate form of the lectin, trifoliin A, which binds *Rhizobium trifolii*." *Physiol. Plant.* 66:575-582.
- Truchet, G., J. Vasse, R. Odorico, F. de Billy, S. Camut y T. Huguet. 1988. "Discrimination between nodules and root-derived structures: Does alfalfa nodulate spontaneously?" En "Molecular genetics of plant-microbe interactions", editors R. Palacios y D. P. S. Verma. 179. St. Paul, Minnesota, USA: APS Press.
- Truchet, G., D. G. Barker, S. Camut, F. de Billy, J. Vasse y T. Huguet. 1989. "Alfalfa nodulation in the absence of *Rhizobium*." *Mol. Gen. Genet.* 219:65-68.
- Ugalde, R. A., J. A. Coira y W. J. Brill. 1986a. "Biosynthesis of a galactose and glucuronic acid containing polysaccharide in *Rhizobium meliloti*." *J. Bacteriol.* 168:270-275.
- Ugalde, R. A., J. Handelsman y W. J. Brill. 1986b. "Role of galactosyltransferase activity in phage sensitivity and nodulation competitiveness of *Rhizobium meliloti*." *J. Bacteriol.* 166:148-154.
- Van Brussel, A. A. N., S. A. J. Zaat, H. C. J. Canter-Cremers, C. A. Wijffelman, E. Pees, T. Tak y B. J. J. Lugtenberg. 1986. "Role of plant root exudate and sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of TSR factor which causes thick and short roots on common vetch." *J. Bacteriol.* 165:517-522.
- van der Schaal, I. A. M., T. J. J. Logman, C. L. Diaz y J. W. Kijne. 1983. "Growth-phase-dependent pea (*Pisum sativum* L.) lectin receptors of *Rhizobium leguminosarum*." En "Lectins and their possible involvement in the *Rhizobium-Leguminosae* symbiosis." Ph. D. Thesis. University of Leiden, I. A. M. van der Schaal. Amsterdam: Rodopi.
- Van Eggeraat, A. M. S. M. 1975a. "Changes in the free ninhydrin-positive compounds of young pea plants as affected by different nutritional and environmental conditions." *Plant Soil* 42:15-36.
- Van Eggeraat, A. M. S. M. 1975b. "The possible role of homoserine in the development of *Rhizobium leguminosarum* in the rhizosphere of pea seedlings." *Plant Soil* 42:381-386.
- Van Veen, R. J. M., H. Den Dulk-Ras, T. Bisseling, R. A. Schilperoort y P. J. J. Hooykaas. 1988. "Crown gall tumor and root nodule formation by the bacterium *Phyllobacterium myrsinacearum* after the introduction of an *Agrobacterium* Ti plasmid or a *Rhizobium* sym plasmid." *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1:231.

- Vasse, J. M., F. B. Dazzo y G. L. Truchet. 1984. "Re-examination of capsule development and lectin-binding sites on Rhizobium japonicum 311B110 by the glutaraldehyde/ruthenium red/uranyl acetate staining method." J. Gen. Microbiol. 130:3037-3047.
- Verma, D. P. S., A. Delauney, J. Kushe, B. Hirel, R. Schafer y K. Raju. 1988. "Metabolites and protein factors controlling nodulin gene expression." En "Nitrogen Fixation: Hundred Years After", Editors H. Bothe, F. J. de Bruijn y W. E. Newton. 599-604. New York - Stuttgart: Gustav Fisher.
- Vesper, S. J. y W. D. Bauer. 1985. "Characterization of Rhizobium attachment to soybean roots." Symbiosis 1:139-162.
- Vesper, S. J. y W. D. Bauer. 1986. "Role of pili (fimbriae) in attachment of Bradyrhizobium japonicum to soybean roots." Appl. Environ. Microbiol. 52:134-141.
- Vesper, S. J., N. S. A. Malik y W. D. Bauer. 1987. "Transposon mutants of Bradyrhizobium japonicum altered in attachment to host roots." Appl. Environ. Microbiol. 53:1959-1961.
- Vincent, J. M. 1974. "Root-nodule symbiosis with Rhizobium." En "The biology of nitrogen fixation", editor A. Quispel. pp:265-341. Amsterdam. Oxford: North-Holland Publishing Company.
- Vincent, J. M. 1970. "A manual for the practical study of the root-nodule bacteria." IBP Handbook no 15, Oxford and Edinburgh: Blackwell scientific publications.
- Vincent, J. M. 1980. "Factors controlling the legume-Rhizobium symbiosis." En "Nitrogen Fixation II", editors W. E. Newton y W.H. Horne-Johnson. pp:103-129. Baltimore: University Park Press.
- Williams, M. N. V., R. I. Hollingsworth, S. Klein y E. A. Signer. 1990. "The symbiotic defect of Rhizobium meliloti exopolysaccharide mutant is suppressed by LpsZ⁺, a gene involved in lipopolysaccharide biosynthesis." J. Bacteriol. 172(5):2622-2632.
- Yelton, M. M., J. T. Mulligan y S. R. Long. 1987. "Expression of Rhizobium meliloti nod genes in Rhizobium and Agrobacterium backgrounds." J. Bacteriol. 169:3024-3098.
- Zaat, S. A. J., C. A. Wijffelman, H. P. Spaik, A. A. N. Van Brussel, R. J. H. Okker y B. J. J. Lugtenberg. 1987. "Induction of the nodA promoter of Rhizobium leguminosarum sym plasmid PRL1J1 by plant flavanones and flavones." J. Bacteriol. 169:198-204.
- Zurkowski, W. 1980. "Specific adsorption of bacteria to clover root hairs, related to the presence of the plasmid pW22 in cells of Rhizobium trifolii." Microbios 27:27-32.

FE DE ERRATAS

pag. 36, cuarto párrafo, donde dice "aglutinación" debe decir aglutinación.

pag. 19, tercer párrafo, donde dice "introducción" debe decir introducción.