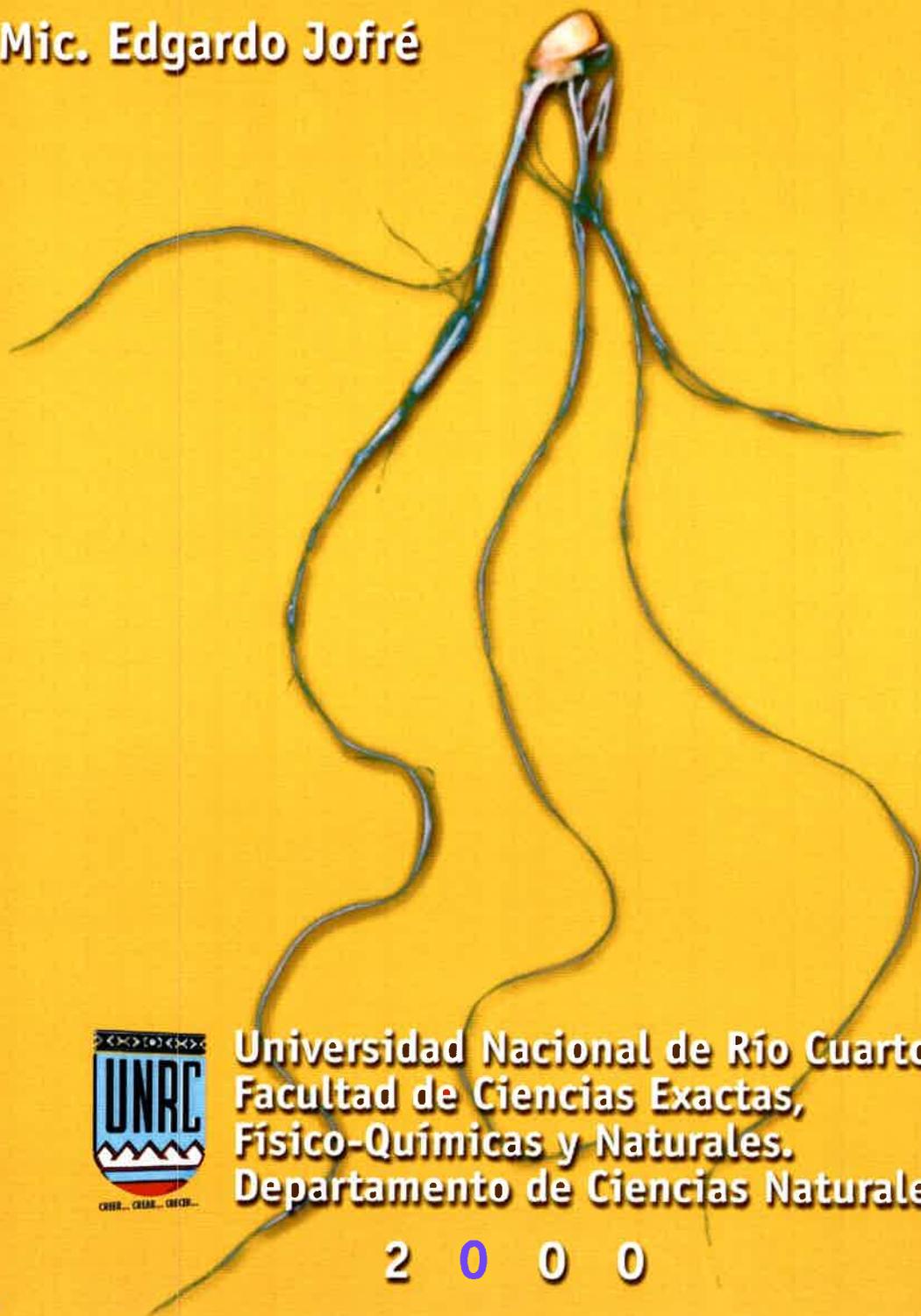


## Tesis Doctoral:

# "Adherencia de *Azospirillum brasilense* a raíces de *Zea mays* y su colonización bajo condiciones de estrés salino"

Mic. Edgardo Jofré



Universidad Nacional de Río Cuarto  
Facultad de Ciencias Exactas,  
Físico-Químicas y Naturales.  
Departamento de Ciencias Naturales.

2 0 0 0

7. 159



53020



*Universidad Nacional de Río Cuarto*  
*Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales*  
*Departamento de Ciencias Naturales*

Tesis Doctoral:

**“Adherencia de *Azospirillum brasilense* a raíces  
de *Zea mays* y su colonización bajo  
condiciones de estrés salino”**

**Autor: Mic. Edgardo Jofré**

**Director: Dra. Gladys Mori**

**Tribunal evaluador:**

**Dr. Antonio Lagares**

**Dra. Mirta García**

**Dr. Rubén Bottini**

**-2000-**

NO SE PRESTA



*National University of Río Cuarto*  
*Faculty of Exact, Physical-Chemical and Natural Sciences*  
*Department of Natural Sciences*

PhD Thesis of Biological Sciences:

**“Attachment of *Azospirillum brasilense* to *Zea mays*  
roots and their colonization under saline stress  
conditions”**

**Author: Mic. Edgardo Jofré**

**Director: Dr. Gladys Mori**

**Jury:**

**Dr. Antonio Lagares**

**Dr. Mirta García**

**Dr. Rubén Bottini**

**-2000-**

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Ciencias Naturales, Orientación Biología General, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, y se presenta como requerimiento para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Directora: Dra. Gladys Mori

Aprobada por el Tribunal de Tesis:



Dr. Antonio Lagares



Dr. Rubén Bottini



Dra. Mirta García





*A mis Padres con mucho cariño*

*A mi abuela, a quien extraño profundamente, por todo  
su cariño y afecto brindado durante mi adolescencia*

*A mis amigos por saber llenar el vacío de un hermano*

- *A la Dra Gladys Mori por su dirección científica, por iniciarme en el camino de la Ciencia, por su constante estímulo, su eterna disposición, flexibilidad e infinita confianza brindados a lo largo de estos años. Agradezco también su ejemplo, no sólo como científica sino también como "Persona". Por todo ello mis más sinceros agradecimientos y admiración.*

- *Al Dr. Antonio Lagares quien incondicionalmente me brindó la posibilidad de realizar parte de este trabajo en su laboratorio, por su valioso aporte científico, su constante interés, disposición y por su calidad humana. Muchas gracias.*

- *A los Doctores Antonio Lagares, Mirta García y Rubén Bottini, miembros de la Comisión Especial de Tesis y del Tribunal Evaluador, por el valioso aporte intelectual brindado durante el desarrollo de este trabajo de Tesis.*

- *A mi mejor amigo, Daniel Magoia por permitirme ser partícipe de tantos momentos inolvidables, por su sinceridad, honestidad, su desbordante alegría y ganas de vivir y por su apoyo incondicional en todo momento.*

- *A mi amigo y compañero Jorge Angelini por su estímulo y ayuda ofrecida en todo momento, por los consejos brindados y por su simpatía y buen humor.*

- *A mis amigos Silvia Foglino, Jorge Angelini, Silvio Maurutto, , Ignacio De Piccoli, Rita Ferreyra, Marta Dardanelli y Gabriela Salaburu muchas gracias por el apoyo brindado y por los momentos compartidos.*

- A mis amigas/os Ana, Sandra, Ariel, Eduardo, y Rosana, por brindarme su amistad desinteresadamente, y por compartir momentos muy gratos.

- A las Dras. Adriana Fabra, Stella Castro y Viviana Rivarola, por la amistad, apoyo y estímulo brindados desde siempre.

- A Tania Taurián por su aliento, apoyo y disposición.

- A mis compañeros de laboratorio Tania, Vanina, Sonia, Ana, Gabriela, Candelaria, Carolina y Daniela por los momentos compartidos.

- Al Departamento de Microbiología e Inmunología por la facilidad brindada en todo momento para el uso de aparatos.

- Al Departamento de Ciencias Naturales y Biología Molecular que hicieron posible de una forma u otra la realización de este trabajo de Tesis

- A la Universidad Nacional de Río Cuarto por haberme formado.

- A mi querida escuela Industrial por haberme disciplinado con rigor en el estudio y por haberme orientado hacia la Microbiología.

- A la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto y al Consejo de Investigaciones Científicas de la Provincia de Córdoba por otorgame las becas que hicieron posible la realización de este trabajo.

- A todos aquellos que directa o indirectamente contribuyeron a la realización de este trabajo.

*“El objeto de toda discusión no debe  
ser el triunfo sino el progreso”*

*J. Joubert*

# ÍNDICE:

	página
<b>Resumen:</b>	1
<b>Abstract:</b>	3
<b>Abreviaturas empleadas:</b>	4
<b>I. INTRODUCCIÓN:</b>	7
<b>I.1. La problemática actual:</b>	8
<b>I.2. El cultivo de maíz:</b>	12
<b>I.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal:</b>	14
<b>I.4. El género <i>Azospirillum</i>:</b>	15
<b>I.5. Fijación de nitrógeno:</b>	16
<b>I.6. Producción de fitohormonas:</b>	19
<b>I.7. Floculación y formación de cistos:</b>	20
<b>I.8. Antagonismo con otros microorganismos de suelo:</b>	21
<b>I.9. Motilidad y quimiotaxis:</b>	21
<b>I.10. Adherencia:</b>	23
<b>I.10.a. Rol del flagelo polar de <i>Azospirillum brasilense</i>             en la adherencia:</b>	25
<b>I.10.b. Polisacáridos bacterianos involucrados en la             adherencia:</b>	25
<b>I.11. Colonización:</b>	28
<b>I.12. Estudios genéticos de la asociación <i>Azospirillum</i>-planta:</b>	29
<b>I.13. Condiciones de estrés:</b>	30
<b>I.14. La salinidad en las plantas:</b>	32
<b>II. OBJETIVOS:</b>	34
<b>II.1. Objetivo general:</b>	35
<b>II.2. Objetivos específicos:</b>	35

<b>III. MATERIALES Y METODOLOGIA:</b>	<b>36</b>
<b>III.1. Cepas bacterianas y plásmidos:</b>	<b>37</b>
<b>III.2. Condiciones de cultivo:</b>	<b>37</b>
<b>III.3. Viabilidad:</b>	<b>38</b>
<b>III.4. Conjugación de genes reporteros:</b>	<b>38</b>
<b>III.5. Preparación de semillas, cultivo de plántulas y obtención de exudados radicales:</b>	<b>39</b>
<b>III.6. Estudios de adherencia de <i>A. brasilense</i> a raíces de <i>Zea mays</i>:</b>	<b>39</b>
<b>III.6.a. Marcado con timidina de la bacteria:</b>	<b>40</b>
<b>III.6.b. Experimentos de adsorción bacteriana a raíces de maíz:</b>	<b>40</b>
<b>III.6.c. Experimentos de anclaje bacteriano a raíces de maíz:</b>	<b>41</b>
<b>III.7. Estudios de colonización de raíces de maíz por <i>A. brasilense</i>:</b>	<b>41</b>
<b>III.7.a. Determinación de la actividad <math>\beta</math>-galactosidasa:</b>	<b>41</b>
<b>III.7.b. Determinación del grado de colonización:</b>	<b>42</b>
<b>III.7.c. Determinación del patrón de colonización:</b>	<b>42</b>
<b>III.7.d. Estudios de adherencia y colonización de mutantes de <i>A. brasilense</i> Cd con alteraciones en los LPS y en el péptidoglucano (PG):</b>	<b>43</b>
<b>III.8. Caracterización de componentes superficiales de <i>A. brasilense</i> en condiciones normales y en estrés salino:</b>	<b>43</b>
<b>III.8.a. Polisacáridos:</b>	<b>43</b>
<b>III.8.a.i. Extracción de EPS:</b>	<b>43</b>
<b>III.8.a.ii. Determinación cualitativa y cuantitativa de EPS:</b>	<b>44</b>
<b>III.8.b. Glucanos:</b>	<b>44</b>
<b>III.8.c. Lipopolisacáridos:</b>	<b>44</b>
<b>III.8.d. Proteínas:</b>	<b>45</b>

III.8.d.i. Análisis de proteínas totales:	45
III.8.d.ii. Análisis de proteínas periplásmicas:	45
III.8.d.iii. Análisis de proteínas de membrana externa:	45
III.9. Transcripción de genes promotores de la fijación de nitrógeno:	46
III.10. Obtención de mutantes de <i>A. brasilense</i> Cd:	46
III.10.a. Mutagénesis por transposición:	46
III.10.b. Mutantes inducidas por luz UV:	47
III.10.c. Mutantes espontáneas:	47
III.10.d. Selección de mutantes deficientes e hiperproductoras de EPS:	47
III.10.e. Selección de mutantes con LPS alterados:	47
III.10.f. Selección de mutantes resistentes a estrés salino:	48
III.10.g. Selección de mutantes sensibles a estrés salino:	48
III.10.h. Curvas de crecimiento:	48
III.11. Caracterización genética de las mutantes de <i>A. brasilense</i> Cd Tn5-LPS <sup>a</sup> y Tn5-PG:	49
III.11.a. Extracción de ADN:	49
III.11.b. Extracción de plásmidos:	49
III.11.c. Digestión de ADN total con <i>EcoRI</i> :	50
III.11.d. Digestión del plásmido pSUP102 con <i>EcoRI</i> :	51
III.11.e. Ligación:	51
III.11.f. Preparación de células electrocompetentes:	52
III.11.g. Transformación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i> S17.1:	52
III.11.h. PCR de clones transformantes:	52
III.11.i. Mutagénesis reversa:	53
III.11.j. Hibridización de ADN (Southern blot):	54
III.11.k. Obtención de la sonda:	54
III.11.l. Transferencia de ADN a membranas de nylon:	54
III.11.m. Hibridización:	55

III.11.n. Subclonado:	55
III.11.o. Secuenciamiento:	56
III.11.p. Análisis de secuencia y búsqueda de homología:	56
III.12. Análisis estadístico:	56
III.13. Medios de cultivos empleados:	56
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:	59
IV.1. EFECTOS DEL ESTRÉS SALINO SOBRE LA ADHERENCIA DE <i>Azospirillum brasilense</i> A RAÍCES DE <i>Zea mays</i> :	60
IV.1.a. Estudios de adherencia de <i>Azospirillum     brasilense</i> a raíces de <i>Zea mays</i> usando isótopos radioactivos:	60
IV.1.a.i. Densidad óptica y viabilidad:	60
IV.1.a.ii. Adsorción de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd a raíz de maíz: Efecto del estrés salino:	61
IV.1.a.iii. Anclaje de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd a raíces de maíz: Efecto del estrés salino:	63
IV.1.b. Estudio de la Interacción <i>Azospirillum     brasilense-Zea mays</i> usando genes reporteros:	64
IV.1.b.i. Viabilidad:	64
IV.1.b.ii. Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de <i>Zea mays</i> :	65
IV.1.b.iii. Adsorción y anclaje de <i>Azospirillum       brasilense</i> Cd a raíces de plántulas de maíz crecidas bajo estrés salino:	66
IV.1.b.iv. Determinación del patrón de colonización de <i>Azospirillum brasilense</i> a raíces de plántulas de maíz:	67
IV.2. CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES SUPERFICIALES DE <i>Azospirillum brasilense</i> EN CONDICIONES NORMALES Y EN ESTRÉS SALINO:	71

<b>IV.2.a. Polisacáridos:</b>	<b>71</b>
<b>IV.2.a.i. Tinción con calcofluor:</b>	<b>71</b>
<b>IV.2.a.ii. Determinación cuantitativa de los exopolisacáridos (EPS) de <i>A. brasilense</i> bajo condiciones de estrés salino:</b>	<b>74</b>
<b>IV.2.a.iii. Determinación del contenido y perfil de glucanos de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd en condiciones de estrés salino:</b>	<b>74</b>
<b>IV.2.a.iv. Análisis de lipopolisacáridos (LPS) de <i>A. brasilense</i> Cd:</b>	<b>76</b>
<b>IV.2.b. Proteínas:</b>	<b>77</b>
<b>IV.2.b.i. Análisis de proteínas totales, periplásmicas y de membrana externa de <i>Azospirillum brasilense</i> Cd:</b>	<b>78</b>
<b>IV.3. TRANSCRIPCIÓN DE GENES PROMOTORES DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR EXUDADOS RADICALES EN CONDICIONES NORMALES Y DE ESTRÉS SALINO:</b>	<b>80</b>
<b>IV.3.a. Inducción de la transcripción de genes promotores de la fijación de nitrógeno por exudados radicales de maíz:</b>	<b>80</b>
<b>IV.3.a.i. Transcripción de genes promotores de la fijación de nitrógeno en <i>A. brasilense</i> bajo condiciones de estrés salino:</b>	<b>80</b>
<b>IV.3.a.ii. Inducción de la transcripción de <i>nifA</i> y <i>nifH</i> por exudados radicales de maíz:</b>	<b>81</b>
<b>IV.4. ESTUDIOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD EMPLEANDO MUTANTES PUNTUALES DE <i>Azospirillum brasilense</i> Cd ALTERADAS EN LA SÍNTESIS DE EXOPOLISACÁRIDOS:</b>	<b>85</b>
<b>IV.4.a. Selección de mutantes deficientes o hiperproductoras de EPS:</b>	<b>85</b>

<b>IV.5. ESTUDIOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD EMPLEANDO MUTANTES PUNTUALES DE <i>Azospirillum brasilense</i> Cd CON ALTERACIONES EN LOS LIPOPOLISACÁRIDOS:</b>	<b>89</b>
<b>IV.5.a. Obtención de mutantes por transposición de <i>Azospirillum brasilense</i>:</b>	<b>89</b>
<b>IV.5.a.i. Selección de mutantes con LPS alterado:</b>	<b>89</b>
<b>IV.6. ESTUDIOS DE ADHERENCIA Y COLONIZACIÓN DE MUTANTES DE <i>Azospirillum brasilense</i> Cd ALTERADAS EN SU LPS, E HIPERPRODUCTORA DE EPS:</b>	<b>94</b>
<b>IV.6.a. Anclaje y colonización de las mutantes de <i>A. brasilense</i> Cd Tn5-PG y <i>A. brasilense</i> Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> a raíces de plántulas de maíz:</b>	<b>94</b>
<b>IV.6.a.i. Anclaje:</b>	<b>94</b>
<b>IV.6.a.ii. Patrón de colonización:</b>	<b>95</b>
<b>IV.6.a.iii. Grado de colonización (endófitos):</b>	<b>103</b>
<b>IV.7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS MUTANTES DE <i>A. brasilense</i> Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> y Cd Tn5-PG:</b>	<b>104</b>
<b>IV.7.a. Clonado de los fragmentos conteniendo las inserciones Tn5:</b>	<b>104</b>
<b>IV.7.a.i. Amplificación mediante PCR de clones transformantes:</b>	<b>104</b>
<b>IV.7.a.ii. Análisis de Restricción:</b>	<b>104</b>
<b>IV.7.a.iii. Mutagénesis reversa:</b>	<b>106</b>
<b>IV.7.a.iv. Hibridización:</b>	<b>108</b>
<b>IV.7.b. Subclonado y secuenciamiento:</b>	<b>109</b>
<b>IV.8. SELECCIÓN DE MUTANTES DE <i>A. brasilense</i> Cd RESISTENTES O SENSIBLES A ESTRÉS SALINO:</b>	<b>116</b>
<b>IV.8.a. Selección de mutantes resistentes a la salinidad:</b>	<b>116</b>
<b>IV.8.a.i. Mutante inducida por luz UV:</b>	<b>116</b>
<b>IV.8.a.ii. Mutante espontánea:</b>	<b>116</b>

<b>IV.8.a.iii. Obtención de mutantes por transposición de <i>Azospirillum brasilense</i>:</b>	<b>116</b>
<b>IV.8.a.iii.1. Selección de mutantes resistentes a la salinidad:</b>	<b>117</b>
<b>IV.8.a.iii.2. Selección de mutantes sensibles a la salinidad:</b>	<b>117</b>
<b>V. CONCLUSIONES:</b>	<b>121</b>
<b>V.1. Conclusiones generales y perspectivas futuras:</b>	<b>125</b>
<b>VI. BIBLIOGRAFÍA:</b>	<b>127</b>

## Resumen:

En el presente trabajo se estudió la adherencia de *Azospirillum brasilense* a maíz y su colonización bajo condiciones de estrés salino generado mediante el agregado de 300 mM de NaCl. Se observó una disminución significativa en el número de bacterias que se adhieren a raíces de maíz tanto en la fase de adsorción, como en la de anclaje. La colonización de raíces de plántulas de maíz también se encontró alterada en estas condiciones. Cuando se analizaron componentes superficiales de la bacteria posiblemente implicados en la adherencia y colonización, se encontró que el estrés salino produce alteraciones en la producción de exopolisacáridos (EPS), en el perfil electroforético de lipopolisacáridos (LPS) y de proteínas de membrana externa. También se encontraron cambios significativos en componentes del periplasma de *Azospirillum brasilense* reflejados en modificaciones tanto en el perfil electroforético de las proteínas, como en el cromatográfico de glucanos con marcada disminución en la producción de estos últimos.

La transcripción de genes promotores de la fijación de nitrógeno tales como *nifA* y *nifH*, se encontró alterada en estrés salino, como así también la inducción de éstos por exudados radicales de maíz, sugiriendo que las alteraciones producidas por la salinidad afectan la respuesta de la bacteria a los exudados radicales. La transcripción de *nifH* en condiciones de salinidad está disminuida significativamente, lo que afectaría en forma negativa la capacidad de fijar nitrógeno.

Con el propósito de analizar con más detalle la participación de polisacáridos superficiales en la adhesión y colonización radical, como así también en la tolerancia a salinidad, se generaron y caracterizaron mutantes por inserción Tn5 con alteraciones en el péptidoglucano, la producción de EPS y la síntesis del LPS. Dichas mutantes fueron empleadas en estudios de tolerancia a salinidad, adherencia y colonización de raíces de maíz. Una de las mutantes alteradas en la síntesis del péptidoglucano e hiperproductora de EPS, mostró un retardo significativo en el crecimiento en medios salinos comparado con la cepa salvaje. Además se observó una capacidad muy disminuida para colonizar raíces de maíz tanto en condiciones normales como de estrés salino. Los resultados sugieren que el péptidoglucano como así también los EPS podrían estar involucrados tanto en la tolerancia a estrés salino como en la colonización radicular. El fragmento *EcoRI* interrumpido por el Tn5 fue clonado, subclonado y parcialmente secuenciado. Los

datos de secuencia indican que la producción alterada de EPS podría estar asociada a una alteración primaria en la síntesis del péptidoglucano causada por mutación en la D-alanina-D-alanina ligasa.

La mutante Tn5 con alteraciones en el perfil electroforético de los LPS tiene una capacidad muy disminuida de colonizar las raíces de maíz en condiciones normales, pero muestra mayor colonización que la cepa salvaje bajo condiciones de estrés salino. La adherencia de esta mutante no se encuentra alterada. El fragmento *EcoRI* interrumpido por el Tn5 fue clonado, subclonado y secuenciado. La secuencia parcial mostró significativa similitud con glucosa-1-fosfato timidil transferasa de *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium* y *Sinorhizobium meliloti*. Esta enzima participa en la biosíntesis del LPS y en *S. meliloti* está implicada en la biosíntesis del EPSII.

Por otra parte, se obtuvo una mutante Tn5-*lacZ* que presenta una disminución en la tolerancia a estrés salino, la cual permitirá estudiar los mecanismos de osmotolerancia.

Los resultados en su conjunto indican que los procesos de adherencia y colonización de *Azospirillum brasilense* se encuentran alterados bajo condiciones de salinidad. Posiblemente estas alteraciones estén asociadas a los cambios observados en los componentes de la superficie bacteriana producidos por el estrés salino.

Esta es la primera evidencia que refleja una posible participación de los LPS de *A. brasilense* en la colonización de raíces de maíz, como así también el primer estudio donde se obtienen y caracterizan mutantes de *A. brasilense* alteradas en la síntesis del péptidoglucano.

## Abstract:

The effect of saline stress on the adherence of *Azospirillum brasilense* to maize roots and the further colonization is studied. Bacteria growing in 300 mM NaCl are impaired to adhere to the root at both levels, adsorption and anchoring. Colonization is also altered. Looking for the molecular mechanisms of the alteration, changes in the LPS, EPS and protein composition of the bacterium surface were found. Moreover, periplasmic proteins and glucans also showed different patterns. Transcription of N<sub>2</sub> fixation promoter genes such as *nifA* and *nifH* was altered under saline stress, as well as their induction by the root exudates. One could infer that the molecular alterations caused by salinity are affecting the response of the bacteria to the exudates. *nifH* transcription is significantly diminished suggesting that nitrogen fixation could be affected.

With the objective to analyse in detail the participation of surface polysaccharides in the root attachment and colonization, two Tn5 mutants were obtained and characterized. One of them was altered in the peptidoglycan and in the EPS production and showed a significant growth delay in salinity when compared with the wild type strain. This mutant was impaired to colonize roots both, in standard conditions and under saline stress. The results indicate that the peptidoglycan and the glucans are involved in the salinity tolerance and in the root colonization. Genetic studies demonstrated that the altered production of EPS could be associated to an alteration in the synthesis of the peptidoglycan caused by a mutation in the D-alanine-D-alanine ligase. The Tn5 mutant with an altered LPS pattern showed an impairment to colonize the roots under standard conditions, but a better colonization when plants are under saline stress. Genetic studies showed that the altered LPS pattern is associated with an enzyme that participates in the LPS biosynthesis (glucose-1-phosphate thymidyltransferase).

A Tn5-*lacZ* mutant sensible to saline stress was obtained and will allow to study the osmotolerance mechanisms.

In conclusion, the results indicate that the adherence and colonization processes of *Azospirillum brasilense* Cd were altered under saline stress. The molecules affected are LPS, EPS, glucans and proteins.

## Abreviaturas empleadas:

<b>ADN:</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>AIA:</b>	Ácido indol acético
<b>ANOVA:</b>	Análisis de la varianza
<b>Ap:</b>	Ampicilina
<b>ASB:</b>	Albúmina sérica bovina
<b>ATasa:</b>	Adenilil Transferasa
<b>bp:</b>	Pares de base
<b>° C:</b>	Grados Celsius
<b>Cm:</b>	Cloramfenicol
<b>DO:</b>	Densidad óptica
<b>EPS:</b>	Exopolisacárido
<b>FBN:</b>	Fijación biológica de nitrógeno
<b>Fig.</b>	Figura
<b>g:</b>	Gramo
<b>GS:</b>	Glutamina sintetasa
<b>h:</b>	Hora
<b>ha:</b>	Hectárea
<b>IS:</b>	Secuencias de inserción
<b>Kb:</b>	Kilobase
<b>KDa:</b>	Kilodaltons
<b>Km:</b>	Kanamicina
<b>kV:</b>	Kilovoltios
<b>l:</b>	Litro
<b>L*:</b>	Medio Luria Bertani suplementado con CaCl <sub>2</sub> y MgSO <sub>4</sub>
<b>LB:</b>	Medio Luria Bertani
<b>LPS:</b>	Lipopolisacárido
<b>m:</b>	Metro
<b>M:</b>	Molar
<b>mg:</b>	Miligramo
<b>min:</b>	Minuto
<b>mm:</b>	Milímetro
<b>mM:</b>	Milimolar

<b>MML:</b>	Medio mínimo lactato
<b>ml:</b>	Mililitro
<b>Mpa:</b>	Megapascal
<b>MPCL:</b>	Medio Marin-Prével-Charpentier-Lavigne
<b>n:</b>	Número de casos
<b>N:</b>	Normal
<b>N<sub>2</sub>:</b>	Nitrógeno
<b>Nº:</b>	Número
<b>ND:</b>	No detectado
<b>ng:</b>	Nanogramo
<b>nm:</b>	Nanómetro
<b>NMF:</b>	Medio Mínimo M9 sin nitrógeno, con fructosa
<b>ONPG:</b>	Orto-nitrofenil galactopiranosido
<b>pBSK:</b>	pBluescript SK
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PGPR:</b>	Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal
<b>pH:</b>	Potencial hidrógeno
<b>prot:</b>	Proteína
<b>P/V:</b>	Relación peso en volumen
<b>Rf:</b>	Razón de frentes
<b>RNasa:</b>	Ribonucleasa
<b>rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>SDS:</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>seg:</b>	Segundo
<b>Tc:</b>	Tetraciclina
<b>TLC:</b>	Cromatografía en capa delgada
<b>Tn5:</b>	Transposón Tn5
<b>UFC:</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>UV:</b>	Ultravioleta
<b>V/V:</b>	Relación volumen en volumen
<b>wt:</b>	Tipo salvaje
<b>X-Gal:</b>	5-bromo-4 cloro-3 indolil-β-galactopiranosido
<b>μF:</b>	Microfaradios
<b>μg:</b>	Microgramo

**$\mu\text{M}$ :** Micromolar  
 **$\mu\text{l}$ :** Microlitro  
**%:** Porcentaje  
 **$\Omega$ :** Ohms

**I. INTRODUCCIÓN:**

## **I.1. La problemática actual:**

A partir del siglo XVII, los grandes avances del conocimiento científico, la agricultura, la industria, la medicina y la organización social hicieron posible que la población creciera de forma considerable. Las máquinas fueron sustituyendo poco a poco la mano de obra humana y animal, aumentando lentamente el conocimiento y los medios para controlar las enfermedades. La población mundial se quintuplicó en 300 años (pasando de 500 millones en 1650 a 2.500 millones en 1950) y el crecimiento fue más espectacular en las regiones donde se inventaron y aplicaron nuevas tecnologías.

Hacia 1950 se inicia una nueva fase en el crecimiento de la población. Se logra controlar el hambre y las enfermedades incluso en zonas que no habían alcanzado todavía un alto nivel de escolarización o que no estaban tecnológicamente desarrolladas. Las causas de este cambio fueron el bajo coste de importación de vacunas, antibióticos, insecticidas y variedades de semillas de alto rendimiento. Al mejorar la red de abastecimiento de agua, las instalaciones de alcantarillado y las redes de transporte, aumentaron las cosechas y disminuyó de forma notable el número de fallecimientos por enfermedades infecciosas y parasitarias. En la mayor parte de los países más desarrollados, la esperanza de vida al nacimiento pasó de 35-40 años en 1950 a 61 años en 1990. La rápida disminución de fallecimientos en una población con altos índices de fertilidad hizo que muchos países en vías de desarrollo alcanzaran un índice de crecimiento anual superior al 3,1%, índice que duplicaría la población en veintitrés años.

Las estimaciones de las Naciones Unidas publicadas en 1990 indican que la población mundial pasará de 5.300 millones de personas en 1990 a 6.200 millones en el año 2000 y a 8.500 millones en el 2025. Las estimaciones máxima y mínima para el año 2025 son de 9.100 millones y 7.900 millones respectivamente.

En los países en vías de desarrollo mucha gente padece ligeras deficiencias calóricas, y la mayoría de los habitantes padece deficiencias sustanciales en proteínas, minerales y vitaminas. Entre 1988 y 1990, se estimó que alrededor de un 20% de los habitantes de las regiones en desarrollo se alimentaba de forma inadecuada.

El suministro total de alimentos está en función de la superficie de tierra dedicada al cultivo y al rendimiento por unidad de superficie. Es posible, en muchas

situaciones, aumentar la superficie dedicada a la producción de alimentos, pero la viabilidad económica de un proyecto semejante es a menudo cuestionable. Con todo, existen grandes posibilidades de incrementar la producción de alimentos por unidad de superficie, tanto en los países desarrollados como en los países en vías de desarrollo, y se han logrado ya considerables avances en este sentido. La producción total a nivel mundial creció a un promedio anual de un 2% entre 1981 y 1991. Entre los países en vías de desarrollo, la tasa de crecimiento fue de alrededor de un 3,3%, pero el incremento en la producción de alimentos se vio en gran medida contrarrestado por el subsiguiente incremento de la población.

Un requerimiento fundamental para incrementar el rendimiento en la producción de alimentos procedentes de los cultivos y los animales es introducir un cambio en la actitud del ser humano respecto a su medio ambiente. La explotación debe abrir paso al reconocimiento de que la capacidad de sustento de la Tierra es limitada y del empleo de aquellas prácticas que mantengan o aumenten esta capacidad.

Los mayores incrementos en la producción de alimentos han sido resultado de adelantos científicos y tecnológicos, en especial, en los campos de la calidad nutritiva, la genética vegetal y animal, el control de plagas y enfermedades, y la alteración del medio ambiente. Se han logrado éxitos espectaculares en los países desarrollados, y se han registrado, como resultado, grandes incrementos en el suministro de víveres de ciertos países en vías de desarrollo.

La agricultura moderna depende en gran medida de la ingeniería, la tecnología y las ciencias biológicas y físicas: el riego, el drenaje, la conservación y la canalización, campos todos importantes para garantizar el éxito en la agricultura.

Casi el 50% de la población del mundo se dedica a la agricultura. La distribución, a finales de la década de 1980, variaba desde un 64% de la población activa en África hasta un 4% en Estados Unidos y Canadá. En Asia, la cifra era de un 61%; en América del Sur, un 24%; en Europa del Este y la antigua Unión Soviética (URSS), el 15%, y el 7% en Europa Occidental.

El paso hacia un incremento en la producción en el periodo posterior a la II Guerra Mundial fue el resultado de una nueva explosión demográfica. La necesidad de más alimentos fue paliada en parte por la llamada revolución verde, que implicó el cultivo selectivo de cosechas tradicionales en busca de mayores rendimientos, nuevos

híbridos, y métodos de cultivo intensivo adaptados a los climas y condiciones culturales de países densamente poblados como India. La crisis mundial del petróleo a mediados de la década de 1970, no obstante, redujo el abastecimiento de fertilizantes nitrogenados necesarios para el éxito de las nuevas variedades. Simultáneamente, un clima errático y desastres naturales como la sequía y las inundaciones redujeron las cosechas en todo el mundo. Parecía inminente el hambre en el subcontinente indio, y la hambruna se generalizó en muchas partes de África al sur del Sahara. La situación económica, en especial la inflación descontrolada, amenazaban por igual al productor y al consumidor de alimentos. Estos problemas se convirtieron en los factores determinantes del cambio y el desarrollo agrícolas.

El rápido avance tecnológico producido durante la Revolución Industrial, trajo consigo el descubrimiento, uso y explotación de los combustibles fósiles, así como la explotación extensiva de los recursos minerales de la Tierra. Fue con la Revolución Industrial cuando el hombre empezó realmente a cambiar la faz del planeta, la naturaleza de su atmósfera y la calidad de su agua. Hoy, la demanda sin precedentes a la que el rápido crecimiento de la población humana y el desarrollo tecnológico someten al medio ambiente está produciendo un declive cada vez más acelerado en la calidad de éste y en su capacidad para sustentar la vida.

Uno de los impactos que el uso de combustibles fósiles ha producido sobre el medio ambiente terrestre ha sido el aumento de la concentración de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en la atmósfera. Lo significativo de este cambio es que ha provocado un aumento de la temperatura de la Tierra a través del proceso conocido como efecto invernadero. El calentamiento global de la atmósfera tiene graves efectos sobre el medio ambiente: acelerando la fusión de los casquetes polares, haciendo subir el nivel de los mares, cambiando el clima regional y globalmente, alterando la vegetación natural y afectando a las cosechas.

Asociada también al uso de combustibles fósiles, se encuentra la deposición ácida. La lluvia ácida es un importante problema global, ya que corroe los metales, desgasta los edificios y monumentos de piedra, daña y mata la vegetación y acidifica lagos, corrientes de agua y suelos.

El uso extensivo de pesticidas sintéticos derivados de los hidrocarburos clorados en el control de plagas ha tenido efectos colaterales desastrosos para el medio

ambiente. Estos pesticidas organoclorados son muy persistentes y resistentes a la degradación biológica. Muy poco solubles en agua, se adhieren a los tejidos de las plantas y se acumulan en los suelos, el sustrato del fondo de las corrientes de agua y los estanques, y la atmósfera. Una vez volatilizados, los pesticidas se distribuyen por todo el mundo, contaminando áreas silvestres a gran distancia de las regiones agrícolas, e incluso en las zonas ártica y antártica.

Un número cada vez mayor de seres humanos empieza a cercar las tierras vírgenes que quedan, incluso en áreas consideradas más o menos a salvo de la explotación. La insaciable demanda de energía ha impuesto la necesidad de explotar el gas y el petróleo de las regiones árticas, poniendo en peligro el delicado equilibrio ecológico de los ecosistemas de tundra y su vida silvestre. Los bosques tropicales, sobre todo los del sureste de Asia y los de la cuenca del río Amazonas, están siendo destruidos a un ritmo alarmante para obtener madera, despejar suelo para pastos y cultivos, para plantaciones de pinos y para asentamientos humanos. Esta deforestación tropical podría llevar a la extinción de hasta 750.000 especies, lo que representaría la pérdida de toda una multiplicidad de productos: alimentos, fibras, fármacos, tintes, gomas y resinas.

La erosión del suelo se está acelerando en todos los continentes y está degradando entre la quinta y la tercera parte de las tierras de cultivo de todo el mundo, lo que representa una seria amenaza para el abastecimiento global de víveres. Por ejemplo, la erosión está minando la productividad de un 34% del total de las tierras de cultivo de Estados Unidos. En el Tercer Mundo, la creciente necesidad de alimentos y leña han tenido como resultado la deforestación y cultivo de laderas con mucha pendiente, lo que ha producido una severa erosión de las mismas. Para complicar aún más el problema, hay que tener en cuenta la pérdida de tierras de cultivo de primera calidad debido a la industria, los pantanos, la expansión de las ciudades y las carreteras. La erosión del suelo y la pérdida de las tierras de cultivo y los bosques reduce además la capacidad de conservación de la humedad de los suelos y añade sedimentos a las corrientes de agua, los lagos y los embalses.

En junio de 1992, la Conferencia sobre Medio Ambiente y Desarrollo de las Naciones Unidas, también conocida como la Cumbre de la Tierra, se reunió durante 12 días en Río de Janeiro, Brasil. Esta cumbre desarrolló y legitimó una agenda de medidas relacionadas con el cambio medioambiental, económico y político. El propósito

de la conferencia era determinar qué reformas medioambientales eran necesarias emprender a largo plazo, e iniciar procesos para su implantación y supervisión internacionales. Los principales temas abordados en estas convenciones incluían el cambio climático, la biodiversidad, la protección forestal, la Agenda 21 (un proyecto de desarrollo medioambiental de 900 páginas) y la Declaración de Río (un documento de seis páginas que demandaba la integración de medio ambiente y desarrollo económico). La II Cumbre de la Tierra, celebrada en junio de 1997 en Nueva York, tuvo como principal objetivo constatar las decisiones tomadas en Río de Janeiro, no arrojando nada concluyente en lo que se refiere a las medidas a adoptar para combatir la situación del hambre en el mundo y al crecimiento de la población mundial. Las perspectivas de futuro, en lo que al medio ambiente se refiere son poco claras.

A pesar de nuestros conocimientos sobre cómo reducir la erosión del suelo, éste continúa siendo un problema de alcance mundial. Esto se debe, en gran medida a que muchos agrónomos y urbanistas muestran un escaso interés por controlarla. Por último, la destrucción de tierras vírgenes, tanto en las regiones templadas como en las tropicales, puede producir una extinción masiva de formas de vida vegetales y animales.

El impacto de la especie humana sobre el medio ambiente ha sido comparado con las grandes catástrofes del pasado geológico de la Tierra; independientemente de la actitud de la sociedad respecto al crecimiento continuo, la humanidad debe reconocer que atacar el medio ambiente pone en peligro la supervivencia de su propia especie.

## **I.2. El cultivo de maíz:**

El maíz es originario de América, donde era el alimento básico de las culturas americanas muchos siglos antes de que los europeos llegaran al Nuevo Mundo.

El maíz es un alimento básico para el hombre y una importante planta forrajera para los animales. Constituye una fuente excelente de hidratos de carbono; el grano de maíz contiene un 13% de proteínas y un 7% de grasas, por lo que la dieta debe complementarse con alimentos proteicos.

La mazorca de maíz y sus desechos, hojas, tallos, raíces y orujos contiene gran cantidad de furfural, utilizado en la fabricación de fibras de nailon y plásticos de fenol-formaldehido, el refinado de resinas de madera, la obtención de aceites lubricantes a partir

del petróleo y la purificación del butadieno para producir caucho sintético. Con las mazorcas molidas se fabrica un abrasivo blando. Con las mazorcas de gran tamaño de cierta variedad se hacen pipas para tabaco. El aceite de maíz, extraído del germen del grano, se consume como grasa alimenticia, tanto para cocinar como crudo o solidificado, en forma de margarina; también se emplea en la fabricación de pinturas, jabones y linóleo. La investigación de nuevas fuentes de energía se ha fijado en el maíz; muy rico en azúcar, a partir de él se obtiene un alcohol que se mezcla con petróleo para formar el llamado gasohol; las partes vegetativas secas son importante fuente potencial de combustible de biomasa.

En términos de rendimiento mundial, el maíz es en este momento el tercer cultivo para grano más importante, siguiendo muy de cerca al arroz. En nuestro país, en los últimos años la utilización del grano de maíz se ha ido incrementando de manera tal que durante el período 1987/1996 alrededor de 1,4 millones de toneladas se industrializaron anualmente; a su vez, durante dicho período, el volumen de grano de este cultivo destinado a la industria se incrementó a razón de aproximadamente 30 mil toneladas por año (Bolsa de Cereales, 1997). Es de destacar que Córdoba es la segunda provincia en orden a la producción agrícola del país en general, y de maíz en particular (25%), después de Buenos Aires. En el centro-sur de la provincia se ha empezado a desarrollar la siembra directa de este cultivo (Espósito *et al.*, 1997) como sistema que tiende a conservar el recurso suelo, contrarrestando los aspectos negativos asociados al laboreo convencional (Marelli, 1994). Sin embargo, es sabido que durante los primeros años de implementada la siembra directa, existe una menor disponibilidad de nutrientes para los cultivos. A este problema se le asocian otras condiciones de infertilidad del suelo; así, en la zona centro-sudeste de la Provincia de Córdoba, área representativa de la subregión Pampa inferior, existen más de  $1,5 \times 10^6$  ha (Cantero y Cantú, 1980, citado en Cantero *et al.*, 1996) con características hidrohalomórficas vinculadas a deficiente drenaje superficial y subterráneo. Los desajustes en el uso agrícola de las tierras de esta área han incrementado los riesgos de deterioro por salinización, lo cual se ha traducido en un aumento de la superficie afectada, habiéndose revegetado con especies de baja preferencia animal y limitado potencial productivo (Cantero *et al.*, 1996). Además de lo mencionado específicamente para la provincia de Córdoba, en todos los continentes hay extensas áreas con suelos afectados por problemas de salinidad y/o alcalinidad. Según Graham (1991) en Latino América, la superficie afectada es de 400 a 950 millones de ha.

De todo lo expresado más arriba surge el siguiente planteo:

¿Cómo mejorar el rendimiento de las cosechas de cereales como el maíz en la región y el país, teniendo en cuenta la problemática actual concerniente al crecimiento de la población y la gran demanda de alimento, sumado a los problemas de cambios climáticos, efecto invernadero, contaminación, mal aprovechamiento de los suelos y condiciones de infertilidad?

### **1.3. Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal:**

Una respuesta a la pregunta del párrafo anterior es la posibilidad de implementar inoculaciones con microorganismos de suelo capaces de promover el crecimiento vegetal, denominadas colectivamente rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Ello permitiría, además, lograr un reemplazo parcial de los fertilizantes, que son agregados en elevadas cantidades en los cultivos, disminuyendo el peligro de contaminación y desequilibrio en el medio ambiente, al mismo tiempo que se reducirían los costos. En este sentido, Döbereiner (1997) afirma que Brasil se ha convertido en el país con menor aplicación de fertilizantes nitrogenados, siendo reemplazados por la fijación biológica de nitrógeno (FBN).

La FBN por leguminosas en simbiosis con *Rhizobium spp.*, ha sido bien estudiada desde su descubrimiento por Hellriegel y Wilfarth (1888). En el caso de los principales granos para alimentación y forraje, como cereales (maíz, trigo, arroz, sorgo, mijo) y gramíneas, al no pertenecer a la familia de las leguminosas, se pensó inicialmente que no tenían potencial en lo que respecta a la FBN. Esporádicos reportes de fijación de nitrógeno no simbiótica asociada con gramíneas tropicales aparecieron hace tres décadas, pero dicho descubrimiento parecía controversial, hasta que el desarrollo de la técnica de reducción del acetileno condujo a la estimación "in situ" de la actividad nitrogenasa (Schöhlhorn y Burris, 1966). Con esta herramienta, la FBN no simbiótica quedó demostrada de manera inequívoca en arroz, maíz, mijo y una variedad de gramíneas tropicales (Dommergues *et al.*, 1973; Yoshida y Ancajas, 1973; Smith *et al.*, 1976). Estos descubrimientos fueron el detonante para el inicio de una intensa búsqueda de asociaciones entre microorganismos diazotróficos y no leguminosas.

Así, numerosas bacterias fijadoras de nitrógeno fueron identificadas y clasificadas en diversos géneros incluyendo *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Pseudomonas* y otros. Estos microorganismos fueron aislados a

partir de suelo rizosférico, superficie radical y aún del interior de las raíces, donde ocasionalmente se encuentran en números elevados (Van Berkum y Bohlool, 1980; Elmerich, 1985; Balandreau, 1986; Döbereiner y Pedrosa, 1987).

#### **1.4. El género *Azospirillum*:**

Aunque *Azospirillum* fue descubierto inicialmente por Beijerinck (1925) como una bacteria de suelo, Gram negativa, de forma espiralada y posiblemente fijadora de nitrógeno, no se prestó suficiente atención a este descubrimiento, lo cual condujo a que se olvidara por cincuenta años. El género fue redescubierto durante la búsqueda de fijadores de nitrógeno asociativos, aislándose de las raíces de *Digitaria* y *Zea mays* (Von Bulow y Döbereiner, 1975; Day y Döbereiner, 1976). Posteriormente *Azospirillum* ha sido aislado a partir de una amplia variedad de plantas incluyendo numerosas gramíneas y cereales de casi todo el mundo, tanto en climas tropicales, como templados y fríos, plantas desérticas, plantas de pantanos y suelo afectados por salinidad (Haahtela *et al.*, 1981; Lamm y Neyra, 1981; Rao y Venkateswarlu, 1982; Klossak y Bohlool, 1983; Krieg y Döbereiner, 1984; Reinhold *et al.*, 1987). Sin embargo solo en la rizosfera de algunas vegetaciones tropicales, *Azospirillum* se encuentra en cantidades importantes. En hábitats fríos y templados estas bacterias son desplazadas por microorganismos rizosféricos más competentes.

El número de bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas fue incrementándose, con el descubrimiento de nuevas especies. De esta manera *Acetobacter* fue descubierto en asociación con caña de azúcar y llamado *Acetobacter diazotrophicus*. Este microorganismo presenta características inusuales con respecto a la FBN (Döbereiner, 1989). En la actualidad, el género *Azospirillum* cuenta con las siguientes especies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferens* y *A. irakense*.

La contribución a la nutrición de la planta, ha sido una materia de controversia por mucho tiempo. A comienzo de la década del 80 las técnicas de balance de nitrógeno y <sup>15</sup>N demostraron que en sistemas tropicales, las bacterias fijadoras de nitrógeno asociativas contribuían significativamente al aporte de nitrógeno de la planta (App *et al.*, 1980; Eskew *et al.*, 1981; Boddey *et al.*, 1983) Sin embargo en climas templados parecería que no ocurre fijación de nitrógeno. En ambas asociaciones de *Azospirillum* (climas templados y tropicales), la incorporación de nitrógeno fijado biológicamente a la planta resultó ser menor que la esperada e insuficiente para justificar el incremento en el

contenido de nitrógeno de las plantas inoculadas en comparación con las no inoculadas (Kapulnik *et al.*, 1985; Boddey *et al.*, 1986). Solamente en la asociación entre *Azospirillum halopraeferens* con Kallar grass podría ser demostrado un flujo de nitrógeno fijado biológicamente hacia la planta (Malik y Zafar, 1985).

A pesar de ello la inoculación con *Azospirillum* puede producir un incremento significativo en la cosecha de granos bajo ciertas condiciones de suelo y medio ambiente, aún en ausencia de un sustancial aporte de nitrógeno fijado biológicamente, por lo que es considerado como PGPR (Croes *et al.*, 1993).

De lo mencionado anteriormente resulta evidente que procesos adicionales, distintos de la fijación de nitrógeno, deberían ser los responsables de estos efectos benéficos. A consecuencia de ello se expandió la búsqueda de dichos efectos sobre el crecimiento de la planta en las inoculaciones con *Azospirillum*, dejando por un momento de lado el único foco de estudio en ese entonces en las rizobacterias diazotróficas, la FBN. Actualmente el énfasis está puesto en la asociación con las raíces de las plantas y en elucidar los mecanismos de interacción.

A pesar de la gran cantidad de datos experimentales acumulados, concernientes a la estimulación del desarrollo de la planta por *Azospirillum*, el modo exacto de acción por el cual la bacteria es capaz de estimular el crecimiento de la planta no se conoce en su totalidad. Tres mecanismos han sido propuestos:

- Fijación de nitrógeno, mediante el cual el nitrógeno molecular es reducido a compuestos asimilables por la planta.
- La producción de sustancias semejantes a fitohormonas, que alteran el crecimiento y morfología de la planta.
- La reducción bacteriana de nitratos, la cual incrementa la acumulación de nitrógeno en plantas inoculadas.

### **1.5. Fijación de nitrógeno:**

*Azospirillum* spp. fija nitrógeno atmosférico a bajas tensiones de oxígeno bajo condiciones de ayuno de amonio. La reducción del nitrógeno molecular es catalizada por la enzima nitrogenasa, una enzima compleja que consiste de dos componentes: (1) dinitrogenasa o proteína Fe-Mo (producto de los genes *nifDK*), la cual contiene el sitio activo de la reducción del dinitrógeno, y (2) la dinitrogenasa reductasa o proteína Fe (producto del gen *nifH*), la cual suministra el poder reductor a la dinitrogenasa. La fijación

biológica de nitrógeno es un proceso que demanda un alto costo energético, por lo cual está sujeto a un estricto control en todos los diazótrofos. En este sentido, *Azospirillum* tiene un complicado sistema para el control de la fijación de nitrógeno en respuesta a las condiciones del medio ambiente (Zhang *et al.*, 1997; Elmerich *et al.*, 1997); y éste es ejercido tanto a nivel de síntesis como de actividad de la nitrogenasa (Vande Broek y Vanderleyden, 1995). Como es el caso de todas las bacterias Gram negativas fijadoras de nitrógeno estudiadas hasta ahora, la expresión de los genes *nifHDK* en *Azospirillum* es dependiente de un factor sigma alternativo,  $\sigma^{54}$  (NtrA, RpoN), y de la proteína activadora transcripcional NifA. La inactivación de los genes *nifA* o *ntrA* en *A. brasilense* conduce a mutantes que exhiben un fenotipo Nif<sup>-</sup>. No se observa expresión de *nifH* en estas mutantes, lo cual refleja el estricto requerimiento de  $\sigma^{54}$  y NifA para la activación de los genes estructurales de la nitrogenasa (Liang *et al.*, 1991; Milcamps *et al.*, 1994).

Los genes para la fijación de nitrógeno están muy conservados entre los diazótrofos y el requerimiento del producto de *nifA* para su activación parece ser una regla general en proteobacterias. Sin embargo diferentes vías regulatorias para el metabolismo del nitrógeno han evolucionado en diferentes grupos de bacterias fijadoras de nitrógeno. En el sistema modelo de *Klebsiella pneumoniae*, los genes *ntrBC* y *glnA* se encuentran agrupados y codifican para las proteínas regulatorias de dos componentes NtrB y NtrC y glutamina sintetasa (GS), respectivamente. La proteína P<sub>II</sub>, codificada por *glnB*, que se encuentra en el cromosoma, juega un rol central, coordinando la respuesta del sistema Ntr al estatus intracelular de nitrógeno. Según la proporción entre las concentraciones de 2-cetoglutarato y glutamina, la uridilil transferasa cambia esta proteína de una forma uridililada, P<sub>II</sub>-UMP, bajo condiciones de limitación de nitrógeno, a una forma no uridililada, P<sub>II</sub>, bajo condiciones de exceso de nitrógeno. Cuando P<sub>II</sub> está ausente o bajo su forma uridililada, NtrB fosforila NtrC. NtrC-P activa la transcripción de *glnA-ntrBC*, lo cual resulta en un aumento en los niveles de síntesis de NtrB, NtrC y GS. NtrC-P también activa el operón *nifLA*, y el producto de *nifA* activa los otros operones *nif*. La transcripción de todos estos genes requiere la presencia de un factor  $\sigma^{54}$  codificado por *ntrA* (*rpoN*). P<sub>II</sub>-UMP también promueve la formación vía ATasa (adenilil transferasa) de una GS no adenililada activa. Contrariamente, bajo condiciones de exceso de nitrógeno, P<sub>II</sub> no es uridililada. NtrB desfosforila a NtrC-P. La forma no modificada de NtrC reprime la transcripción de *glnA-ntrBC* e interrumpe la transcripción de *nifLA* y de todos los otros operones *nif*. P<sub>II</sub> no uridililada también promueve la formación vía ATasa de una forma de GS adenililada inactiva ( de Zamaroczy *et al.*, 1993).

En *A. brasilense* la actividad GS es modulada por adenilación. Cepas mutantes dañadas en la actividad GS y fijación de nitrógeno han sido aisladas por mutagénesis química. Su fenotipo fue  $\text{Gln}^- \text{Nif}^+$  o  $\text{Gln}^- \text{Nif}^c$  (actividad nitrogenasa en presencia de  $\text{NH}_4$ ). Un plásmido conteniendo un solo gen funcional *glnA*, restaura el fenotipo salvaje para ambas mutantes, sugiriendo que GS juega un rol central en la fijación de nitrógeno. En contraste a lo que ocurre en *K. pneumoniae*, en *A. brasilense* *glnB* y *glnA* están agrupados y *ntrB* y *ntrC* también lo están, pero localizados en otra parte del cromosoma. Esta organización es similar a la encontrada en *R. leguminosarum*, *B. japonicum* y *Rhodobacter capsulatus*.

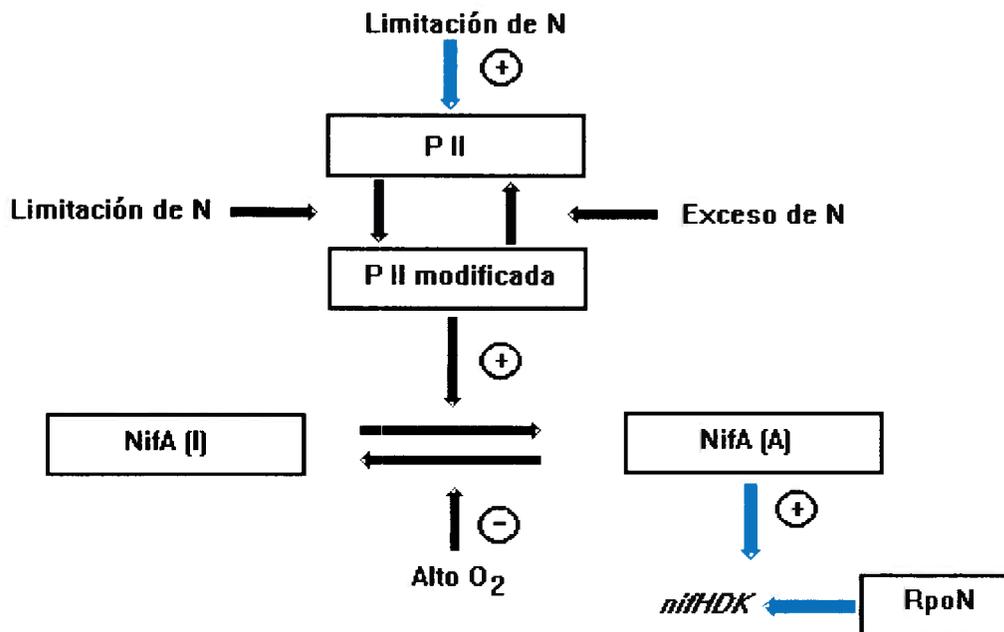
Bajo condiciones de limitación de nitrógeno, *glnA* y *glnB*, en *A. brasilense*, son cotranscritos a un alto nivel a partir de un promotor dependiente de  $\sigma^{54}$ . Bajo condiciones de exceso de nitrógeno, los genes son cotranscritos a un nivel más bajo a partir de un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$ , el cual solapa a una secuencia reminiscente de un sitio de unión de NtrC. En contraste, la transcripción de *glnA* parece sólo ser dependiente de un tipo novel de promotor regulado por nitrógeno, el cual es altamente activo bajo condiciones de exceso de nitrógeno.

La transcripción del cluster *glnB-glnA* en *A. brasilense* depende de tres promotores diferentes regulados por nitrógeno y selectivamente usados y no involucra el sistema regulatorio de dos componentes NtrB-NtrC (de Zamaroczy *et al.*, 1996). Liang *et al.* (1991) observaron que las inserciones Tn5 en las secuencias codificantes de *ntrBC* no resultaron en un fenotipo  $\text{Nif}^-$ . Así fue demostrado que NtrB y NtrC no fueron esenciales para la fijación de nitrógeno en *A. brasilense*.

Por otra parte una mutante nula *glnB* no tiene afectada la asimilación de amonio, pero es estrictamente  $\text{Nif}^-$ . Así parece que *A. brasilense* es la única especie conocida en la cual *glnB* es esencial para la fijación de nitrógeno. Más aún, la proteína P<sub>II</sub> es requerida para modular la actividad de NifA en respuesta a cambios en los niveles celulares de nitrógeno (de Zamaroczy *et al.*, 1996).

Promotores dependientes de  $\sigma^{54}$  también han sido encontrados cuesta arriba de *nifH* y *nifB*, y la activación de la transcripción requiere NifA. La regulación de la expresión de *nifA* en *A. brasilense* es inusual: la expresión fue observada no solamente bajo condiciones de fijación de nitrógeno sino también en condiciones incompatibles con la fijación de nitrógeno, por ejemplo, en presencia de  $\text{NH}_4$  y oxígeno. En las últimas condiciones NifA parece estar en una forma inactiva.

Modelo hipotético para la regulación de la biosíntesis de la nitrogenasa en *A. brasilense* (Vande Broek y Vanderleyden, 1995)



Las flechas negras indican regulación a nivel transcripcional, las flechas celestes indican modulación de la actividad.

### I.6. Producción de fitohormonas:

Moléculas orgánicas relativamente simples, tales como las fitohormonas auxinas y citocininas, juegan roles cruciales en la elicitación de la totipotencia de varios tipos de células de plantas y en la regulación de los procesos fisiológicos de las plantas.

Las células que responden a auxinas revierten a un estado de dediferenciación; la aplicación de auxinas tiene la capacidad de "borrar" la fisiología programada genéticamente del tejido vegetal, para estimular la elongación de la pared celular e incrementar la transcripción de varios genes. Las citocininas estimulan la división celular y el crecimiento de callos en células vegetales. El balance entre los niveles de auxinas y citocininas controla la diferenciación y organogénesis celular en cultivos de órganos y

tejidos, variando desde la proliferación de tallo a la formación de raíces a medida que la proporción auxinas/citocininas aumenta.

Interesantemente las fitohormonas no son únicamente sintetizadas por plantas, sino también por microorganismos, incluyendo hongos y bacterias. Así la capacidad de sintetizar ácido indol acético (AIA) está ampliamente distribuida entre bacterias de suelo y asociadas a plantas.

En este sentido *Azospirillum* posee la capacidad de sintetizar y excretar fitohormonas tales como citocininas, auxinas y giberelinas (Bottini *et al.*, 1989; Prinsen *et al.*, 1993). Los cambios morfológicos en las raíces de las plantas observados después de la inoculación de *Azospirillum* fueron atribuidos a efectos semejantes a auxinas (Bashan *et al.*, 1989a). En varios estudios se ha propuesto que el incremento en el crecimiento de plantas inoculadas con *Azospirillum* es debido a la producción de fitohormonas bacterianas (Fulchieri *et al.*, 1993). Así por ejemplo, la inoculación de trigo con una mutante Tn5 de *A. brasilense* SpM7918 con muy baja producción de AIA, mostró una habilidad reducida en promover el desarrollo radical comparada con la cepa salvaje Sp6. Por otra parte la inoculación de semillas pregerminadas de maíz con mutantes de *A. brasilense* hiperproductoras de AIA produce un aumento significativo del crecimiento radical.

### **1.7. Floculación y formación de cistos:**

Bajo diferentes condiciones de estrés, *Azospirillum* posee la capacidad de formar cistos y flocular (formación de agregados visibles). La formación de cistos involucra una diferenciación de las células vegetativas en formas encapsuladas C, altamente refráctiles, no móviles y con alto contenido de gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato. La formación de cistos ocurre bajo diferentes condiciones, entre las que se encuentran el envejecimiento del cultivo (Sadasivan y Neyra, 1987), condiciones de cultivo (Bleakley *et al.*, 1988), exposición a metales tóxicos (Gowri y Srivastava, 1996) o déficit de agua (Bashan *et al.*, 1991). Estas formas son resistentes a la desecación, irradiación  $\gamma$  y luz ultra-violeta y confieren la capacidad de sobrevivencia bajo condiciones físico-químicas desfavorables. Previamente los cistos de *Azospirillum brasilense* eran considerados formas durmientes de esta bacteria, pero más tarde se demostró que son fisiológicamente activos en la rizosfera de trigo (Assmus *et al.*, 1995) y que pueden fijar nitrógeno en ausencia de una fuente de carbono exógena (Okon e Itzigsohn, 1992).

Cuando *Azospirillum* crece en presencia de fructosa y nitrato, se promueve la síntesis de polisacáridos extracelulares, lo cual conduce a la formación de agregados celulares llamados flóculos (Arunakumari *et al.*, 1992; Sadasivan y Neyra, 1985, 1987). El crecimiento de *Azospirillum* en presencia de fructosa produce una mayor adsorción a raíces de maíz, lo cual resulta en un incremento en la superficie radical y en el peso seco de la parte aérea y radical, comparado con células cultivadas en malato.

Debido a las ventajas en la sobrevivencia de los cistos de *Azospirillum* sobre las células vegetativas, Neyra *et al.* (1995), han sugerido la generación de inoculantes compuestos de una mezcla de cistos y células vegetativas rodeadas de una red de polisacáridos.

### **1.8. Antagonismo con otros microorganismos de suelo:**

El antagonismo con otros microorganismos competidores es una propiedad que contribuye a la competitividad. Muchas cepas de *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum lipoferum* poseen la capacidad de producir bacteriocinas, las cuales inhiben a bacterias estrechamente relacionadas en ensayos *in vitro*; sin embargo no está claro si estas bacteriocinas tienen un impacto significativo en la ecología de la rizosfera.

Por otra parte, *Azospirillum* también posee un eficiente sistema de adquisición de Fe, mediante la producción de compuestos complejos denominados sideróforos, los cuales secuestran el Fe (III) en la rizosfera, limitando su disponibilidad a otros microorganismos, cuyo crecimiento puede ser inhibido por deficiencia de Fe (Michiels *et al.*, 1989).

### **1.9. Motilidad y quimiotaxis:**

Las bacterias de suelo que interactúan con las plantas poseen marcadas diferencias en lo que se refiere al efecto que causan sobre su planta huésped. La asociación entre *Rhizobium*, *Azospirillum* o muchas *Pseudomonas* y su planta huésped resulta beneficioso para el crecimiento de la planta, mientras que la interacción entre *Agrobacterium* con su huésped es patógena y produce una enfermedad. A pesar de estas diferencias están involucrados mecanismos comunes en las fases iniciales del proceso de interacción. Generalmente, se asume que una interacción exitosa es precedida por una proliferación de la bacteria apropiada en la rizosfera de su planta huésped. La

mayoría de las rizobacterias poseen maquinarias complejas para la motilidad y quimiotaxis. La motilidad bacteriana, ya sea al azar o quimiotáctica desempeña un rol importante en esta etapa de la interacción. Muchas sustancias presentes en los exudados radicales, incluyendo azúcares simples y aminoácidos, así como compuestos no metabolizables más específicos, han sido identificados como "quimioattractantes" para diferentes bacterias asociadas a plantas. Una vez que la bacteria se encuentra en la vecindad de la raíz o semilla, puede ocurrir la adherencia a células "blanco" en la superficie de la planta (Vande Broek y Vanderleyden, 1995).

Se ha demostrado que cepas de *Azospirillum* exhiben quimiotaxis positiva in vitro hacia varios "attractantes", incluyendo azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos (Okon *et al.*, 1980), compuestos aromáticos (Lopez-De-Victoria *et al.*, 1994) como así también hacia exudados radicales (Heinrich y Hess, 1985) y mucílago de raíz (Mandimba *et al.*, 1986).

La migración de células de *A. brasilense* hacia las raíces de plántulas de trigo fue demostrada en cultivos creciendo en arena y en suelo húmedo (Bashan, 1986).

Los compuestos aromáticos resultaron ser quimiotácticos a concentraciones similares a las encontradas en el suelo y en la rizosfera de la planta (Lopez-De-Victoria *et al.*, 1994).

Los estudios genéticos de la formación de flagelos y quimiotaxis de *Azospirillum* están restringidos a la especie *A. brasilense*. Los genes de *A. brasilense* requeridos para la motilidad en medio líquido, para la motilidad en superficies sólidas y para la quimiotaxis general están localizados en el cromosoma como así también en el megaplásmido de 90-MDa (van Rhijn *et al.*, 1990; Croes *et al.*, 1993).

El movimiento horizontal y vertical de *A. brasilense* en diferentes tipos de suelo depende principalmente de la presencia de plantas y de la disponibilidad de agua en el suelo. Este movimiento resulta en la colonización de plantas inoculadas y no inoculadas. Basándose en la observación de cepas móviles y no móviles, Bashan y Holguin (1994, 1995) reportaron que esta bacteria necesita de una activa motilidad para el viaje interrredial. Las bacterias no activas no se mueven hacia las plantas vecinas. Las bacterias móviles y no móviles tienen el mismo nivel de colonización en las plantas inoculadas, aunque el patrón de colonización fue distinto. Estas observaciones conducen a la conclusión de que la colonización del sistema radical entero en el suelo, es un proceso activo determinado por la motilidad bacteriana (Moens y Vanderleyden, 1996).

## I.10. Adherencia:

La adherencia de *Azospirillum* a las raíces es esencial para el establecimiento de una asociación a largo plazo. Existen tres razones para ello:

- i) Si la bacteria no está adherida a las células de la epidermis radical, las sustancias excretadas por ella difunden en la rizosfera y son consumidas por microorganismos nutricionalmente versátiles antes de llegar a la planta. Cuando la bacteria se encuentra adherida a las raíces, parte de estas sustancias difunden en los espacios intercelulares de la corteza radical.
- ii) El agua puede ejercer una acción mecánica conduciendo a la bacteria lejos del rizoplano, cuando ésta no se encuentra adherida. A consecuencia de ello la bacteria es desplazada a un medio nutricionalmente deficiente. Por otra parte, *Azospirillum* posee baja sobrevivencia en el suelo sin su planta huésped (Bashan y Levanony, 1990; Bashan *et al.*, 1995a, 1995b).
- iii) Los sitios de asociación en las raíces cuando *Azospirillum* no se encuentra adherido son vulnerables a la colonización por patógenos.

El mecanismo de adherencia al tejido de la planta está bien descrito para otras bacterias. En *Klebsiella pneumoniae* (Korhonen *et al.*, 1983), *Pseudomonas fluorescens* (Vesper, 1987) y *Bradyrhizobium japonicum* (Vesper y Bauer, 1986) la adherencia a raíces de gramíneas, maíz y soja respectivamente podría ser atribuida a la presencia de pili bacteriano. Una cepa de *Pseudomonas fluorescens* se adsorbe a arena por medio de una proteína de membrana externa de 34 kDa, identificada como flagelina (Deflaun *et al.*, 1990). La adherencia de *Rhizobium* a su planta huésped es mediada, al menos en algunos casos, por una lectina radical la cual reconoce un receptor específico en la superficie radical bacteriana. En el caso de *Agrobacterium tumefaciens*, varios componentes de la superficie celular han sido implicados en la unión de la bacteria al tejido de la planta, entre los cuales se encuentran: lipopolisacáridos (LPS), que en forma purificada inhiben la unión de células de *A. tumefaciens* a la herida de la hoja (Whatley *et al.*, 1976); un glucano  $\beta$ -1,2, el cual se encuentra ausente o no es transportado correctamente a periplasma en mutantes deficientes en adherencia (Puvanesarajah *et al.*, 1985; Cangelosi *et al.*, 1987, 1989); dos proteínas de membrana externa no relacionadas a flagelos o pili (Matthysse, 1987) y fibrillas de celulosa, que son sintetizadas después de la adsorción inicial y las cuales anclan la bacteria al tejido de la planta (Matthysse *et al.*, 1981; Matthysse, 1983).

En *Azospirillum brasilense* varios estudios describen la adherencia a raíces de plantas y superficies inertes, pero los mecanismos permanecen sujetos a hipótesis conflictivas. *A. brasilense* se une a raíces de gramíneas (Umali-García *et al.*, 1980) tales como maíz (Gafny *et al.*, 1986), trigo (Jain y Patriquin, 1984) y arroz (Murty y Ladha, 1987) y a células suspendidas de *Zinnia* (Eyers *et al.*, 1988). Ha sido reportado que la adherencia de *A. brasilense* a raíces de mijo (Umali-García *et al.*, 1980), y maíz (Gafny *et al.*, 1986) es estimulada por sustancias semejantes a lectinas presentes en el exudado radical. La participación de una lectina radical también ha sido sugerida por Del Gallo *et al.* (1989), quien demostró "in vitro" la unión de la aglutinina del germen de trigo a células de *A. brasilense* y *A. lipoferum*. Por el contrario Madi y Henis (1989) aislaron una aglutinina de la superficie celular de *A. brasilense* necesaria para la adsorción de la bacteria a raíces de trigo. Bashan y Levanony (1988) reportaron que la unión de *A. brasilense* a arena y raíces de trigo podía ser eliminada mediante el tratamiento de la bacteria con proteasa, lo cual apoya la hipótesis de la participación de proteínas de superficie bacteriana.

Estudios realizados por Michiels *et al.* (1991) demostraron dos modos de adherencia de *A. brasilense* a raíces de trigo: el primero, denominado fase de adsorción, es rápido, alcanzando un máximo a las 2 h de incubación. Esta fase involucra una unión débil y reversible de *A. brasilense* a las raíces y parecería ser mediada por componentes bacterianos de superficie de naturaleza proteica. La segunda fase, denominada anclaje, comienza después de las 8 h, alcanzando un máximo luego de las 16 h. Esta fase involucra una unión más fuerte e irreversible y las moléculas involucradas parecerían ser exopolisacáridos (EPS) bacterianos.

La adsorción y el anclaje son posiblemente procesos diferentes. Esta hipótesis se basa en que dos mutantes en adherencia de *A. brasilense* poseen distintos fenotipos en cuanto a estos dos fenómenos. La primer mutante deficiente en la producción de un polisacárido de superficie particular es incapaz de anclarse, pero mantiene la capacidad de adsorberse en grado semejante a la cepa salvaje (Anc<sup>-</sup>, Ads<sup>+</sup>). La segunda mutante es defectiva en adsorción, pero no en anclaje (Ads<sup>-</sup>, Anc<sup>+</sup>) (Michiels *et al.*, 1990, 1991). La fase de anclaje, caracterizada por la producción de largas fibrillas y abundante cantidad de sustancias semejantes a mucigel, ha sido observada en raíces de tomate, menta, pimiento, algodón y soja (Bashan *et al.*, 1991) y es probablemente el principal factor para una efectiva colonización radical.

### **I.10.a. Rol del flagelo polar de *Azospirillum brasilense* en la adherencia:**

Croes *et al.*, (1993) implicaron al flagelo polar de *A. brasilense* como el principal responsable en la fase de adsorción. Esta bacteria posee un patrón de flagelación mixta. Presenta un flagelo polar el cual es constitutivo, y flagelos laterales que son inducibles cuando la bacteria crece en medios sólidos. El flagelo polar es usado para la locomoción en medios líquidos, mientras que los flagelos laterales son utilizados para el desplazamiento de la bacteria en superficies sólidas. La motilidad y la quimiotaxis son dos funciones muy importantes que capacitan a la bacteria para moverse hacia las raíces de las plantas, donde pueden obtener fuentes de carbono y energía a partir de los exudados radicales.

La evidencia presentada, que implica al flagelo polar de *A. brasilense* como el principal responsable de la adsorción, está basada en los siguientes hechos:

- Una mutante no móvil tiene reducida drásticamente la adsorción a raíces de trigo.
- Esta bacteria no posee flagelo polar ni flagelos laterales, pero es indistinguible de la cepa salvaje en cuanto al resto de las características.
- La disociación del flagelo por calor o ácido reduce severamente la capacidad de adsorción.
- Se aislaron tres mutantes adicionales diferentes genéticamente, todas sin flagelo polar y con una capacidad de adsorción muy reducida.
- El flagelo polar purificado se une a raíces de trigo "in vitro", mientras que flagelos laterales no.

Debido a que los experimentos de adsorción fueron llevados a cabo en condiciones de intensa agitación, el rol de la motilidad bacteriana puede ser excluido.

La deficiencia en la adsorción en las mutantes de *A. brasilense* sin flagelo polar, refleja probablemente la pérdida de una adhesina radical de la bacteria.

### **I.10.b. Polisacáridos bacterianos involucrados en la adherencia:**

En muchos casos los polisacáridos de la superficie bacteriana son determinantes en las interacciones entre plantas y microorganismos. Por ejemplo la producción de glucanos  $\beta$ -1,2 es esencial para la adherencia a las células de la planta y subsecuente formación de tumor por el patógeno *Agrobacterium tumefaciens*. Lo mismo ocurre para la

formación de nódulos radicales fijadores de nitrógeno por el endosimbionte *Rhizobium meliloti* (*Sinorhizobium meliloti*) sobre su planta huésped (Dylan *et al.*, 1986). Dos genes involucrados en la producción de estos glucanos  $\beta$ -1,2 y en el transporte al periplasma han sido identificados. Se ha demostrado por hibridación de ADN y complementación genética que estos genes están bien conservados en ambos géneros (Dylan *et al.*, 1986). Un glucano  $\beta$ -1,2 similar debería ser producido en *Azospirillum* ya que secuencias de ADN homólogas a estos genes han sido observadas en el genoma de *Azospirillum* (Michiels *et al.*, 1985; Waelkens *et al.*, 1987).

Además de los glucanos  $\beta$ -1,2, los exopolisacáridos (EPS) y los lipopolisacáridos (LPS) son también importantes para una efectiva nodulación por *S. meliloti* (Chen *et al.*, 1985; Leigh *et al.*, 1985; Puvanesarajah *et al.*, 1987; Carlson *et al.*, 1987). En este sentido, mutantes de *S. meliloti* *Exo*<sup>-</sup>, deficientes en la síntesis de EPS ácidos mayoritarios, forman nódulos radicales vacíos no fijadores de nitrógeno en alfalfa.

La ocurrencia en *Azospirillum brasilense* de los genes que codifican para la síntesis de EPS, fue investigada mediante estudios de complementación de mutantes de *S. meliloti* *Exo*<sup>-</sup>. Así, se demostró que la mutación *exoC* de *S. meliloti* podía ser corregida para la producción de EPS, por varios clones de cósmidos de un banco de clones de *A. brasilense*. Sin embargo, los EPS producidos difieren en la estructura de los EPS de *S. meliloti* salvaje, y la deficiencia simbiótica de la mutación *exoC* no fue revertida por ninguno de estos clones de cósmidos. La mutación *exoB* de *S. meliloti* puede ser corregida no solamente para la producción de EPS, sino también para la habilidad de formar nódulos fijadores de nitrógeno en alfalfa por un clon de cósmido particular de *A. brasilense*. Para construir mutantes de *A. brasilense* con mutaciones en el loci correspondiente por intercambio de marcadores se aislaron y utilizaron inserciones Tn5 en el ADN clonado. Se encontró que estas mutantes no pueden producir los EPS de alto peso molecular tipo salvaje, pero en su lugar producen EPS de peso molecular más bajo. Así el ADN clonado de *A. brasilense* puede suprimir el fenotipo no mucoide de mutantes *exoB* y *exoC* de *S. meliloti* y el fenotipo no simbiótico de mutantes *exoB* de *S. meliloti* (Michiels *et al.*, 1988).

La producción de polisacáridos de superficie por *Azospirillum* fue demostrada por la fluorescencia de colonias crecidas en medios conteniendo el colorante fluorescente calcofluor, el cual se une a polisacáridos con uniones  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ -1,4. Se han obtenido mutantes de *Azospirillum* que muestran niveles aumentados o disminuidos de fluorescencia. Una mutante Tn5 no fluorescente de *A. brasilense* 7030 produce niveles de

EPS semejantes a la cepa salvaje, pero está afectada en la floculación. Sobre la base de estas observaciones se postuló que un polisacárido de superficie de *A. brasilense* diferente de los EPS, y del tipo celulosa está involucrado en el teñido con calcofluor y en la floculación (Del Gallo *et al.*, 1989).

Fue demostrado, por hibridización de ADN, que los loci genéticos afectados en la mutante no fluorescente de *A. brasilense* 7030 son diferentes de los loci *exoB* y *exoC* de *A. brasilense*, los cuales están involucrados en la producción de EPS (Michiels *et al.*, 1990). En otros estudios realizados por Michiels *et al.* (1991), se concluyó que la mutante Tn5 de *A. brasilense* no fluorescente (Cal) era incapaz de anclarse a las raíces de trigo (Anc), sugiriendo que el polisacárido que se une a calcofluor es responsable para el anclaje.

En contraste, una mutante Tn5 de *A. brasilense* Cd deficiente en floculación no fue afectada en la eficiencia de colonización de la planta huésped (Arunakumari *et al.*, 1992).

Katupitiya *et al.* (1995) encontraron una mutante espontánea de *A. brasilense* Sp7 (Sp7-S) que tiene afectada la producción de EPS, la capacidad de floculación y el teñido con rojo Congo. El colorante rojo Congo es conocido por unirse a glucanos  $\beta$ -1,3 y  $\beta$ ,1-4, incluyendo celulosa (Nakashini *et al.*, 1974). La cepa Sp7-S exhibe un fenotipo pleiotrópico negativo con respecto a la producción de material fibrilar en la raíz de la planta, así como en la floculación y el teñido con rojo Congo. Estas características se correlacionan bien con la ausencia de material fibrilar alrededor de Sp7-S. Al ser complementada con un fragmento clonado de 9,4-kb, la mutante recuperó el teñido con rojo Congo, la floculación y las propiedades inmunológicas. No se observaron diferencias en el teñido con calcofluor entre Sp7 y Sp7-S, lo cual sugiere que Sp7-S debería estar afectada en un locus desconocido, diferente de los locus previamente descritos. Tampoco se observaron diferencias en el número de bacterias de Sp7 y Sp7-S asociadas con el sistema radical, pero las diferencias en el patrón de colonización fueron claras. La cepa salvaje (Sp7) se encontró presente en grandes números sobre la superficie de las raíces de trigo, mientras que relativamente poca colonización superficial fue observada en la mutante Sp7-S, la cual se encontró predominantemente alrededor de la base de los sitios de emergencia de raíces laterales. Las observaciones por microscopía electrónica de barrido de tejido radical inoculado revelan que la mayoría de las células de la cepa salvaje presentes en la superficie radical son de paredes gruesas, unidas a la superficie radical por material fibrilar; en contraste, casi todas las células de Sp7-S son de paredes delgadas y con ausencia de material fibrilar.

Por otra parte, los lipopolisacáridos son los componentes mayoritarios de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Estas moléculas de superficie son relevantes para la estabilidad de la membrana y para la interacción de la bacteria con otros organismos y con el medio ambiente (Carlson *et al.*, 1978).

Es conocido que los LPS de *Rhizobium* juegan un rol determinante en el mecanismo de interacción de este microorganismo con las leguminosas; sin embargo en *Azospirillum* poco se sabe al respecto.

### **I.11. Colonización:**

Las bacterias del género *Azospirillum* poseen la capacidad de colonizar las raíces de su planta huésped. Los principales sitios de colonización corresponden a la zona de elongación y de pelos radicales de la raíz de la planta (Okon y Kapulnik, 1986; Döbereiner *et al.*, 1995b; Vande Broek y Vanderleyden, 1995; Bashan y Holguin, 1995). Algunas cepas de *Azospirillum* tienen la propiedad de ser endofíticas, es decir que se encuentran en los tejidos internos a la epidermis (Kloepper *et al.*, 1992). Patriquin y Döbereiner, (1978) encontraron a *A. lipoferum* entre las raíces de maíz, sorgo y trigo. Además, algunas cepas de *Azospirillum*, por ejemplo Sp109, han sido encontradas en las hojas y semillas de arroz (Baldani *et al.*, 1993). Otras cepas, tales como *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* SpS82, han sido aisladas solamente a partir de raíces esterilizadas superficialmente de maíz, sorgo, trigo y arroz sugiriendo que son endófitos obligados (Baldani *et al.*, 1983, 1986; Pereira *et al.*, 1988). Esto contrasta con dos cepas de *A. brasilense* estrechamente relacionadas, las cepas Sp7 y Cd, las cuales fueron originalmente aisladas a partir del suelo asociado a *Digitaria decumbens* y *Cynodon dactylon* respectivamente (Tarrand *et al.*, 1978) y tienden a colonizar solamente la superficie radical (Baldani *et al.*, 1986; Bashan y Levanony, 1990; Kennedy y Tchan, 1992; Döbereiner *et al.*, 1995a).

La diferencia entre las cepas endofíticas, tales como Sp245, y los colonizadores superficiales, como Sp7, fue confirmada recientemente por los estudios de Schloter *et al.* (1994) y Assmus *et al.* (1995). Por medio de sondas moleculares específicas de cepas y anticuerpos monoclonales, estos autores mostraron que la cepa Sp245 coloniza el interior de los pelos radicales así como los vasos del xilema de raíces de trigo, mientras que la cepa Sp7 solamente coloniza la superficie radical. Interesantemente y en contraste a estos dos autores, Levanony *et al.* (1989) observaron la cepa Cd colonizando el interior

de las raíces de trigo, es decir entre los espacios intercelulares de la corteza. Sin embargo, a diferencia de Sp245, la cepa Cd nunca se encontró entre la endodermis radical o el sistema vascular.

Estas observaciones de especificidad de cepas en lo que respecta al carácter endofítico de *Azospirillum* apoyan la idea propuesta por Bashan y Levanony (1990) en cuanto a que *A. brasilense* no es una bacteria específica de planta por sí misma; sin embargo esta especie y posiblemente *A. lipoferum* pueden colonizar internamente las raíces en ciertas interacciones específicas entre cepa-planta (Baldani *et al.*, 1997).

Varios autores han sugerido que *Azospirillum* puede entrar a través de las uniones entre las raíces laterales y también por los pelos radicales (Assmus *et al.*, 1995). Otra característica importante relacionada a la entrada de *Azospirillum* es que ha sido demostrada la actividad pectinolítica en esta bacteria, lo que conduciría a suponer que la bacteria puede entrar vía degradación enzimática activa de la laminilla media de la pared celular del huésped (Levanony *et al.*, 1989). Esto ha sido observado en otras interacciones planta-bacteria de carácter endófito, simbiótico o patógeno.

#### **I.12. Estudios genéticos de la asociación *Azospirillum*-planta:**

La asociación promotora del crecimiento de plantas de *Azospirillum* es un fenómeno de considerable interés tanto económico como científico. El principal obstáculo que ha dificultado su aplicación a gran escala como biofertilizantes es que el efecto benéfico parece depender de múltiples factores, los cuales no son conocidos o no están bajo control en su totalidad en las condiciones de campo. Por otra parte el mecanismo de interacción entre la raíz de la planta y *Azospirillum*, como así también los determinantes bacterianos involucrados en dicha interacción, son poco conocidos.

Numerosos estudios sobre ecología, fisiología y bioquímica de *Azospirillum* han sido desarrollados en los últimos quince años. El desarrollo de herramientas genéticas, incluyendo vectores apropiados, técnicas de conjugación y transformación y procedimientos de mutagénesis empleando transposones dieron como resultado la identificación y el clonado de numerosos genes de *Azospirillum*. Sin embargo, el aislamiento de genes involucrados en la interacción con la planta resulta dificultoso debido a la inexistencia de un fenotipo de la planta fácilmente detectable después de la inoculación. Es así que ha sido imposible lograr un proceso de selección directa de mutantes de *Azospirillum* defectivas en una interacción exitosa con la planta. La

asociación de *Azospirillum* con su planta huésped resulta en un incremento en el número de raíces laterales y pelos radicales, pero debido a la gran variabilidad en los resultados, este fenotipo no resulta favorable para el análisis de miles de mutantes. Los genes posiblemente involucrados en la interacción han sido aislados indirectamente por medio de uno de los siguientes procedimientos: El primer método involucra la caracterización de mutantes de *Azospirillum* defectivos en un fenotipo que se supone está involucrado en la asociación con la planta. Por esta vía han sido analizados procesos como la producción de auxinas, la síntesis de componentes de superficie y la fijación de nitrógeno. El segundo procedimiento está basado en la conservación de homología estructural o funcional entre *Azospirillum* y genes específicos para la interacción con la planta de otras asociaciones planta-bacteria. Ejemplos de genes que han sido aislados por este último método, son homólogos a los genes de nodulación de *Rhizobium* (genes *nod*), genes involucrados en la síntesis de exopolisacáridos (genes *exo*) y genes de fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*).

Recientemente, el uso de fusiones transcripcionales del gen *lacZ* o *gusA* con genes promotores de la fijación de nitrógeno (*nifA*, *nifH*, *nodG* y *ntrC*) que han sido introducidas a cepas de *Azospirillum* permitió estudiar las asociaciones de esta bacteria con la planta (Arsène *et al.*, 1994; Vande Broek *et al.*, 1993). Utilizando esta estrategia, los principales sitios de unión de *Azospirillum* a la raíz de la planta pueden ser visualizados, permitiendo una selección más directa de mutantes afectadas en la interacción con la planta y facilitando el análisis molecular del proceso de asociación entre *Azospirillum* y la raíz de la planta.

### **I.13. Condiciones de estrés:**

Pocos estudios han sido realizados sobre la tolerancia a salinidad en *Azospirillum*. Rao y Venkateswarlu, (1985) mediante estudios in vivo reportaron que la actividad nitrogenasa de *Azospirillum brasilense* resultó ser más sensible a estrés salino que el crecimiento bacteriano en nitrógeno combinado. Por otra parte, *A. halopraeferens*, una especie tolerante a sal aislada a partir de las raíces de Kallar grass (*Leptochloa fusca* L.), una planta pionera resistente a sal comúnmente encontrada en los suelos sódicos de Pakistan, requiere 0,25 % de NaCl para un buen crecimiento (Reinhold *et al.*, 1987).

Los mejores resultados de *Azospirillum* en estudios a campo están asociados a condiciones desfavorables para el crecimiento de las plantas (fertilización y agua

limitantes) y ocurren en sistemas de agricultura de regiones semiáridas, donde frecuentemente este problema está asociado a un incremento en la salinidad de los suelos (Matsumoto *et al.*, 1994). En este sentido, estudios realizados por Creus *et al.* (1997) demostraron que la inoculación con *Azospirillum brasilense* Sp 245 de plántulas de trigo, crecidas en estrés salino y osmótico, mejora el estatus de agua conduciendo a un mayor crecimiento foliar y tasa de elongación en las plantas inoculadas.

La tolerancia a sal de una cepa en particular es de fundamental importancia en la industria de la inoculación. Sin embargo son pocos los estudios tendientes a abordar esta problemática.

Uno de los mecanismos celulares de adaptación al estrés osmótico es la acumulación de solutos orgánicos (osmolitos). Al respecto, en varias cepas de *A. brasilense* se han identificado todos los osmolitos acumulados en respuesta al estrés osmótico producido por NaCl. Así glicina betaína fue acumulada por todas las cepas, mientras que prolina y glutamato fueron acumuladas solamente en *A. brasilense* SHS6, sugiriendo que el mecanismo de adaptación osmótica es el resultado de un aumento en la incorporación de osmolitos del medio, incremento en la biosíntesis de osmolitos o ambos. Un nuevo osmolito, un glucano lineal  $\beta(1,3)$ ,  $\beta(1,6)$  fue detectado en el periplasma de células de *A. brasilense* crecidas en un medio de baja fuerza osmótica (Altabe, *et al.*, 1994). *A. brasilense* es capaz de utilizar glicina betaína como un poderoso osmoprotector. La incorporación de este compuesto se encuentra fuertemente estimulada por estrés salino, pero significativamente reducida por shock osmótico frío (Bashan y Holguin, 1997).

En otras asociaciones planta-bacteria tales como *Rhizobium*-leguminosas el estrés salino afecta el proceso de simbiosis. Numerosos investigadores han examinado el efecto del estrés salino sobre varios rizobios y sobre el desarrollo del nódulo. Estos estudios han revelado que el estrés salino causa alteraciones en la estructura de los pelos radicales, reducción en el curvado de los mismos, en el número de bacterias adheridas, disminución en el número y tamaño de nódulos y una disminución en la fijación de nitrógeno. Fougère *et al.* (1991) detectaron un incremento significativo en las concentraciones de prolina libre en bacteroides de *S. meliloti* aislados de nódulos de raíces de alfalfa expuestas a estrés salino. Resultados similares fueron encontrados en bacteroides de *B. japonicum* aislados de nódulos de raíces de soja en condiciones de sequía. Sin embargo, la concentración de prolina en los bacteroides no parece contribuir sustancialmente a la presión osmótica intracelular. Mellor (1992) ha sugerido que la

biosíntesis de trehalosa por los bacteroides rhizobianos puede representar una estrategia osmoadaptativa. En este sentido varios autores han demostrado la presencia de trehalosa en los nódulos de muchas simbiosis *Rhizobium*-leguminosas en condiciones de salinidad.

Aunque el incremento del estrés osmótico resulta perjudicial para la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa en muchos aspectos, hay evidencia que sugiere que los bacteroides pueden integrar su respuesta osmoadaptativa con la de su planta huésped. Así se ha demostrado que la adición de glicina betaína o prolina betaína a plántulas de alfalfa noduladas, resulta en un incremento en la FBN bajo concentraciones de sal inhibitorias. Los bacteroides de *S. meliloti* tienen la capacidad de transportar glicina betaína, prolina betaína y colina. La incorporación de glicina betaína y prolina betaína por preparaciones de bacteroides aislados es fuertemente estimulada por concentraciones elevadas de NaCl. Debido a que las plantas de alfalfa tienen la capacidad de sintetizar prolina betaína y glicina betaína, estos osmoprotectantes podrían estar disponibles para los bacteroides durante la simbiosis (Miller y Wood, 1996).

#### **I.14. La salinidad en las plantas:**

Altas concentraciones de cloruro de sodio conducen a marcados cambios en el patrón de crecimiento de las plantas. La salinidad es conocida por reducir el crecimiento de glicófitos (especies sensibles a sal), lo que puede ser el resultado de cambios en la distribución de materia seca, relaciones de iones, contenido de agua, procesos fisiológicos, reacciones bioquímicas o una combinación de éstos (Cordovilla *et al.*, 1994). Dos efectos principales han sido identificados como las probables causas de la toxicidad debido a la salinidad en varias plantas: El efecto iónico y el efecto osmótico. El efecto iónico incluye interferencia con la incorporación de nitrógeno, dislocación de la asimilación de nitrógeno y ensamble de proteínas, interferencia con el transporte de iones esenciales en el interior de la planta y una reducción de la tasa fotosintética en las plantas afectadas. El efecto osmótico está asociado con la pérdida de la extensión de la pared celular y expansión celular, lo cual conduce al cese del crecimiento (Cordovilla *et al.*, 1996).

La mayoría de los cereales están incluidos en la categoría de glicófitos, siendo el maíz un ejemplo de ellos.

Las plantas que crecen en suelos salinos están confrontadas con un amplio rango en la concentración de sales disueltas. Las concentraciones fluctúan debido a cambios en la fuente de agua, drenaje, evapotranspiración, disponibilidad de solutos, presiones hidrostáticas, etc. Los constituyentes iónicos incluyen variadas proporciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{SO}_4^-$ ,  $\text{CO}_3^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Cl}^-$  y otros iones.

El estrés causado por la salinidad está relacionado con la composición y concentración de iones dentro de las plantas. A medida que aumenta la concentración de sal en la solución del suelo, los gradientes de energía de agua disminuyen haciendo más difícil para el agua y los nutrientes moverse a través de las membranas radicales y en el interior de la planta. La velocidad de incorporación de agua y solutos disminuye pero no cesa. Con el tiempo, el agua del suelo, rica en solutos, incrementa la concentración iónica dentro del sistema de transporte acuoso de la planta. Este efecto osmótico, encontrado a nivel de la membrana radical, se aplica a todas las membranas internas de la planta abastecidas por el sistema de conducción.

Además del efecto osmótico de solutos concentrados, hay efectos iónicos que surgen de la composición específica del soluto que fluye a través del tejido de la planta. El exceso interno de un ion en particular puede causar daños en la membrana, interferencia en el balance de solutos o cambios en la concentración de nutrientes. Algunos síntomas específicos de daño a la planta pueden ser reconocidos especialmente en las hojas, entre los cuales se encuentran cambios de color, necrosis marginal, quemadura de puntas, etc.

Las hojas de los glicófitos no pueden retener elevados niveles de sales sin daño inminente, y no se encuentran frecuentemente expuestas a concentraciones letales de sales en su ambiente natural. En comparación, los halófitos acumulan sales en sus hojas, las cuales son utilizadas para balancear el potencial osmótico fuera de la planta. Esta diferencia entre los halófitos y glicófitos en sus contrastantes estrategias adaptativas es de vital importancia. Los halófitos no podrían sobrevivir en medio ambientes salinos sin usar las sales concentradas del suelo como un balanceador osmótico (Volkmar *et al.*, 1998).

**II. OBJETIVOS:**

## **II.1. Objetivo general:**

Investigar los efectos del estrés salino sobre la interacción de *Azospirillum brasilense* Cd con raíces de maíz. Se intentará identificar determinantes genéticos de la bacteria asociados a su tolerancia a salinidad y capacidad de asociarse con la planta en esas condiciones.

## **II.2. Objetivos específicos:**

1-. Determinar el grado de adsorción, anclaje y colonización de *Azospirillum brasilense* a raíz de maíz en condiciones normales y de estrés salino.

2-. Caracterizar en forma comparativa componentes de la envoltura bacteriana en condiciones normales de crecimiento y en condiciones de estrés salino.

3-. Estudiar la expresión de genes promotores de la fijación de nitrógeno en *A. brasilense* en condiciones de estrés salino. Se tratará de determinar si la inducción de la transcripción de dichos genes, por exudados radicales de maíz, es afectada por la salinidad.

4-. Mutagénesis de *Azospirillum brasilense* y selección de clones con alteraciones superficiales y/o en su tolerancia a altas concentraciones de sal.

5-. Caracterizar las regiones alteradas con el propósito de establecer relaciones entre las funciones bioquímicas alteradas y los cambios fenotípicos en salinidad.

### **III. MATERIALES Y METODOLOGIA:**

**Tabla N° 1. Cepas bacterianas y plásmidos**

Cepas bacterianas	Características relevantes	Ref.
<i>A. brasilense</i> Cd	ATCC 29710 (wild type), cedida por EMBRAPA	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-PG	Mutante isogénica de <i>A. brasilense</i> Cd, con alteraciones en el péptidoglucano e hiperproductora de EPS con inserción del Tn5.	Esta tesis
<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-LPS <sup>a</sup>	Mutante isogénica de <i>A. brasilense</i> Cd, con LPS alterado con inserción del Tn5.	Esta tesis
<i>A. brasilense</i> Cd a21	Mutante isogénica de <i>A. brasilense</i> Cd, alterada en su tolerancia a salinidad, con inserción del Tn5-B20	Esta tesis
<i>E. coli</i> DH5α	Cepa supresora deficiente en recombinación, utilizada para el crecimiento de plásmidos y cósmidos. Permite α-complementación.	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> HB101	Cepa supresora comúnmente usada para la producción a gran escala de plásmidos. Híbrido de <i>E. coli</i> K12 x <i>E. coli</i> B altamente transformable.	Boyer y Roulland-Dussoix, 1969
<i>E. coli</i> JM109	Cepa deficiente en recombinación que permite el crecimiento de vectores que llevan mutaciones amber.	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
<i>E. coli</i> S17-1		Simon <i>et al.</i> , 1983
<b>Plásmidos</b>		
PAB576	Fusión transcripcional <i>nifA-lacZ</i> , Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , derivado de pVK100 <sup>a</sup> .	Liang <i>et al.</i> , 1991
PAB358	Fusión transcripcional <i>nifH-lacZ</i> , Tc <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , derivado de pRK290 <sup>a</sup> .	Liang <i>et al.</i> , 1991
PGS9	Cm <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> , (Tn5), replicón p15A N- <i>tra</i> , dador de Tn5.	Selveraj e Iyer, 1983
PSUP102	Tc <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup> , vector movilizable derivado de pACYC184.	Simon <i>et al.</i> , 1989
PBluescript SK	Vector de clonado y secuenciamiento, Ap <sup>r</sup> , fagemido, derivado de M13, origen de replicación f1.	Stratagene, La Jolla California

<sup>a</sup> pVK100 y pRK290 son vectores de amplio rango de huésped, con bajo número de copias, derivados de RK2 que pueden ser transferidos desde *E. coli* S17-1 a *Azospirillum* por conjugación.

Ap<sup>r</sup>, resistencia a ampicilina; Cm<sup>r</sup>, resistencia a cloramfenicol; Km<sup>r</sup>, resistencia a kanamicina; Tc<sup>r</sup>, resistencia a tetraciclina.

### III.1. Cepas bacterianas y plásmidos:

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo están descritos en la tabla N° 1.

### III.2. Condiciones de cultivo:

Para el crecimiento de *Azospirillum brasilense* se utilizó, según el caso, medio LB (Luria Bertani) suplementado con 2,5 mM de CaCl<sub>2</sub> y 2,5 mM de MgSO<sub>4</sub> (medio L\*) ó medio mínimo lactato (MML). Las condiciones de estrés fueron generadas adicionando a

los medios de cultivo 300 mM de NaCl. Los cultivos fueron incubados a 30° C y 100 rpm en un agitador rotatorio. Para el caso de las mutantes de *Azospirillum* obtenidas, los medios fueron suplementados con 25 µg/ml de Km.

Todas las cepas de *E. coli* crecieron en medio LB suplementado con los antibióticos apropiados. Los cultivos se incubaron a 37° C y 150 rpm en un agitador rotatorio.

Los antibióticos fueron utilizados a las siguientes concentraciones: Ap, 25 µg/ml; Cm, 25 µg/ml; Km, 25 µg/ml; y Tc, 5 µg/ml.

### **III.3. Viabilidad:**

Para los estudios de viabilidad se realizaron distintas diluciones de los cultivos crecidos aeróbicamente en un agitador rotatorio a 30° C y 100 rpm, determinando por plaqueo el número de bacterias por ml que corresponden a una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de 1.

### **III.4. Conjugación de genes reporteros:**

Se utilizó la cepa *E. coli* S 17-1 conteniendo el plásmido pAB576 o pAB358, el cual fue movilizado por conjugación a *Azospirillum brasilense* Cd (Arsène *et al.*, 1994, Katupitiya *et al.*, 1995). La cepa dadora *E. coli* S17-1 se cultivó a 37°C en caldo LB suplementado con 5 µg/ml de tetraciclina, durante toda una noche, se diluyó diez veces y se dejó crecer por otras 4 h. Los recipientes de *A. brasilense* Cd crecieron en medio LB líquido, hasta una densidad de 10<sup>8</sup> UFC/ml. Muestras de células dadoras y aceptoras en una proporción de 1:5 respectivamente fueron centrifugadas y resuspendidas en una solución de MgSO<sub>4</sub> 10mM. La mezcla conjugante fue rociada sobre un filtro de nitrocelulosa, el cual fue incubado directamente en una placa de medio LB sólido (suplementado con MgSO<sub>4</sub> 10mM) a 30 °C (Vanstockem *et al.*, 1987).

Los transconjugantes fueron seleccionados en medio mínimo lactato (MML) (Dreyfus *et al.*, 1983), suplementado con cloruro de amonio (1 g/l) y tetraciclina (5 µg /ml).

### **III.5. Preparación de semillas, cultivo de plántulas y obtención de exudados radicales:**

Semillas de *Zea mays* cv. "Funk's Tronador G422T" se esterilizaron superficialmente por inmersión en etanol al 70% (v/v) durante 3 min, se lavaron tres veces en agua destilada estéril, sumergieron tres veces durante 30 min en una solución 6 veces diluída de lavandina comercial con dodecilsulfato de sodio al 0,5% y luego en agua destilada estéril durante 60 min; posteriormente se agregó solución diluída de lavandina comercial con dodecilsulfato de sodio al 0,5% durante 60 min y finalmente se enjuagaron repetidas veces con agua destilada estéril. Las semillas (esterilizadas superficialmente) fueron pregerminadas en placas conteniendo papel de filtro y algodón, durante 3 días a 27° C en oscuridad y se transfirieron individual y asépticamente a tubos de ensayo de 200 x 22 mm conteniendo solución hidropónica estéril (MPCL) (Michiels *et al.*, 1991).

Para los ensayos de adherencia y colonización empleando plantas de maíz estresadas, se determinó la concentración de NaCl que produjo un efecto estresante sobre el crecimiento de *Zea mays*. Los tubos fueron tapados con algodón y colocados en cámara de crecimiento con ciclos de 16 h día / 8 h noche, a temperatura constante de 23° C y humedad relativa de 80 %.

El medio de crecimiento colectado después de tres semanas de crecimiento, tanto de plantas crecidas en medio normal como salino, fue liofilizado, resuspendido en agua destilada hasta una concentración de 20 veces (20x); dializado y esterilizado por filtración para su uso como exudado radical.

### **III.6. Estudios de adherencia de *A. brasilense* a raíces de *Zea mays*:**

*Azospirillum* posee la propiedad de adherirse a raíces de plantas de maíz. La adherencia ocurre en dos fases denominadas adsorción y anclaje. La primera se caracteriza por ser una unión débil y reversible, la cual alcanza un valor máximo a las 2 horas de incubación. La segunda fase (anclaje) se caracteriza por ser una unión fuerte e irreversible cuyo valor máximo se obtiene a las 24 horas de incubación. Varios autores han demostrado que esta fase es dependiente de polisacáridos bacterianos extracelulares, por lo cual se ha formulado un medio denominado NMF (medio mínimo libre de nitrógeno con fructosa), que favorece la producción de estos polisacáridos, para los ensayos de anclaje (Michiels *et al.*, 1991).

### III.6.a. Marcado con timidina de la bacteria:

Una colonia de *A. brasilense* Cd, proveniente de una placa stock fresca fue inoculada en 10 ml de medio L\*, al que se agregó 200 µl de metil-<sup>3</sup>H-timidina (6,70 Ci/mmol)(New England Nuclear), hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1 (bacterias controles). Por otra parte, una colonia se inoculó del mismo modo en 10 ml de medio L\* al que se agregó NaCl 300 mM (bacterias tratadas). En estudios previos se determinó que *Azospirillum brasilense* Cd tolera hasta 200 mM de NaCl, observando que una concentración de 300 mM produce un retardo del crecimiento bacteriano en cultivo puro, aunque luego hay una recuperación hasta valores controles (Rivarola *et al.*, 1998).

### III.6.b. Experimentos de adsorción bacteriana a raíces de maíz:

Se procedió según Michiels *et al.* (1991). Las bacterias marcadas radioactivamente, fueron recolectadas por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. Posteriormente se realizaron dos lavados en NaCl 0.875% estéril, resuspendiendo el pellet celular en el medio de adsorción (MPCL). Se determinó la actividad específica en el contador de centelleo.

**Metodología 1 (bacterias marcadas con metil-<sup>3</sup>H-timidina):** Bacterias controles marcadas y lavadas (aproximadamente  $7 \times 10^7$  UFC) se agregaron a tubos conteniendo una raíz, proveniente de una plántula de 5 días de crecimiento, prosiguiendo el experimento en medio MPCL (grupo Cc) y a tubos conteniendo la raíz en medio MPCL+ NaCl 300 mM (grupo Ct).

Las bacterias tratadas (crecidas en medio suplementado con 300 mM de NaCl) se agregaron a una raíz en medio MPCL (grupo Tc) y a raíz en medio MPCL + NaCl 300 mM (grupo Tt).

**Metodología 2 (bacterias portadoras de una fusión *nifA-lacZ*):** A raíces de plántulas controles de 15 días de crecimiento se agregaron bacterias controles(aproximadamente  $6 \times 10^6$  UFC), realizando la adsorción en medio MPCL (CCC). A las raíces de plántulas creciendo en condiciones de estrés, se agregaron bacterias controles procediendo en medio MPCL (TCC) y bacterias tratadas procediendo en medio MPCL + NaCl 200 mM (TTT).

En todos los casos el tiempo de incubación fue de 2 h a 30° C y 50 rpm. Finalizado este tiempo las raíces fueron lavadas 3 veces por inmersión en agua destilada durante 1 min, y secadas en papel de filtro. La radioactividad presente en las raíces fue determinada en un contador de centelleo (metodología 1). Cuando se emplearon bacterias portadoras de la fusión *nifA-lacZ* se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa en el sistema radical (metodología 2).

### **III.6.c. Experimentos de anclaje bacteriano a raíces de maíz:**

Se procedió como en los experimentos de adsorción, excepto que el medio de incubación fue NMF (Michiels *et al*, 1991) en lugar de MPCL y el tiempo de incubación fue de 24 h.

### **III.7. Estudios de colonización de raíces de maíz por *A. brasilense*:**

Semillas de maíz esterilizadas superficialmente y pregerminadas como se describió previamente (punto III.5.) fueron transferidas a tubos para cultivos hidropónicos conteniendo medio MPCL libre de nitrógeno, suplementado con 0,1 % de fructosa (plantas controles) y con NaCl 200 o 250 mM (plantas tratadas). Después de una semana de crecimiento la solución hidropónica fue inoculada con 1 ml de un cultivo bacteriano control o tratado con una  $DO_{600}=1$  (aproximadamente  $5,9 \times 10^6$  y  $5,4 \times 10^6$  UFC/ml respectivamente) conteniendo la fusión *nifA-lacZ* y crecido en medio MML. La densidad del inóculo fue  $6 \times 10^6$  UFC/planta. La colonización fue examinada a los 21 días postinoculación.

#### **III.7.a. Determinación de la actividad $\beta$ -galactosidasa:**

La expresión del gen *lacZ* ( actividad  $\beta$ -galactosidasa) en los transconjugantes fue determinada por la habilidad para hidrolizar *o*-nitrofenil- $\beta$ -D galactósido (ONPG) (Miller, 1972). Para ello, se usaron cultivos líquidos de toda una noche de las células conteniendo las fusiones *nifA-lacZ*. 1 ml del cultivo en crecimiento fue centrifugado y resuspendido en el mismo volumen de buffer Z (Miller, 1972); 100-200  $\mu$ l de estas suspensiones (dependiendo de la densidad) fueron llevados a un volumen total de 1 ml con buffer Z. Una gota de SDS 0,1% en buffer Z y dos gotas de cloroformo fueron añadidas a la

suspensión celular agitando vigorosamente. Las muestras se estabilizaron a 28°C durante 15 minutos y se agregó 100 µl de ONPG (4 mg/ml) a cada una de ellas. Los tubos se mantuvieron a 28°C, deteniendo la reacción con 250 µl de carbonato de sodio 1 M cuando se hubo desarrollado el color amarillo. Las muestras se centrifugaron removiendo el pellet celular y la intensidad del color amarillo del sobrenadante se determinó en un espectrofotómetro a 420 nm.

### **III.7.b. Determinación del grado de colonización:**

Las raíces con bacterias adsorbidas o ancladas en condiciones normales o estresantes fueron trituradas en 2 ml de buffer Z (Miller 1972) libre de β-mercaptoetanol. La actividad β-galactosidasa endógena de la planta fue inactivada mediante el calentamiento de la suspensión a 50° C durante 15 min; el β-mercaptoetanol fue agregado a una concentración final de 35 µM, prosiguiendo con la lisis bacteriana mediante el agregado de 20 µl de SDS al 0,1% y 40 µl de cloroformo seguido de agitación. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a baja velocidad. La actividad β-galactosidasa se determinó siguiendo el protocolo citado anteriormente. Como blanco se utilizó extractos de la planta tratados con Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> antes del agregado de ONPG. Los resultados fueron expresados en unidades Miller. min<sup>-1</sup>. mg<sup>-1</sup> de proteínas de la planta.

### **III.7.c. Determinación del patrón de colonización:**

La visualización *in situ* de *Azospirillum* llevando la fusión *lacZ* se obtuvo mediante el tñido de las piezas radicales con el sustrato cromogénico de la enzima β-galactosidasa, 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-galactósido (X-gal).

Después de la inoculación, las piezas radicales fueron tñidas de acuerdo a Arsène *et al.* (1994). Las raíces se fijaron en una solución al 1% de glutaraldehído en buffer Z (Miller, 1972), revelando la actividad β galactosidasa mediante el tñido con una solución de X-gal. Luego del tñido las muestras fueron lavadas dos veces con buffer Z y posteriormente con agua para ser examinadas.

### **III.7.d. Estudios de adherencia y colonización de mutantes de *A. brasilense* Cd con alteraciones en los LPS y en el péptidoglucano(PG):**

Las mutantes obtenidas denominadas *Azospirillum brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> y *Azospirillum brasilense* Cd Tn5-PG fueron utilizadas para estudiar las propiedades de adherencia y colonización a raíces de plántulas de maíz comparándolas con las de su cepa parental (wt). Para ello el plásmido pAB576 conteniendo la fusión *nifA-lacZ* fue movilizado por conjugación a las cepas mutantes y wt como se describió previamente (III.4).

Los experimentos de anclaje y colonización fueron realizados de acuerdo a lo descrito en III.6.c y III.7.c respectivamente, con la excepción de que la determinación del grado de colonización y del número de bacterias ancladas fue realizada mediante recuento en placa. En el caso de anclaje, las raíces fueron maceradas en condiciones estériles en NaCl 0,875 %. Del macerado se hicieron diluciones, las cuales se sembraron en medio MML sólido suplementado con Tc. Para la determinación del grado de colonización endófito, el sistema radical fue cortado y macerado en morteros estériles previa desinfección superficial con una solución de HgCl<sub>2</sub> 0,01% procediendo de la misma forma que para el anclaje. Las placas fueron incubadas en estufa a 30° C durante 48 h.

### **III.8. Caracterización de componentes superficiales de *Azospirillum brasilense* en condiciones normales y en estrés salino:**

#### **III.8.a. Polisacáridos:**

##### **III.8.a.i. Extracción de EPS:**

Células de *A. brasilense* crecidas en medio MML o en medio L\* control y tratado (300 mM de NaCl) hasta DO<sub>600</sub>:1,00 fueron lavadas y resuspendidas en medio NMF, el cual induce alta producción de EPS. Las células se incubaron durante 24 h a 50 rpm y a 30° C.

Los EPS fueron extraídos a partir del sobrenadante de los cultivos, previa centrifugación a 10000 rpm 20 minutos, por precipitación con 3 volúmenes de etanol frío.

Luego de centrifugar nuevamente a 10000 rpm 20 minutos el precipitado fue secado, resuspendido en agua destilada y dializado en agua durante 24 h (Skorupska *et al.*, 1985).

### **III.8.a.ii. Determinación cualitativa y cuantitativa de EPS:**

Se realizó la tinción con calcofluor de las bacterias controles y tratadas, según Del Gallo *et al.* (1989). Para ello, las bacterias crecieron durante 48 h en placas de medio L\* control o tratado (NaCl 300 mM) conteniendo calcofluor (200 µg/ml). Posteriormente fueron examinadas mediante microscopía de epifluorescencia con filtro UV a 365 nm.

La determinación cuantitativa de polisacáridos fue realizada por el método de la antrona (Dische, 1962).

### **III.8.b. Glucanos:**

Los glucanos de bacterias controles y estresadas crecidas en medio L\* hasta DO<sub>600</sub>:1,00 fueron extraídos según Breedveld *et al.* (1995). Para ello 5 ml de los cultivos fueron centrifugados a 7000 rpm durante 10 min. Los pellets fueron lavados con 1 ml de agua y posteriormente tratados con 200 µl de etanol 75% (v/v) a 70° C durante 30 min. Luego de centrifugar a 7000 rpm durante 20 min, el sobrenadante alcohólico fue concentrado bajo vacío. El residuo fue disuelto en 20 µl de agua, de los cuales 10 µl fueron usados para la determinación cuantitativa por el método de antrona y los 10 µl restantes fueron separados por cromatografía en capa delgada (TLC) de sílica gel G60 (Sigma).

Los cromatogramas fueron desarrollados en etanol:butanol:agua (5:5:4). Para el revelado, las placas fueron rociadas con una solución de 5% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en metanol y calentadas por 10 min a 120° C.

La determinación cuantitativa de los glucanos se realizó por el método de la antrona (Dische, 1962).

### **III.8.c. Lipopolisacáridos:**

Para el aislamiento se realizó una extracción rápida usando polimixina B inmovilizada en agarosa (Valverde *et al.*, 1997). Luego de la extracción, los LPS fueron



separados en geles de poliacrilamida al 20% usando un sistema de buffer conteniendo SDS-Tricina y visualizados mediante tinción con plata según Tsai y Frash (1982).

### **III.8.d. Proteínas:**

La concentración de proteínas de las muestras fue determinada por el método de Bradford (1976).

#### **III.8.d.i. Análisis de proteínas totales:**

Las proteínas totales fueron obtenidas a partir de 5 ml de cultivos de *A. brasilense* Cd controles y tratados con 300 mM de NaCl a  $DO_{600} = 1.00$ , utilizando para la extracción, fenol saturado con Tris-ClH 50 mM, pH 8.00 (De Mot y Vanderleyden, 1989). Fueron analizadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10%, según el método de Laemmli (1970).

#### **III.8.d.ii. Análisis de proteínas periplásmicas:**

Para la extracción de proteínas periplásmicas, 2 ml de los cultivos control y tratado se centrifugaron a 7000 rpm y el pellet celular fue lavado 2 veces con PBS. Luego las células resuspendidas en 20  $\mu$ l de  $Cl_3CH$ , fueron agitadas vigorosamente y mantenidas durante 15 min a temperatura ambiente. Cumplido este tiempo, se agregó 200  $\mu$ l de Tris-ClH 10 mM (pH 8.00) separando las células por centrifugación a 10000 rpm durante 20 min, tomando luego la fracción sobrenadante, que contiene las proteínas periplásmicas (Ferro-Luzzi Ames *et al.*, 1984), las cuales se analizaron en geles de poliacrilamida al 10 %, conteniendo SDS (Laemmli, 1970).

#### **III.8.d.iii. Análisis de proteínas de membrana externa:**

Las muestras para el análisis de proteínas de membrana externa fueron preparadas de acuerdo a Achtman *et al.* (1983). Las células bacterianas suspendidas en 10 mM de Tris-ClH (pH 8.00) fueron sonicadas dos veces durante 5 seg en baño de hielo. Las células fueron removidas y las membranas recolectadas por centrifugación a 17000

rpm durante 60 min. Las membranas se resuspendieron en Tris-ClH 10 mM (pH 8.00) y se agregó sarcosil a una concentración final de 1,5 % p/v. Luego de incubar a temperatura ambiente durante 20 min, las membranas fueron cosechadas por centrifugación a 17000 rpm durante 90 min, resuspendiéndolas en buffer de muestra, para el análisis en geles de SDS-poliacrilamida al 10 % con urea 4 M (Laemmli, 1970).

### **III.9. Transcripción de genes promotores de la fijación de nitrógeno:**

Una colonia de los transconjugantes conteniendo las fusiones *nifA-lacZ* o *nifH-lacZ* se inoculó en 10 ml de medio MML suplementado con Tc: 5  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (bacteria control) y con 300 mM de NaCl (bacteria tratada). Los cultivos crecieron aeróbicamente en agitador rotatorio hasta densidad óptica ( $\text{DO}_{600}$ ) de 1.0. Luego de centrifugar, los pellets bacterianos fueron resuspendidos como se detalla a continuación, para un total de 6 grupos experimentales:

(i) bacteria control en medio MML libre de nitrógeno; (ii) bacteria control en exudado radical control; (iii) bacteria control en exudado radical tratado; (iv) bacteria tratada en medio MML libre de nitrógeno; (v) bacteria tratada en exudado radical control; (vi) bacteria tratada en exudado radical tratado.

Luego de 4 h de incubación a 30° C y 150 rpm, se centrifugó a 10000 rpm, resuspendiendo el pellet bacteriano en buffer Z. La actividad  $\beta$ -galactosidasa se determinó como se describe en III.7.a.

### **III.10. Obtención de mutantes de *A. brasilense* Cd:**

#### **III.10.a. Mutagénesis por transposición:**

La obtención de mutantes de *Azospirillum* por inserción inducida por el transposón Tn5 fue llevada a cabo por conjugación con *E. coli* HB101 conteniendo el plásmido pGS9 (Tn5) o con *E. coli* S17-1 conteniendo Tn5-B20. Se procedió según Vanstockem *et al.* (1987). Los transconjugantes fueron seleccionados en agar MML suplementado con cloruro de amonio (1 g/l) y Km (25 $\mu\text{g/ml}$ ).

Los exoconjugantes resistentes a Km (Km<sup>r</sup>) de *Azospirillum brasilense* fueron examinados para seleccionar mutantes deficientes y/o hiperproductoras de exopolisacáridos, con alteraciones en los LPS y resistentes o sensibles a estrés salino.

### **III.10.b. Mutantes inducidas por luz UV:**

Para la mutagénesis se utilizó un cultivo de *Azospirillum brasilense* crecido durante toda la noche en medio MML. Muestras de 1 ml fueron centrifugadas a 10000 rpm en condiciones estériles; luego de descartar los sobrenadantes, los pellets fueron resuspendidos en 100 µl de NaCl 0,875 % y sembrados en placas de medio sólido MML suplementado con 400 y 500 mM de NaCl. Antes de la incubación, las placas fueron expuestas durante 10 seg a luz UV. La incubación se realizó en oscuridad en cámara húmeda a 30°C durante siete días.

### **III.10.c. Mutantes espontáneas:**

La metodología empleada fue similar a la anterior con la excepción que las placas no fueron expuestas a luz UV.

### **III.10.d. Selección de mutantes deficientes e hiperproductoras de EPS:**

Para ello los exoconjugantes Km<sup>r</sup> crecieron durante 3 días en medio MML sólido suplementado con calcofluor 200 µg/ml. Posteriormente las bacterias fueron examinadas en microscopio de epifluorescencia con filtro UV (Michiels *et al.*, 1990). Los clones que presentaron mayor o menor intensidad de fluorescencia con respecto a la cepa salvaje, fueron seleccionados para la determinación cuantitativa de EPS producidos según se describe en III.8.a.i y III.8.a.ii.

### **III.10.e. Selección de mutantes con LPS alterados:**

Para esta búsqueda se eligió como criterio de selección la sensibilidad aumentada a compuestos hidrofóbicos. En este caso se utilizó SDS, determinando la máxima concentración de SDS que no tuviese efecto inhibitorio en el crecimiento de *Azospirillum*

*brasiliense*. Para ello se probaron las siguientes concentraciones: 0.005%, 0.007%, 0.01%, 0.013%, 0.015%, 0.02% y 0.04%. Para corroborar alteraciones en los LPS se estudió el perfil electroforético de los mismos como se indica en el punto III.8.c.

#### **III.10.f. Selección de mutantes resistentes a estrés salino:**

Se analizó en los transconjugantes la resistencia al estrés salino. Para ello se determinó previamente la concentración inhibitoria mínima de NaCl, utilizando: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 800, 1000 y 1200 mM. El ensayo se realizó en medio sólido MML suplementado con las concentraciones antes mencionadas de NaCl. Las placas fueron incubadas en cámara húmeda a 30°C y el crecimiento fue seguido durante siete días.

#### **III.10.g. Selección de mutantes sensibles a estrés salino:**

La selección se realizó en placas de medio sólido MML suplementado con 200 mM de NaCl (teniendo como antecedente que *A. brasiliense* tolera hasta 300 mM de NaCl). Los clones que presentaron disminución en el crecimiento con respecto a la cepa salvaje fueron conservados para corroborar pérdida de la tolerancia a estrés salino. La tolerancia a estrés salino fue determinada mediante curvas de crecimiento en medio MML suplementado con 200 mM de NaCl.

#### **III.10.h. Curvas de crecimiento:**

Las cepas se cultivaron en medio MML, suplementado o no según corresponda con Km 25 µg/ml, hasta  $DO_{600}$ : 0,3. Posteriormente 1 ml fue inoculado en 25 ml del mismo medio con y sin el agregado de NaCl 200, 300, 400 ó 500 mM según el caso. Los cultivos se incubaron en agitador rotatorio a 32°C, 100 rpm. El crecimiento fue seguido mediante el incremento en la  $DO_{600}$ .

### **III.11. Caracterización genética de las mutantes de *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> y Tn5-PG:**

#### **III.11.a. Extracción de ADN:**

Una alícuota de 1,5 ml de un cultivo de toda la noche de *A. brasilense* fue centrifugada durante 2 min a 10000 rpm. El pellet celular fue resuspendido en 567 µl de buffer TE, agregando 30 µl de SDS (10%) y 3 µl de proteinasa K (20 mg/ml). El tubo fue mezclado por inversión e incubado a 37°C durante 1 h para producir la lisis celular. Posteriormente se agregó 100 µl de NaCl 5 M, mezclando vigorosamente por unos segundos. Luego del agregado de 80 µl de CTAB (10%) se incubó a 65°C durante 10 min, se adicionó un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) agitando vigorosamente. La mezcla fue centrifugada durante 5 min a 11000 rpm. La fase superior fue recuperada, se agregó un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y centrifugó durante 5 min a 11000 rpm. Luego de recuperar la fase superior, se adicionó 2 µl de RNasa (10 mg/ml) incubando la mezcla durante 30 min a 37°C. A continuación, se agregó un volumen igual de isopropanol, manteniendo el tubo a temperatura ambiente por 5 min, se centrifugó 5 min a 11000 rpm, descartando el sobrenadante y lavando el pellet dos veces con etanol al 70%. Se centrifugó 5 min a 11000 rpm; el pellet fue secado y resuspendido en 10-30 µl de buffer TE o agua bidestilada estéril según el caso.

El ADN fue cuantificado mediante comparación visual de la intensidad de fluorescencia en geles de agarosa 0,8% conteniendo bromuro de etidio, con respecto a un estándar de ADN de concentración conocida.

#### **III.11.b. Extracción de plásmidos:**

La extracción de plásmidos se realizó por el método alcalino, de acuerdo con Sambrook *et al.* (1989).

Una alícuota de 1,5 ml de un cultivo crecido en medio LB durante toda una noche fue centrifugada a 12000 rpm durante 2 min. El pellet bacteriano fue resuspendido en 100 µl de solución GTE suplementada con lizozima, incubando la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se agregó 200 µl de una solución que contiene 0,2 N de NaOH y 1% de SDS, incubando 5 min en hielo.

A la mezcla anterior se adicionó 150 µl de acetato de potasio, pH: 4,8. Se agitó vigorosamente durante 5 min. La mezcla fue centrifugada a 12000 rpm por 5 min, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo. Posteriormente se agregó un volumen equivalente de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1). Luego de mezclar se centrifugó durante 2 min a 12000 rpm, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo. El ADN doble cadena fue precipitado con dos volúmenes de etanol y centrifugado a 12000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue removido y el ADN fue lavado dos veces con 1 ml de etanol al 70% a 4° C. El sobrenadante fue removido por centrifugación a 12000 rpm durante 5 min y el pellet se secó a 37°C. Luego fue resuspendido en 50 µl de buffer TE o agua bidestilada estéril con el agregado de 1 µl de RNasa (10 mg/ml). Las muestras fueron guardadas a -20° C.

Para el caso de plásmidos recombinantes se utilizó una modificación del método anterior descrita por Le Gouill *et al.* (1994), la cual se detalla a continuación:

El pellet bacteriano obtenido del mismo modo que el descrito anteriormente fue resuspendido en 200 µl de GTE, al cual se adicionó 200 µl de una solución conteniendo 0,2 N de NaOH y 1% de SDS. Se mezcló suavemente hasta que la mezcla quedó transparente (lisis total). Posteriormente se adicionó 200 µl de acetato de potasio, pH: 4,8, mezclando suavemente por inversión hasta homogeneizar. Se centrifugó a 11000 rpm durante 5 min, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo, al que se adicionó un volumen equivalente de isopropanol frío, se mezcló suavemente y se incubó a -20° C durante 30 min; se centrifugó a 11000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue descartado y el pellet se secó a 37° C, resuspendiéndolo posteriormente en 20 µl de agua bidestilada estéril suplementada con 1 µl de RNasa (10 mg/ml). Luego de incubar a 37° C durante 30 min las muestras fueron guardadas a -20° C.

### III.11.c. Digestión de ADN total con *EcoRI*:

Aproximadamente 800 ng de ADN fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoRI* en la siguiente mezcla de reacción:

ADN	32 µl
Albúmina bovina acetilada	0,4 µl
Buffer H	4,0 µl
Agua	1,6 µl

*Eco*R1 2,0 µl

La mezcla de digestión fue incubada durante 3 h a 37° C.

#### III.11.d. Digestión del plásmido pSUP102 con *Eco*RI:

El vector pSUP102 fue digerido con la enzima de restricción *Eco*RI en la siguiente mezcla de reacción:

ADN pSUP102	15 µl
Albúmina bovina acetilada	0,2 µl
Buffer H	1,5 µl
Agua	2,3 µl
<i>Eco</i> R1	1,0 µl

La mezcla de digestión fue incubada durante 3 h a 37° C.

Luego de la digestión la enzima fue inactivada mediante el calentamiento a 65° C durante 10 min.

#### III.11.e. Ligación:

El ADN digerido con *Eco*RI de la mutante (300 ng) fue ligado con pSUP102 digerido con *Eco*RI utilizando la ligasa del fago T4.

pSUP102 ( <i>Eco</i> RI)	10 µl
ADN ( <i>Eco</i> RI)	15 µl
Buffer de ligación	3,0 µl
Agua	1,0 µl
Ligasa T4	1,0 µl

La ligación se realizó durante toda una noche a 4° C. Luego de la incubación, el ADN de la mezcla de ligación fue precipitado con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y un volumen de isopropanol frío. La mezcla fue incubada durante 30 min a -20° C, y centrifugada a 12000 rpm durante 10 min. Posteriormente el pellet fue resuspendido en 20 µl agua bidestilada estéril.

### **III.11.f. Preparación de células electrocompetentes:**

*E. coli* S17-1 y *E. coli* JM109 fueron hechas competentes de la siguiente manera: 100 ml de medio LB fue inoculado con 1 ml de un cultivo de toda una noche de *E. coli* cultivado a 37° C con agitación vigorosa. Cuando los cultivos alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0.6, fueron enfriados en hielo durante 30 min. Las células fueron centrifugadas a 7000 rpm durante 15 min a 4° C. El pellet celular fue lavado dos veces con 50 ml de glicerol 10% frío, resuspendidas en un volumen final de 0.2 ml de medio GYT frío y guardadas a -80° C, hasta su utilización (Tung y Chow, 1996).

### **III.11.g. Transformación de células electrocompetentes de *E. coli* S17-1:**

10 µl de la mezcla de ligación fueron utilizados para transformar células electrocompetentes de *Escherichia coli* S17-1. La electrotransformación fue llevada a cabo usando un Gene Pulser (Bio-Rad) en cubetas preenfriadas de 0,4 cm, bajo las condiciones sugeridas por el fabricante ( 25µF, 200-600Ω, 2.0 kV).

Luego de la electroporación, las células fueron resuspendidas en 1 ml de medio SOC e incubadas durante 1 h a 37° C. Después las células fueron sembradas en placas de medio LB conteniendo 25 µg/ml de Km y 5 µg/ml de Tc. Los clones que crecieron (transformantes) fueron analizados mediante PCR para determinar la presencia de secuencias de inserción (IS50) en los plásmidos recombinantes.

### **III.11.h. PCR de clones transformantes:**

Para determinar la presencia de secuencias de inserción en los clones transformantes, propias del transposón Tn5, se realizó la reacción de amplificación en cadena de la polimerasa, empleando primers específicos para las secuencias de inserción del Tn5 (IS50). Estos primers denominados IS1 e IS2 conducen a la amplificación de un producto de PCR de 1,2 kb (IS1 5'-GCTCGATCTAGAACGTTTCATGATAACTTCTGC-3' e IS2 5'-TCTGCGGACTGGCTTTCTAC-3'). El ADN molde se obtuvo de la siguiente manera:

Una colonia de los clones transformantes fue resuspendida en 100 µl de agua bidestilada estéril, luego se colocó en un baño a ebullición durante 10 min. Luego de centrifugar a 10000 rpm 5 min, 5 µl del sobrenadante fueron utilizados como molde.

Como controles se utilizó agua, ADN de *A. brasilense* wt como controles negativos y ADN del vector pGS9 (Tn5) como control positivo.

La mezcla de PCR fue la siguiente:

Agua	5 µl
Buffer	2,5 µl
ASB	2,5 µl
dNTP	2,5 µl
Primers IS50f	2,5 µl
Primers IS50r	2,5 µl
Mg <sup>++</sup>	2,5 µl
Taq	1 µl
ADN molde	5 µl

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

Un ciclo de desnaturalización a 94° C: 2 min

35 ciclos de

94° C: 30 s

52° C: 20 s

72° C: 45 s

Un ciclo final de elongación a 72° C: 3 min

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador para tubos capilares, Idaho 1605 Air Thermo Cycler (ATC).

Luego de finalizada la amplificación, los productos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 0,8 %.

### **III.11.i. Mutagénesis reversa:**

Para corroborar que la inserción Tn5 en el fragmento clonado es la responsable del fenotipo observado en las mutantes, se realizó la mutagénesis reversa empleando el vector pSUP102 conteniendo el fragmento clonado (*EcoRI*::Tn5).

Para ello el plásmido fue movilizado por conjugación a *A. brasilense* Cd wt. Luego de la conjugación se buscaron clones en donde hubiesen ocurrido eventos de doble recombinación (intercambio de marcadores). Con tal fin los transconjugantes resistentes a

kanamicina fueron analizados para seleccionar aquellos que presentaran sensibilidad a Tc (propia del vector).

### **III.11.j. Hibridización de ADN (Southern blot):**

Para la hibridización del ADN de las cepas mutantes y wt se empleó como sonda el fragmento *EcoRI* conteniendo la inserción del Tn5 clonado de cada una de las mutantes obtenidas.

### **III.11.k. Obtención de la sonda:**

Los plásmidos pSUP102 conteniendo el fragmento clonado (*EcoRI*::Tn5) de las mutantes de *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> (pEJlps1) y Cd Tn5-PG (pEJpg1), fueron digeridos con *EcoRI*. Luego de la digestión los fragmentos recombinantes fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 0,8%, a partir de los cuales fueron escindidos en un bloque de agarosa. Los bloques de agarosa conteniendo los fragmentos de interés fueron colocados en una columna wizard (Promega). El ADN fue eluido de la columna por centrifugación a 14000 rpm durante 2 min y fue precipitado con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M y 1 volumen de isopropanol frío. La mezcla fue incubada durante 30 min a -20° C, y luego centrifugada a 12000 rpm durante 10 min. Se lavó dos veces con etanol al 70% y secado a 37° C. Posteriormente el pellet fue resuspendido en 20 µl agua bidestilada estéril.

Los fragmentos purificados fueron marcados con 14-dCTP-biotina empleando el kit Bioprime (Gibco BRL). Los nucleótidos no incorporados fueron eliminados mediante precipitación con acetato de sodio 3 M e isopropanol frío como se describió anteriormente. El ADN precipitado fue lavado dos veces con etanol al 70% frío.

### **III.11.l. Transferencia de ADN a membranas de nylon:**

Aproximadamente 200 ng de ADN total de la cepa wt y de las mutantes digeridos con *EcoRI* fueron transferidos a membranas de nylon (Hybond™- N, Amersham LIFE SCIENCE). La transferencia se realizó hacia abajo durante 1 h, según Chomczynski (1992). Previo a la transferencia, el gel fue sumergido en una solución de HCl 0,125 M durante 10 min para producir la depurinación de las muestras. Posteriormente el gel se

sumergió durante 1 h en NaOH 0,4 M, NaCl 3 M (desnaturalización). Luego se realizó un lavado de 15 min con buffer de transferencia. La transferencia fue realizada en el siguiente buffer: NaOH 8 mM y NaCl 3 M. Finalizada la transferencia las membranas se neutralizaron durante 10 min en buffer fosfato (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 M; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2 M; pH: 6,8). Las membranas fueron expuestas a luz UV durante 15 min y posteriormente secadas a 60° C durante 15 min.

### **III.11.m. Hibridización:**

Las hibridizaciones se llevaron a cabo en un horno de hibridización a 42° C empleando soluciones que contienen formamida. Las membranas fueron colocadas en tubos de vidrio con tapa a rosca para hibridización.

El protocolo de hibridización empleado fue el recomendado por el fabricante (Gibco BRL).

Para la detección se empleó un kit de quimioluminiscencia PhotoGene Nucleic Acid Detection System version 2.0 (Gibco BRL, LIFE TECHNOLOGIES).

El revelado se realizó mediante autorradiografía empleando películas para rayos X CURIX (AGFA). La exposición se realizó durante 2 min.

### **III.11.n. Subclonado:**

Los fragmentos clonados de ambas mutantes en pSUP102 (pEJlps1 y pEJpg1) fueron subclonados en pBluescript SK (pBSK). Para ello, los plásmidos pBSK, pEJlps1 y pEJpg1, fueron aislados por el método descrito anteriormente (Sambrook *et al.*, 1989). Se realizó una doble digestión con *EcoRI-BamHI*. Los productos de digestión fueron purificados mediante precipitación con acetato de sodio 3 M, y separados en geles de agarosa al 0,8%.

Los fragmentos de digestión fueron ligados en pBSK. La mezcla de ligación, previa purificación mediante precipitación, fue utilizada para transformar células electrocompetentes de *E. coli* JM109 siguiendo el procedimiento descrito para el clonado.

Los clones transformantes fueron seleccionados en medio LB sólido suplementado con Ap 25 µg/ml (propia del vector) y Km 25 µg/ml (propia del Tn5). De esta manera se seleccionaron los clones cuyos plásmidos poseen el fragmento interno *EcoRI-BamHI* del

ADN clonado en pSUP102 (*EcoRI*::Tn5). Los clones transformantes fueron utilizados para realizar un análisis de restricción utilizando doble digestión con *EcoRI*-*Bam*HI.

### III.11.o. Secuenciamiento:

Los plásmidos pBSK conteniendo el fragmento *EcoRI*-*Bam*HI (pEJlps2) y *EcoRI*-*Bam*HI (pEJpg2) fueron purificados, previa extracción, usando el kit wizard DNA Clean-Up System (Promega). Los plásmidos purificados fueron utilizados para secuenciar el fragmento de ADN de *Azospirillum brasilense* que flanquea al Tn5 en ambas mutantes, empleando el primer ISs (5'-TGGGAAGCTCAGATCCTGGAA-3') el cual se ancla entre la IS50 del Tn5.

El servicio de secuenciamiento fue realizado en HHMI/Keck DNA Sequencing Facility, USA.

### III.11.p. Análisis de secuencia y búsqueda de homología:

Las secuencias fueron analizadas en la base de datos de GenBank utilizando el programa BLASTX 2.0.10 (Altschul *et al.*, 1997).

### III.12. Análisis estadístico:

El análisis estadístico se llevó a cabo usando el análisis de la varianza (ANOVA) comparando las medias por el Test de LSD  $p < 0.05$ . Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas.

### III.13. Medios de cultivos empleados:

Medio Luria Bertani (LB):

Contiene por litro:

NaCl	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Triptona	10 g

### LB suplementado (L\*)

Contiene por litro:

NaCl	10 g
Extracto de Levadura	5 g
Triptona	10 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,3 g
CaCl <sub>2</sub>	0,27 g

### Medio Mínimo Lactato (MML)

El medio MML contiene por litro:

Lactato de sodio	10 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,67 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,87 g
NaCl	0,05 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
CaCl <sub>2</sub>	0,04 g
FeCl <sub>3</sub>	0,004 g
NaMoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,005 g
Biotina	0,01 g
Acido Nicotínico	0,02 g
Acido Pantoténico	0,01 g
NH <sub>4</sub> Cl	1 g

### Marin-Prével-Charpentier-Lavigne (MPCL)

El medio MPCL contiene por litro:

Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,64 g
KNO <sub>3</sub>	202 mg
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	348 mg
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	480 mg
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	480 mg
KCl	296 mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	408 mg
NaFe(III)EDTA	8,07 mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	34,4 mg

MnSO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,5 mg
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,5 mg
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	3,6 mg
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,8 mg

**Medio Mínimo M9 libre de nitrógeno, con fructosa (NMF)**

Contiene por litro:

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4,8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3,0 g
NaCl	0,5 g

Autoclavar y agregar estéril:

Fructosa (20 %)	10 ml
MgSO <sub>4</sub> (1 M)	1 ml
CaCl <sub>2</sub> (10 mM)	10 ml
Vitamina B1(1 %)	0,5 ml

**Medio GYT: (%)**

Glicerol	10%
Extracto de Levadura	0,125%
Triptona	0,25%

**Medio SOC:**

Triptona	2%
Extracto de Levadura	0,5%
NaCl	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Mg Cl <sub>2</sub>	10 mM

#### **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:**

## **IV.1. EFECTOS DEL ESTRÉS SALINO SOBRE LA ADHERENCIA DE *Azospirillum brasilense* A RAÍCES DE *Zea mays*.**

Se planificó estudiar la adherencia mediante el uso de isótopos radioactivos (Michiels *et al.*, 1991) e implementando la utilización de genes reporteros (Arsène *et al.*, 1994). El objetivo de utilizar ambas metodologías radica en que la primera permite determinar el número de bacterias que se adhieren a las raíces, mientras que la segunda permite investigar los patrones de colonización *in situ*.

### **IV.1.a. Estudios de adherencia de *Azospirillum brasilense* a raíces de *Zea mays* usando isótopos radioactivos:**

#### **IV.1.a.i. Densidad óptica y viabilidad:**

Antes de determinar la adherencia bacteriana, se realizaron estudios de viabilidad con el objeto de conocer el número de células viables a  $DO_{600}:1,00$  (fase exponencial de crecimiento). Esta experiencia fue realizada para inocular las raíces de maíz, en los distintos tratamientos, con un número conocido de bacterias.

Los resultados de viabilidad no muestran diferencias significativas en el número de bacterias viables a  $DO_{600}:1,00$  entre el control (bacteria crecidas en medio control) y el tratado (bacterias crecidas en medio salino)(Tabla N° 2). Es decir que el NaCl a una concentración de 300 mM, produce un retardo en el crecimiento de *A. brasilense*, pero a igual DO el número de células es el mismo.

**Tabla N° 2. Viabilidad de *Azospirillum brasilense* Cd en condiciones control (C) y de estrés salino (T) en medio L\* a DO<sub>600</sub>: 1.00**

Medio de cultivo	UFC /ml
L* (C)	1.40 x 10 <sup>8</sup> ± 0.38 <sup>a</sup>
L*suplementado Con 300 mM de NaCl (T)	1.11 x 10 <sup>8</sup> ± 0.23 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± el error estándar de 4 experimentos (en cada experimento se realizaron 3 determinaciones). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD, p<0.05).

#### **IV.1.a.ii. Adsorción de *Azospirillum brasilense* Cd a raíz de maíz: Efecto del estrés salino:**

Los experimentos de adsorción fueron realizados utilizando raíces de plántulas de maíz crecidas en condiciones normales durante 5 días (sección III.5. de Materiales y Métodos). Para estandarizar las condiciones y teniendo en cuenta que la raíz de maíz no es uniforme, los estudios de adsorción y anclaje se llevaron a cabo utilizando segmentos de 5 cm de la raíz principal, tomados desde la punta de la raíz. Cada raíz fue inoculada con 7 x 10<sup>7</sup> UFC. La tabla N° 3 muestra la adsorción bacteriana a raíces de maíz en los cuatro grupos estudiados: Bacteria control en medio control (Cc), bacteria control en medio tratado (Ct), bacteria tratada en medio control (Tc), y bacteria tratada en medio tratado (Tt). Puede observarse una disminución significativa en el número de bacterias que se adsorben a las raíces de maíz en los grupos Tc y Ct con respecto al control (Cc). De ello puede deducirse que el estrés salino afecta la adsorción de las bacterias a la raíz de maíz ya sea produciendo perturbaciones en la bacteria durante el crecimiento en medio salino (bacteria tratada) como durante el proceso mismo de adsorción. En el caso de las bacterias que crecieron en condiciones de estrés (Tc), la disminución podría deberse a disturbios en la superficie bacteriana, mientras que en el caso de Ct (bacterias

controles adsorbidas en un medio salino) podría deberse a modificaciones en la fuerza iónica del medio de adsorción. Con respecto a esta última posibilidad, estudios realizados por Gafny *et al.* (1986) ya han mostrado que la adsorción de *A. brasilense* a raíces de maíz es afectada por la fuerza iónica del medio. En particular, la presencia de cationes monovalentes ( $\text{Na}^+$ ), divalentes ( $\text{Ca}^{++}$ ) o polivalentes (poly-L-lisina) inducían una disminución del número de bacterias adsorbidas (Gafny *et al.*, 1986). En el mismo estudio se muestra que la cinética de adsorción de *A. brasilense* a raíces de maíz puede ser representada por una isoterma de adsorción de Langmuir, asumiendo que: a) El número de sitios de unión bacteriana por unidad de área de raíz (o por unidad de masa de raíces de tamaño similar) es fijo. b) Las bacterias adheridas forman monocapas en la superficie de las raíces. c) Las bacterias unidas a las raíces como las libres en la solución que rodean a las mismas están en equilibrio.

Estos autores encontraron que la adherencia de *A. brasilense* a raíces de maíz incrementa linealmente a mediada que aumenta el número de bacterias en la mezcla de reacción hasta  $5 \times 10^9$  células/ml. A números más elevados se observa saturación. Con más de  $10^9$  células/ml los valores producen una recta que se desvía de la isoterma derivada en forma teórica, la cual podría ser atribuída a la adsorción de las bacterias a las raíces en forma de agregados. Observaciones por microscopía electrónica de barrido de las bacterias adheridas confirmaron que altos números de bacterias ( $10^9$ - $10^{11}$  células/ml) resultan en la formación de agregados multicapas sobre las raíces (Gafny *et al.*, 1986). A concentraciones más bajas de bacterias las células se adsorben en monocapas.

Como hipótesis para explicar el hecho de que no haya variaciones en el número de bacterias adsorbidas en el tratamiento Tt, podría suponerse que la bacteria desarrolla un mecanismo de adaptación a las condiciones de estrés.

**Tabla N° 3. Efectos del estrés salino sobre la adsorción de *Azospirillum brasilense* Cd a raíces de maíz.**

Número de bacterias / raíz	
Tratamiento	
Cc	$9.76 \times 10^5 \pm 0.34^a$
Tc	$5.35 \times 10^5 \pm 1.00^b$
Ct	$7.53 \times 10^5 \pm 0.76^b$
Tt	$7.88 \times 10^5 \pm 1.19^{ab}$

Cc: bacterias control en medio de adsorción control. Tc: bacterias tratadas (crecidas en presencia de 300 mM de NaCl) en medio de adsorción control. Ct: bacterias control en medio de adsorción salino. Tt: bacterias tratadas en medio de adsorción salino. En todos los casos el pH del medio de adsorción fue 7,0. Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos (en cada experimento se utilizaron 3-4 raíces por tratamiento). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

**IV.1.a.iii. Anclaje de *Azospirillum brasilense* Cd a raíces de maíz: Efecto del estrés salino:**

El estrés salino afecta el mecanismo de anclaje de la bacteria a la raíz de maíz, lo cual se refleja por una disminución en el número de bacterias que se anclan a la raíz en los tres tratamientos (Tc, Ct y Tt) con respecto al control (Tabla N° 4).

Cuando la bacteria crece en condiciones de estrés e interacciona en un medio control (Tc) el menor anclaje podría estar relacionado con cambios en la expresión de moléculas que participan durante esta fase de adherencia. También se observó un menor anclaje en el caso de bacterias crecidas en condiciones normales que interaccionaron con la raíz en medio salino (Ct). Cuando la bacteria crece e interacciona con la raíz en alta salinidad (Tt) las condiciones de estrés no cesan debido a la permanencia continua en medio salino, conduciendo a una disminución en el anclaje de la bacteria.

**Tabla N° 4. Efecto del estrés salino sobre el anclaje de *Azospirillum brasilense* Cd a raíces de maíz.**

Número de bacterias / raíz	
Tratamiento	
Cc	$2.72 \times 10^6 \pm 0.56^a$
Tc	$0.85 \times 10^6 \pm 0.21^b$
Ct	$0.84 \times 10^6 \pm 0.13^b$
Tt	$0.38 \times 10^6 \pm 0.09^b$

Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos (en cada experimento se utilizaron 3-4 raíces por tratamiento). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

#### **IV.1.b. Estudio de la Interacción *Azospirillum brasilense*-*Zea mays* usando genes reporteros:**

##### **IV.1.b.i. Viabilidad:**

Se determinó por el método de recuento en placa el número de bacterias viables/ml que corresponden a  $DO_{600}:1,00$  en cultivos de *A. brasilense* Cd *nifA-lacZ* crecidos en medio MML en condiciones controles como de estrés salino (300 mM NaCl), no encontrándose diferencias en la viabilidad de ambos cultivos (tabla N° 5). Sin embargo el rendimiento de *A. brasilense* en medio MML es inferior en dos órdenes de magnitud al producido en medio L\*.

**Tabla N° 5. Viabilidad de *Azospirillum brasilense* Cd *nifA-lacZ* en condiciones control (C) y de estrés salino (T) en medio MML a DO<sub>600</sub>: 1.00**

<b>Medio de cultivo</b>	<b>UFC /ml</b>
MML (C)	$5,90 \times 10^6 \pm 0,96^a$
MML suplementado Con 300 mM de NaCl (T)	$5,36 \times 10^6 \pm 1.02^a$

Los datos son la media  $\pm$  el error estándar de 4 determinaciones. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

#### **IV.1.b.ii. Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de *Zea mays*:**

El propósito principal de este experimento fue evaluar los efectos de diferentes concentraciones de NaCl sobre la dinámica del crecimiento de la raíz. El desarrollo de plántulas de maíz en medio MPCL solo y suplementado con 250 y 300 mM de NaCl fue seguido durante 6 días. A 300 mM de NaCl (osmolaridad: -1.277MPa), las plántulas presentaron un crecimiento tanto radical como aéreo muy deficiente, sin raíces laterales. A 250 mM de NaCl (osmolaridad: -1.085 Mpa), aunque hubo una diferencia evidente con respecto a las plantas controles, se observó desarrollo de raíces laterales (Fig. N° 1).

En vista de estos resultados se decidió llevar a cabo el subsecuente análisis con concentraciones de 200 y 250 mM de NaCl en el medio de la planta.



**Fig. N° 1. Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de *Zea mays*.**

**IV.1.b.iii. Adsorción y anclaje de *Azospirillum brasilense* Cd a raíces de plántulas de maíz crecidas bajo estrés salino:**

El grado de adherencia de *A. brasilense* Cd a raíces de maíz fue estimado por el ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la cual en el ensayo utilizado está relacionada al número de bacterias asociadas al sistema radical (Katupitiya *et al.*, 1995). La tabla N° 6 muestra que ambos pasos de la adherencia (adsorción y anclaje) están significativamente disminuidos con respecto al grupo control.

Previamente se demostró que la bacteria creciendo bajo condiciones de estrés salino presentaría alteraciones que conducen a una inadecuada adherencia a raíces de plántulas normales. El presente resultado demuestra que ambos componentes, planta y bacteria, son esenciales en la asociación. Por otra parte, el estrés salino no sólo afecta el crecimiento de la bacteria sino también las etapas tempranas del crecimiento de la planta.

Aún cuando los estudios de adsorción y anclaje fueron llevados a cabo con bacterias controles en un medio normal (TCC), la adherencia resultó afectada; lo mismo ocurre cuando la bacteria estresada se adhiere a una raíz control en medio normal, demostrando que tanto la bacteria como la planta sufren alteraciones que persisten y se hacen manifiestas a posteriori en los ensayos de adsorción y anclaje.

**Tabla N° 6. Adherencia de *Azospirillum brasilense* Cd a raíces de maíz bajo estrés salino (actividad  $\beta$ -galactosidasa expresada en unidades Miller.  $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  de prot de la planta.)**

TRATAMIENTO	ADSORCIÓN	ANCLAJE
CCC	7.71 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	138.46 $\pm$ 20.85 <sup>c</sup>
TCC	2.52 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>	68.02 $\pm$ 9.52 <sup>d</sup>
TTT	4.53 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>	41.87 $\pm$ 5.07 <sup>d</sup>

Los datos son la media  $\pm$  error estándar de 5 experimentos (en cada experimento se utilizaron 3-4 raíces por tratamiento). CCC: Plántulas controles - Bacteria control - Medio control. TCC: Plántulas tratadas (200 mM NaCl) - Bacteria control- Medio Control. TTT: Plántulas tratadas (200 mM NaCl) - Bacteria tratada (300 mM NaCl) - Medio tratado (200 mM NaCl). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

#### **IV.1.b.iv. Determinación del patrón de colonización de *Azospirillum brasilense* a raíces de plántulas de maíz:**

La Fig. N° 2 muestra los resultados de la inoculación de plántulas controles y estresadas con bacterias controles y estresadas. Las plántulas controles no inoculadas presentan un desarrollo radical normal (I), mientras que las inoculadas tanto con bacterias controles como estresadas (II y III respectivamente) muestran un mayor número de raíces laterales, con un incremento en la densidad y longitud de los pelos radicales. Asimismo,

las plántulas crecidas en NaCl 200 o 250 mM e inoculadas (V, VI, VIII y IX) presentan un mejor desarrollo que las no inoculadas (IV y VII). Sin embargo hay una evidente diferencia entre las plántulas crecidas en NaCl 200 mM y aquellas en 250 mM inoculadas con bacteria control (V y VIII) y también entre este grupo (V) y el inoculado con *Azospirillum* estresado (VI), donde se observa una mayor expansión radical en el inoculado con bacteria normal (V). En todas las muestras inoculadas se observó un velo (material fibrilar) adherido principalmente a las raíces laterales.

La colonización fue examinada a los 21 días postinoculación de *Azospirillum brasilense* Cd (*nifA-lacZ*). Después del tñido de las raíces, las bacterias fueron detectadas como zonas azules sobre la superficie radical (Fig. N° 3). Las raíces de plántulas no inoculadas permanecieron blancas (I). En las plántulas controles inoculadas ya sea con bacterias crecidas en condiciones normales como estresantes, el patrón de colonización fue similar, con las bacterias localizadas principalmente en las partes superiores del sistema radical (II y III). La zona de elongación no presentó desarrollo de color concordando con las observaciones realizadas por Vande Broek *et al.* (1993) en trigo. La intensidad del tñido fue menor en las plántulas crecidas en presencia de NaCl 200 mM e inoculadas con bacterias controles (V) y casi ausente en el grupo inoculado con bacterias estresadas (VI). Los resultados con plántulas creciendo en presencia de NaCl 250 mM fueron similares.



I

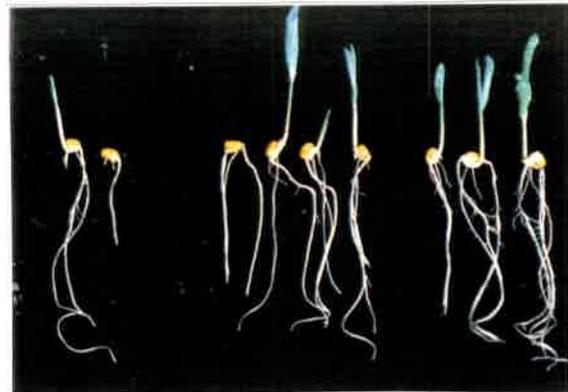
II

III

IV

V

VI

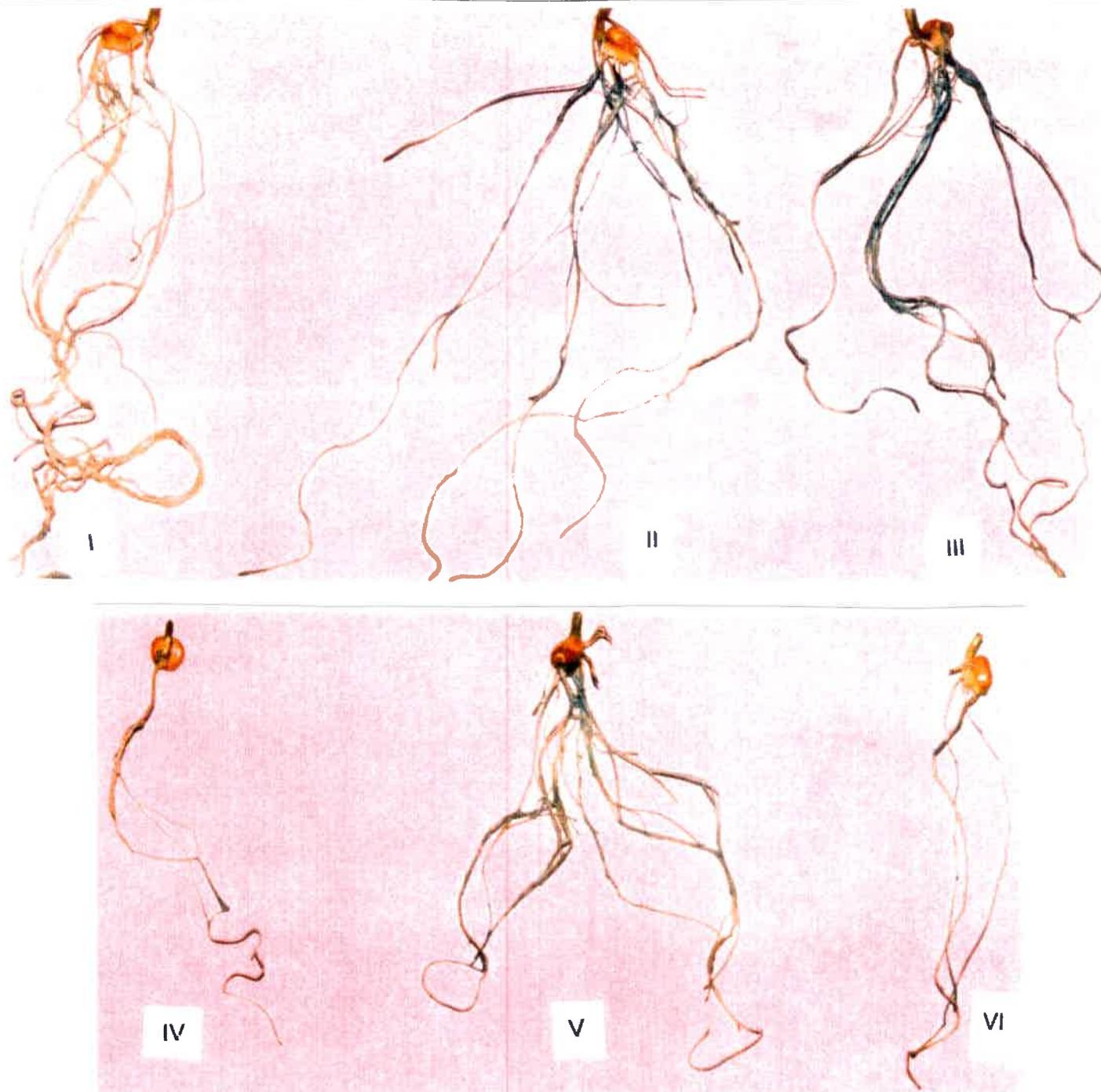


VII

VIII

IX

**Fig. N° 2. Plántulas de maíz crecidas en MPCL sin nitrógeno, suplementado con 0,1 % de fructosa. I, II y III MPCL control; IV, V y VI MPCL suplementado con 200 mM de NaCl o 250 mM, VII, VIII y IX. No inoculadas I, IV y VII; e inoculadas con *Azospirillum brasilense* ( $6 \times 10^6$  UFC/planta) II, V y VIII y con *Azospirillum brasilense* crecido en 300 mM de NaCl.**



**Fig. N° 3. Colonización de raíces de maíz por *Azospirillum brasilense* (*nifA-lacZ*).** I, plántula control sin inocular. II, plántula control inoculada con *Azospirillum brasilense* (*nifA-lacZ*). III, raíces controles inoculadas con bacteria estresada. IV, raíces de plántulas crecidas en medio suplementado con 200 mM de NaCl, no inoculadas. V, raíces de plántulas crecidas en medio suplementado con 200 mM de NaCl, e inoculadas con bacteria control. VI, raíces de plántulas crecidas en medio suplementado con 200 mM de NaCl, e inoculadas con bacteria estresada.

## IV.2. CARACTERIZACIÓN DE COMPONENTES SUPERFICIALES DE *Azospirillum brasilense* EN CONDICIONES NORMALES Y EN ESTRÉS SALINO

A partir de los resultados precedentes hemos avanzado en la caracterización de diferentes componentes de la superficie bacteriana con el propósito de investigar si existen diferencias en la constitución de bacterias crecidas en condiciones normales y la de aquellas crecidas en salinidad donde expresan una menor adhesión y colonización radical.

### IV.2.a. Polisacáridos:

Los exopolisacáridos (EPS) son polímeros de carbohidratos secretados por una amplia variedad de bacterias. Pueden permanecer asociados a la pared celular para formar una capa unida a la cápsula o ser liberados al medio como mucosidad extracelular. Los EPS capacitan a las bacterias de vida libre para adherirse y colonizar superficies sólidas, donde se acumulan los nutrientes (Costa, 1991).

Se demostró que el estrés salino afecta ambos pasos del mecanismo de adherencia: adsorción y anclaje. La segunda fase se vió más afectada por las condiciones de estrés, encontrando una disminución marcada en el número de bacterias que se anclan a las raíces de maíz. Dado que este mecanismo podría ser mediado polisacáridos de la superficie celular como EPS, hemos investigado la producción cuali cuantitativa de los mismos en bacterias crecidas en distintas condiciones.

### IV.2.a.i. Tinción con calcofluor:

Se cultivó *A. brasilense* en medio L\* sólido control y tratado, suplementado con 200 µg/ml de calcofluor, un colorante fluorescente que tiene la propiedad de unirse específicamente a EPS con uniones  $\beta$  1-3 y  $\beta$  1-4 (Michiels *et al.*, 1990). Luego de 48 h de crecimiento, las colonias en el medio suplementado con NaCl de apariencia seca y rojas, fueron más pequeñas que las controles, de apariencia mucoide y más claras (Fig. Nº 4.a). Estos cambios en la morfología podrían estar relacionados con alteraciones en la producción de EPS. Dichas colonias fueron posteriormente examinadas en un

microscopio de epifluorescencia (Zeiss) a 365 nm. Los resultados (Fig. N° 4.b) sugieren que las bacterias crecidas en condiciones de estrés tienen menor fluorescencia que el control, indicando alteraciones en la producción de EPS u otras estructuras extracelulares de naturaleza sacarídica.



**Fig. N° 4.a. Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en placas de LB agar con (izquierda) y sin 300 mM de NaCl.**

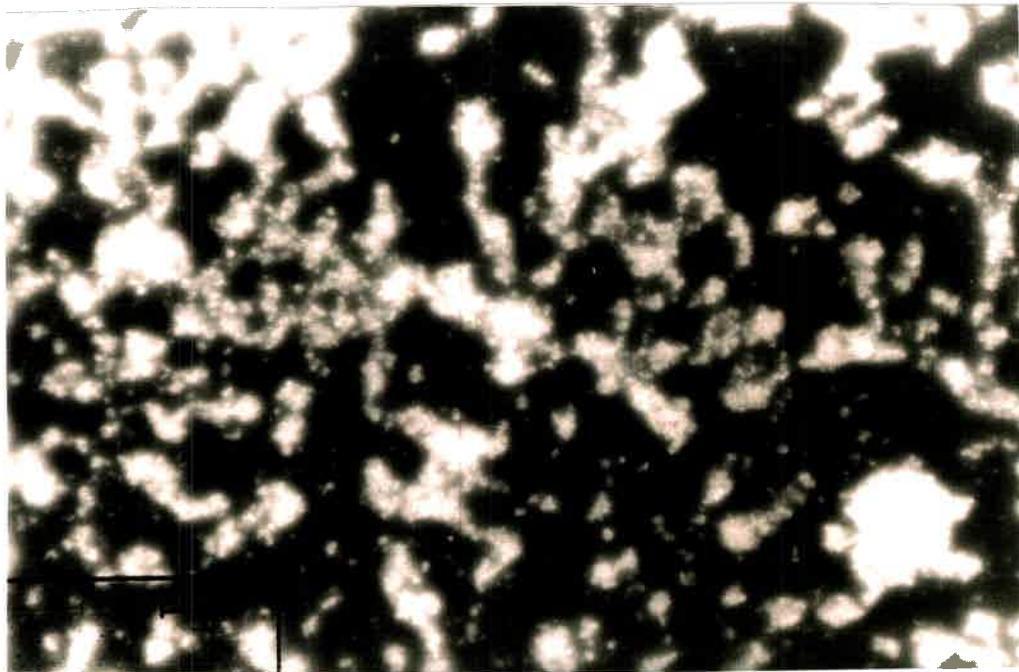
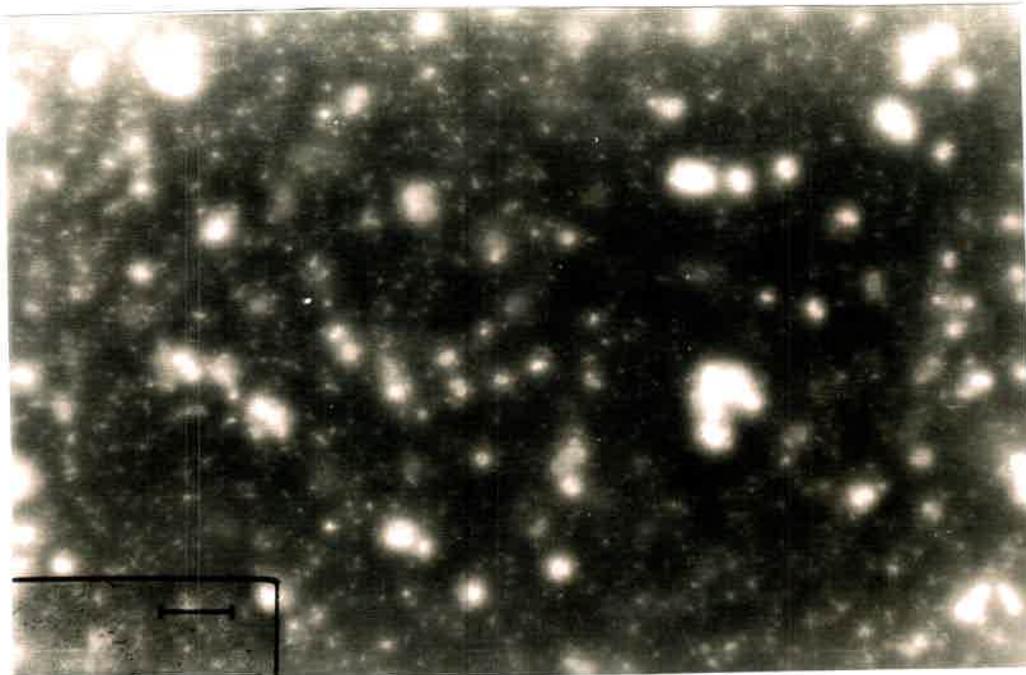


Fig. N° 4.b. Microfotografía de fluorescencia de *Azospirillum brasilense* crecido en medio LB calcofluor con (arriba) o sin (abajo) 300 mM de NaCl.

#### IV.2.a.ii. Determinación cuantitativa de los exopolisacáridos (EPS) de *A. brasilense* bajo condiciones de estrés salino:

Los resultados de la tabla N° 7, muestran una disminución significativa en la producción de EPS en los tres grupos analizados. El estrés salino altera el contenido de estas moléculas tanto cuando la bacteria crece en presencia de NaCl 300 mM desde el comienzo (Tc y Tt), como cuando es sometida a estrés luego de haber crecido en medio normal (Ct).

Tabla N° 7. Contenido de exopolisacáridos (EPS) de *Azospirillum brasilense* Cd en las mismas condiciones de anclaje.

μg EPS/mg proteínas			
Cc	Tc	Ct	Tt
228.48 ± 2.85 <sup>a</sup>	89.74 ± 7.30 <sup>b</sup>	104.39 ± 12.09 <sup>b</sup>	82.46 ± 7.30 <sup>b</sup>

Donde Cc: son los EPS de bacterias crecidas hasta DO<sub>600</sub>:1.00 en condiciones controles y mantenidas en medio NMF control durante 24 h. Tc: son los EPS de bacterias crecidas hasta DO<sub>600</sub>:1.00 en condiciones de estrés salino y mantenidas en medio NMF control durante 24 h. Ct: son los EPS de bacterias crecidas en condiciones controles hasta DO<sub>600</sub>:1.00 y mantenidas en medio NMF tratado (300 mM de NaCl) durante 24 h. Tt: son los EPS de bacterias crecidas hasta DO<sub>600</sub>:1.00 en condiciones de estrés salino y mantenidas en medio NMF tratado durante 24 h. n: 4-6. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD, p<0.05).

#### IV.2.a.iii. Determinación del contenido y perfil de glucanos de *Azospirillum brasilense* Cd en condiciones de estrés salino:

Una amplia variedad de bacterias Gram negativas sintetizan glucanos periplásmicos de bajo peso molecular. En todos los miembros de la familia *Rhizobiaceae* se han encontrado β-glucanos cíclicos y estas moléculas juegan un rol clave en la interacción con la planta además de participar en la adaptación hipoosmótica. Mutantes de *Sinorhizobium meliloti* y *Agrobacterium tumefaciens* deficientes en la producción de glucanos cíclicos β (1-2), forman nódulos vacíos e inefectivos o son avirulentas. Por otra

parte dichas mutantes son incapaces de crecer cuando son sometidas a un medio hipoosmótico, restaurándose su crecimiento con la adición de solutos al medio (Breedveld y Miller, 1994). En *Azospirillum brasilense* se informó la presencia en periplasma, de un glucano lineal  $\beta$  (1-3),  $\beta$  (1-6) cuya síntesis está regulada por la fuerza osmótica del medio de crecimiento (Altabe *et al.*, 1994); sin embargo hasta el momento no se han realizado estudios de su rol en la interacción con la planta.

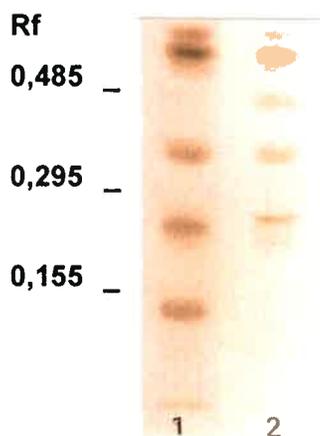
En vista de estos antecedentes se decidió realizar un estudio cuali y cuantitativo de los glucanos de *Azospirillum brasilense* en condiciones hiperosmóticas.

**Tabla N° 8. Contenido de glucanos de *Azospirillum brasilense* Cd.**

$\mu\text{g}$ Glucanos/mg proteínas	
C	T
$22.36 \pm 0.91^a$	$9.76 \pm 1.14^b$

C: bacteria crecidas en medio control, T: bacterias crecidas en medio salino (NaCl 300 mM). n: 4-6. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

Como puede observarse en la tabla N° 8, el contenido de glucanos de las bacterias tratadas está disminuido en un 56% con respecto al grupo control. El análisis de la TLC revela que un glucano de Rf 0.155 desaparece y dos bandas nuevas fueron visibles (Rf: 0,295; 0,485) en la bacteria estresada (Fig. N° 5).



**Fig. N° 5. Perfil de glucanos periplásmicos de *Azospirillum brasilense* 1, bacteria control. 2, bacteria tratada (NaCl 300 mM).**

#### IV.2.a.iv. Análisis de lipopolisacáridos (LPS) de *A. brasilense* Cd:

Los lipopolisacáridos son los componentes mayoritarios de la membrana externa de bacterias Gram negativas. Estas moléculas de superficie son relevantes para la estabilidad de la membrana y para la interacción de la bacteria con otros organismos y con el medio ambiente (Carlson *et al.*, 1978)

Es conocido que los LPS de *Rhizobium* juegan un rol en el mecanismo de interacción de este microorganismo con las leguminosas; sin embargo hasta el momento no se han reportado estudios sobre la función que estas macromoléculas cumplen en la interacción *Azospirillum*-planta.

Es por ello que se decidió a analizar los LPS de la bacteria en estudio en condiciones de estrés salino, observando diferencias en la movilidad electroforética con respecto al control (Fig. N° 6).



**Fig. N° 6. Análisis electroforético de los LPS de *Azospirillum brasilense*.  
1, bacteria control. 2, bacteria tratada (NaCl 300 mM).**

Estos resultados en conjunto, demuestran que los componentes polisacáridicos de la envoltura celular de *Azospirillum brasilense* cambian cuando la bacteria es sometida a estrés salino. Probablemente estos cambios sean parte de un mecanismo de adaptación del microorganismo al nuevo medio ambiente y podrían ser los responsables de las alteraciones observadas durante la fase de anclaje de *Azospirillum brasilense* a raíces de maíz.

En cuanto a la disminución en el contenido de EPS en respuesta al estrés salino, Lloret *et al.* (1998), encontraron resultados semejantes estudiando una cepa halotolerante de *S. meliloti*, aislada de una leguminosa creciendo en suelos salinos. Estos autores observaron una modificación en la producción de polisacáridos extracelulares en respuesta a sal, con una disminución del 40% en la producción de EPS. El análisis de los EPS producidos por esta cepa y una mutante isogénica Tn5-*lacZ* no mucoide, demostró que la expresión del galactoglucano (EPSII), está disminuida 10 veces en presencia de sal, y que esta disminución es regulada a nivel transcripcional.

La modificación de polisacáridos extracelulares ha sido descrita frecuentemente como una respuesta a diferentes condiciones del medio ambiente y fisiológicas. La mayoría de los reportes se refiere a modificaciones en el patrón electroforético de los LPS o a la antigenicidad de los mismos. Lloret *et al.* (1995) observaron cambios en el perfil electroforético de los LPS de una cepa halotolerante de *S. meliloti* inducidos por la sal. Estos resultados concuerdan con los cambios observados en la movilidad electroforética de los LPS de *A. brasilense* en presencia de sal.

#### **IV.2.b. Proteínas:**

Habiendo determinado previamente que *Azospirillum brasilense* se adsorbe en menor número en condiciones de estrés salino y teniendo como antecedente que ciertas proteínas serían las responsables de esta fase de la interacción (Croes *et al.*, 1993), se investigó el patrón de proteínas de membrana externa, periplásmicas y totales en bacterias crecidas en condiciones normales y en elevadas concentraciones de sal.

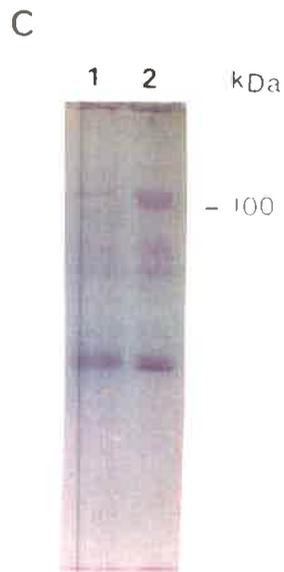
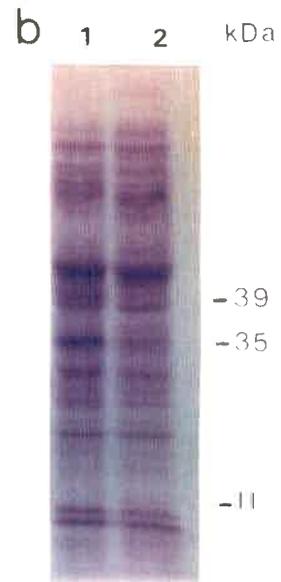
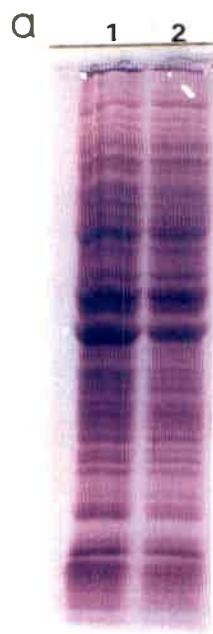
#### **IV.2.b.i. Análisis de proteínas totales, periplásmicas y de membrana externa de *Azospirillum brasilense* Cd:**

Como una primera aproximación se estudiaron las proteínas totales expresadas por *Azospirillum brasilense* Cd en condiciones de estrés salino.

El perfil de proteínas totales de bacterias crecidas en condiciones de estrés salino no muestra cambios significativos con respecto al de bacterias crecidas en condiciones normales posiblemente debido a la complejidad del patrón (Fig. N° 7.a). Por el contrario, el análisis de proteínas periplásmicas de bacterias estresadas muestra varias diferencias con respecto al control. Las bandas de 26, 30, 35 y 41 kDa están significativamente disminuidas en el grupo tratado, mientras que la proteína de 39 kDa desaparece en dicho grupo. Otra diferencia observable es la aparición de una proteína de 11 kDa que se encuentra ausente en el grupo control (Fig. N° 7.b).

Los cambios más importantes ocurren a nivel de proteínas de membrana externa. El patrón de estas proteínas consiste en cuatro bandas principales con un peso molecular aproximado de 42, 100, 116 y 122 kDa. Las proteínas de 100 y 122 kDa están ausentes en las bacterias que crecieron en condiciones de estrés (Fig. N° 7.c). Es interesante destacar que la proteína de 100 kDa tiene el mismo peso molecular y localización que la proteína del flagelo polar de *A. brasilense*, el cual ha sido implicado como uno de los responsables de la adsorción de la bacteria a las raíces (Croes *et al.*, 1993). Estudios posteriores demostraron glicosilación de la flagelina del flagelo polar de *A. brasilense*, lo cual permite atribuirle propiedades de adhesina, ya sea como un ligando para lectinas presentes en la raíz de la planta o bien como una lectina que reconoce azúcares de la planta (Moens *et al.*, 1995).

Debe considerarse la posibilidad que la ausencia de la proteína de 100 kDa en *A. brasilense* esté relacionada a cambios en la estructura flagelar que pueden estar asociados al fenotipo de adsorción observado.



**Fig. N° 7. Perfil de proteínas de *Azospirillum brasilense***  
a) Proteínas totales. 1, control; 2, tratado. b) Proteínas periplásmicas. 1, control; 2, tratado. c) Proteínas de membrana externa. 2, control; 1, tratado.

### IV.3. TRANSCRIPCIÓN DE GENES PROMOTORES DE LA FIJACIÓN DE NITRÓGENO POR EXUDADOS RADICALES EN CONDICIONES NORMALES Y DE ESTRÉS SALINO

#### IV.3.a. Inducción de la transcripción de genes promotores de la fijación de nitrógeno por exudados radicales de maíz:

Ha sido demostrado que *Azospirillum* produce cambios en la exudación radical (Volpin *et al.*, 1996). Por otra parte, Van Bastelaere *et al.* (1993) demostraron que la expresión génica en *Azospirillum* está influenciada por la presencia de exudados radicales de la planta. También se ha informado que los exudados radicales están involucrados en la interacción planta-bacteria. Ellos no solo afectan la fijación de nitrógeno, sino también la adherencia (Gafny *et al.*, 1986; Bashan y Levanony, 1989). A partir de estas observaciones se investigó si los exudados radicales de maíz son capaces de inducir la transcripción de los genes necesarios para la fijación de nitrógeno en *Azospirillum brasilense*, y si dicha inducción se modifica cuando la bacteria es sometida a estrés salino.

#### IV.3.a.i. Transcripción de genes promotores de la fijación de nitrógeno en *A. brasilense* bajo condiciones de estrés salino:

La tabla N° 9 muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa como una expresión de la fusión *nifA-lacZ* de *A. brasilense* en presencia de aire. Bajo estrés salino, la bacteria (T) exhibe una mayor expresión que el grupo control (C). Sin embargo bajo condiciones microaeróbicas, la expresión de la fusión *nifH-lacZ* se encontró significativamente disminuida en la bacteria estresada (Tabla N° 10). Liang *et al.* (1991, 1992) demostraron que la fusión *nifA-lacZ* se expresaba a partir de su propio promotor no solamente bajo condiciones favorables para la fijación de nitrógeno, sino también en presencia de amonio y/o aire. Ya que la presencia de oxígeno y amonio son incompatibles con la fijación de nitrógeno o con la expresión de la fusión *nifH-lacZ*, ha sido propuesto que el producto de *nifA* es sintetizado en una forma inactiva bajo estas condiciones (Liang *et al.*, 1991). Así, en los resultados mostrados en la tabla N° 9, NifA se encontraba inactiva. En la Tabla N°

10, el grupo control mostró una expresión normal de la fusión *nifH-lacZ*; en este experimento, NifA (la proteína regulatoria necesaria para la expresión de *nifH*) estaba activa. Estos resultados sugieren que hay una alteración en la activación de esta proteína en la bacteria estresada.

#### **IV.3.a.ii. Inducción de la transcripción de *nifA* y *nifH* por exudados radicales de maíz:**

La bacteria fue incubada en presencia o ausencia de exudados radicales provenientes de plántulas de maíz controles o estresadas (crecidas con 200 mM de NaCl). Previamente, se ensayaron diferentes concentraciones y tiempos de incubación para estandarizar las condiciones experimentales. La Fig. N° 8 muestra que la concentración de exudado y tiempo de incubación óptimos fueron 10x y 4 h respectivamente. Tanto el exudado control (CE<sub>EXC</sub>) como el tratado (CE<sub>EXT</sub>) inducen una mayor expresión de la fusión *nifA-lacZ* en la bacteria control, pero no aumentan significativamente en la bacteria estresada (Tabla N° 9). Estos resultados apoyan la idea de que los exudados radicales podrían estar involucrados en la modulación de ciertos procesos bacterianos, como la fijación de nitrógeno. Así, en la bacteria control, ellos inducen la transcripción de *nifA*, conduciendo a una mayor producción de NifA, que una vez activada promueve la transcripción de *nifHDK* y otros operones *nif*. Sin embargo, cuando la bacteria conteniendo la fusión *nifH-lacZ* fue incubada en presencia de exudados radicales bajo condiciones microaeróbicas, no se observó inducción ni en el grupo control ni en el tratado (Tabla N° 10).

La ausencia de respuesta a los exudados en la bacteria tratada podría estar relacionada con las alteraciones observadas en el patrón de proteínas de la membrana externa, exopolisacáridos y lipopolisacáridos. En relación a esto, Schloter *et al.* (1994), Lüderiz *et al.* (1982), Michiels *et al.* (1990), entre otros, han demostrado la importancia de los polisacáridos de superficie (EPS y LPS), componentes principales de la membrana externa de *Azospirillum*, para la estabilidad de la membrana, permeabilidad celular y para la interacción con otros organismos y el medio ambiente.

Las modificaciones producidas por el estrés salino en la composición química de *Azospirillum* podrían impedir la respuesta a la señal externa producida por los exudados.

Por otra parte la disminución observada en la transcripción de *nifH-lacZ* en la bacteria sometida a estrés salino, sugiere que bajo estas condiciones la fijación de nitrógeno en *A. brasilense* se encuentra afectada.

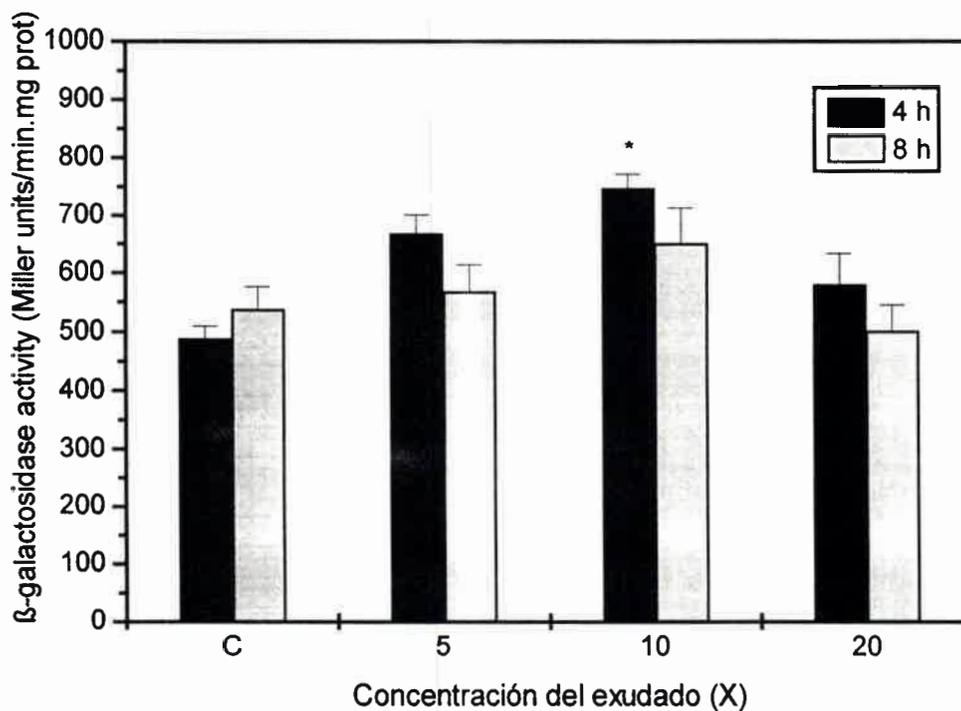


Fig. N° 8. Efecto de los exudados radicales de *Zea mays* sobre la actividad  $\beta$ -galactosidasa de *Azospirillum brasilense* Cd *nifA-lacZ* crecido hasta  $DO_{600}=1$  a diferentes tiempos de incubación (4 y 8 h). C: control sin exudados.

**Tabla N° 9. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *nifA-lacZ* de *Azospirillum brasilense* Cd: Inducción por exudados de *Zea mays*.**

Tratamiento	Unidades Miller .min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> prot.
C	514.09±22.23 <sup>a</sup>
C Ex <sub>C</sub>	657.73±83.45 <sup>b</sup>
C Ex <sub>T</sub>	707.21±56.88 <sup>bc</sup>
T	696.74±63.89 <sup>bc</sup>
T Ex <sub>C</sub>	798.10±58.85 <sup>c</sup>
T Ex <sub>T</sub>	772.41±13.96 <sup>c</sup>

Los valores son la media  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos. En cada experimento el número de determinaciones fue 5-6. Los cultivos se incubaron hasta OD<sub>600</sub>=1. Tiempo de incubación, en presencia de aire: 4 h. C: Bacteria control. C-Ex<sub>C</sub>: Bacteria control + exudado control. C-Ex<sub>T</sub>: Bacteria control + exudado tratado. T: Bacteria tratada. T-Ex<sub>C</sub>: Bacteria tratada + exudado control. T-Ex<sub>T</sub>: Bacteria tratada + exudado tratado.

**Tabla N° 10. Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión *nifH-lacZ* de *Azospirillum brasilense* Cd: Inducción por exudados radicales de *Zea mays* provenientes de plántulas controles y sometidas a estrés salino.**

Tratamiento	Unidades Miller .min <sup>-1</sup> .mg <sup>-1</sup> prot.
C	756.89±114.07 <sup>a</sup>
C Ex <sub>C</sub>	876.28±70.35 <sup>a</sup>
C Ex <sub>T</sub>	970.84±97.30 <sup>a</sup>
T	179.43±30.50 <sup>b</sup>
T Ex <sub>C</sub>	216.52±29.32 <sup>b</sup>
T Ex <sub>T</sub>	239.86±79.90 <sup>b</sup>

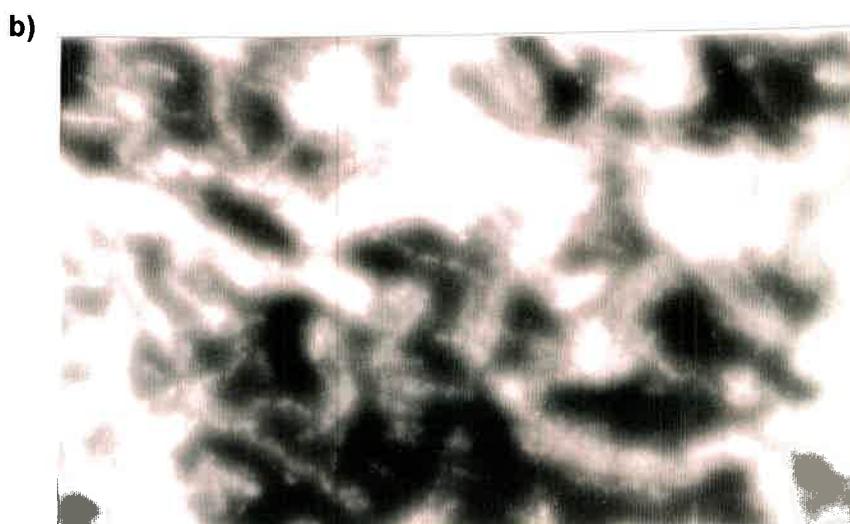
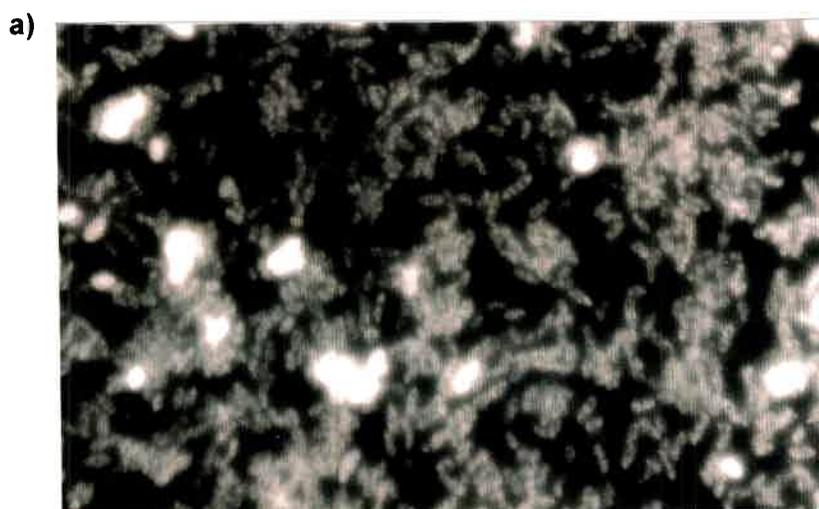
Los valores son la media  $\pm$  el error estándar de 4 experimentos. En cada experimento el número de determinaciones fue 5-6. Los cultivos crecieron hasta OD<sub>600</sub>=1. Tiempo de incubación 4 h, en medio MML sin NH<sub>4</sub>, bajo condiciones microaeróbicas ( 99.5% Ar y 0.5% O<sub>2</sub>). C: Bacteria control. C-Ex<sub>C</sub>: Bacteria control + exudado control. C-Ex<sub>T</sub>: Bacteria control + exudado tratado. T: Bacteria tratada. T-Ex<sub>C</sub>: Bacteria tratada + exudado control. T-Ex<sub>T</sub>: Bacteria tratada + exudado tratado.

#### **IV.4. ESTUDIOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD EMPLEANDO MUTANTES PUNTUALES DE *Azospirillum brasilense* Cd ALTERADAS EN LA SÍNTESIS DE EXOPOLISACÁRIDOS.**

En razón de los cambios observados en la producción de EPS en bacterias estresadas y con el propósito de investigar con más detalle la posible participación de este polisacárido en la tolerancia a salinidad, hemos abordado la construcción y caracterización fenotípica de mutantes alterados en la síntesis de EPS.

##### **IV.4.a. Selección de mutantes deficientes o hiperproductoras de EPS:**

La mutagénesis se realizó empleando el transposón Tn5, como se detalla en la sección III.10.a de esta tesis (Materiales y Métodos). Entre los transconjugantes de *Azospirillum* obtenidos, portadores de Tn5, no se pudieron seleccionar clones deficientes en EPS, pero sí una mutante Tn5 hiperproductora de EPS, designada Cd Tn5-PG. Dicha mutante fue seleccionada por medio de su crecimiento en placas conteniendo calcofluor y posteriormente examinada por microscopía de epifluorescencia. En la Fig. N° 9 puede observarse que dicha mutante presenta abundante material fibrilar rodeando a las células asociado a una mayor fluorescencia, fenotipo compatible con un mayor contenido de EPS con respecto a la cepa salvaje.



**Fig. Nº 9. Microfotografía de fluorescencia de *Azospirillum brasilense* cultivado en medio MML conteniendo calcofluor.**

**a) *Azospirillum brasilense* Cd (salvaje). b) *Azospirillum brasilense* Cd Tn5-PG.**

Para corroborar este resultado se determinó la producción de EPS según se describe en Materiales y Métodos.

En la tabla Nº 11 pueden observarse los resultados obtenidos:

Tabla N° 11. Contenido de EPS de *A. brasilense* Cd y *A. brasilense* Cd Tn5-PG.

$\mu\text{g}$ EPS/mg proteínas	
<i>A. brasilense</i> Cd (wt)	<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-PG
$46.57 \pm 3.16^a$	$94.71 \pm 5.88^b$

Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de cuatro determinaciones (n=4). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

Estos resultados demuestran que dicha mutante tiene una producción de EPS incrementada en aproximadamente 100 % con respecto a la cepa salvaje.

Se realizaron curvas de crecimiento para evaluar el comportamiento de dicha mutante bajo condiciones de salinidad (Fig. N° 10). Se encontró que muestra un retardo en el crecimiento en medio suplementado con 300 mM de NaCl comparada con la cepa salvaje (wt). Una posible explicación de este resultado surge al analizar el comportamiento de *A. brasilense* Cd cuando es sometido a estrés salino. Mientras la adaptación de este microorganismo al estrés salino va acompañada de una disminución en la producción de EPS (sección IV.2.a.II de resultados y discusión); esta mutante tiene incrementada la producción de polisacáridos extracelulares.

En medios sin el agregado de NaCl el comportamiento de ambas cepas fue similar. Estos resultados sugieren que la regulación en la síntesis de EPS tenga una participación importante en la tolerancia a estrés salino.

Otra característica estudiada en esta mutante fue el perfil electroforético de los LPS, ya que es frecuente que mutaciones en los EPS estén asociadas con cambios en los LPS. En la figura N° 11 puede observarse que no hay diferencias apreciables en el perfil electroforético de los LPS de la mutante con respecto a la cepa salvaje, sugiriendo que los LPS no se encuentran alterados en dicha mutante.

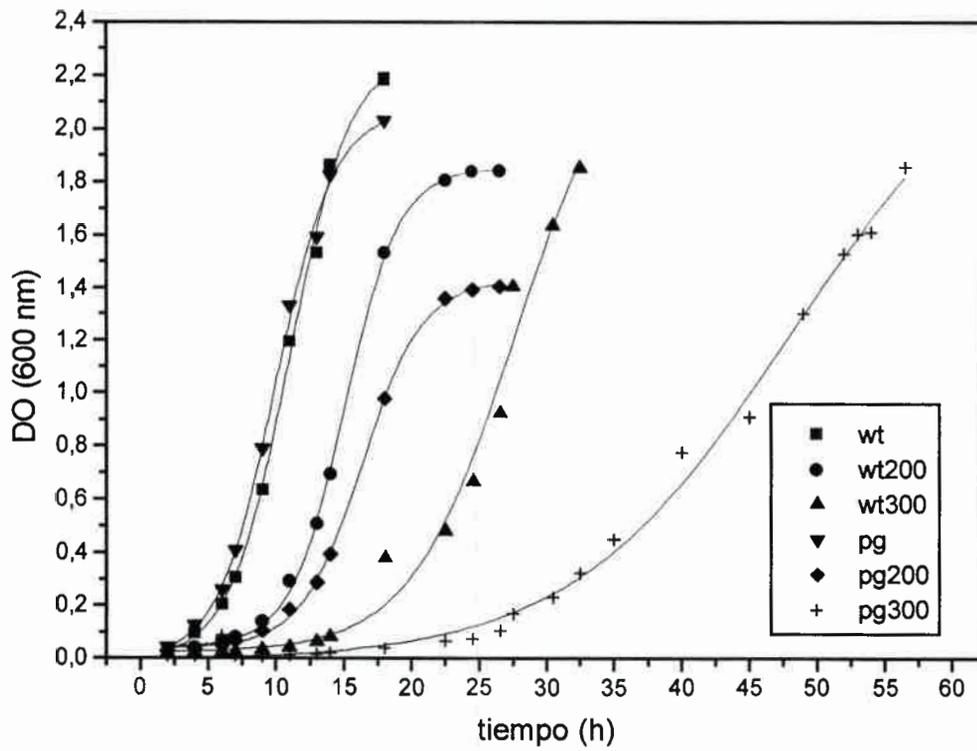


Fig. N° 10. Curva de crecimiento de *A. brasilense* Cd Tn5-PG en condiciones de estrés salino.

wt: *A. brasilense* Cd medio control; 200: medio suplementado con 200 mM de NaCl; 300: medio suplementado con 300 mM de NaCl. pg: *A. brasilense* Cd Tn5-PG.

## **IV.5. ESTUDIOS DE TOLERANCIA A SALINIDAD EMPLEANDO MUTANTES PUNTUALES DE *Azospirillum brasilense* Cd CON ALTERACIONES EN LOS LIPOPOLISACÁRIDOS.**

Con el objeto de investigar con más detalle la posible participación de los LPS en la tolerancia a salinidad y teniendo en cuenta los cambios observados en la movilidad electroforética de los LPS en condiciones de estrés salino y la carencia de estudios de los LPS en *Azospirillum*, hemos abordado la construcción y caracterización fenotípica de mutantes alterados en los LPS.

### **IV.5.a. Obtención de mutantes por transposición de *Azospirillum brasilense*:**

Se realizaron tres conjugaciones, de las cuales se obtuvieron 2800 transconjugantes. Todos ellos fueron analizados para sensibilidad aumentada a compuestos hidrofóbicos (SDS) en comparación al comportamiento de la cepa salvaje.

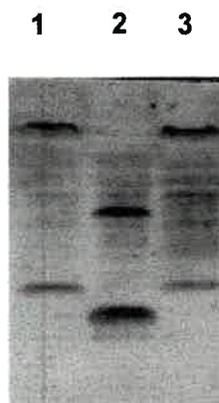
#### **IV.5.a.i. Selección de mutantes con LPS alterado:**

La máxima concentración de SDS que no produjo inhibición del crecimiento en la cepa salvaje fue la de 0.01%, razón por la que fue utilizada para la búsqueda de mutantes. Se seleccionaron 38 clones incapaces de crecer en medio sólido MML suplementado con 25 µg/ml de Km y SDS 0.01%.

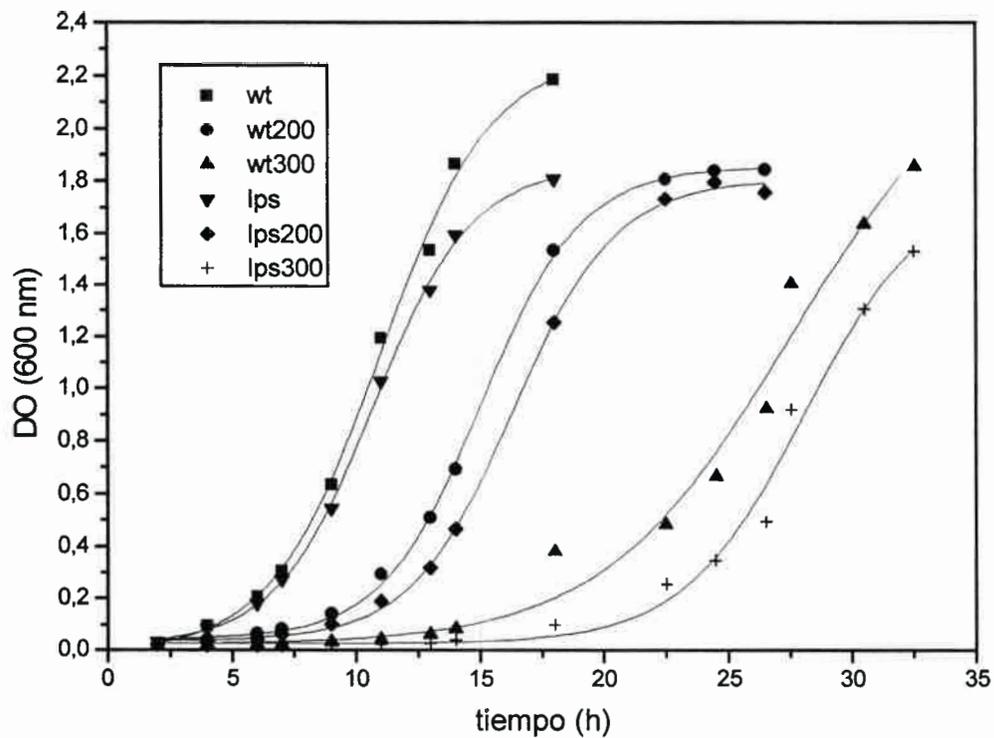
Para corroborar si la sensibilidad aumentada a SDS estaba asociada con alteraciones en los LPS se realizó el análisis de los mismos por electroforesis en geles de poliacrilamida.

La mutante seleccionada para estudios posteriores fue el clon 484 (denominado Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>) ya que presentó una movilidad electroforética alterada en forma apreciable. Los resultados se presentan en la Fig. N° 11. Dicha mutante fue analizada en su comportamiento en medios salinos mediante curvas de crecimiento en medio MML con y

sin el agregado de 200 y 300 mM de NaCl. Los resultados se presentan en la Fig. N° 12 donde puede observarse que no hay diferencias apreciables en el crecimiento con 200 y 300 mM de NaCl comparado con la cepa salvaje.



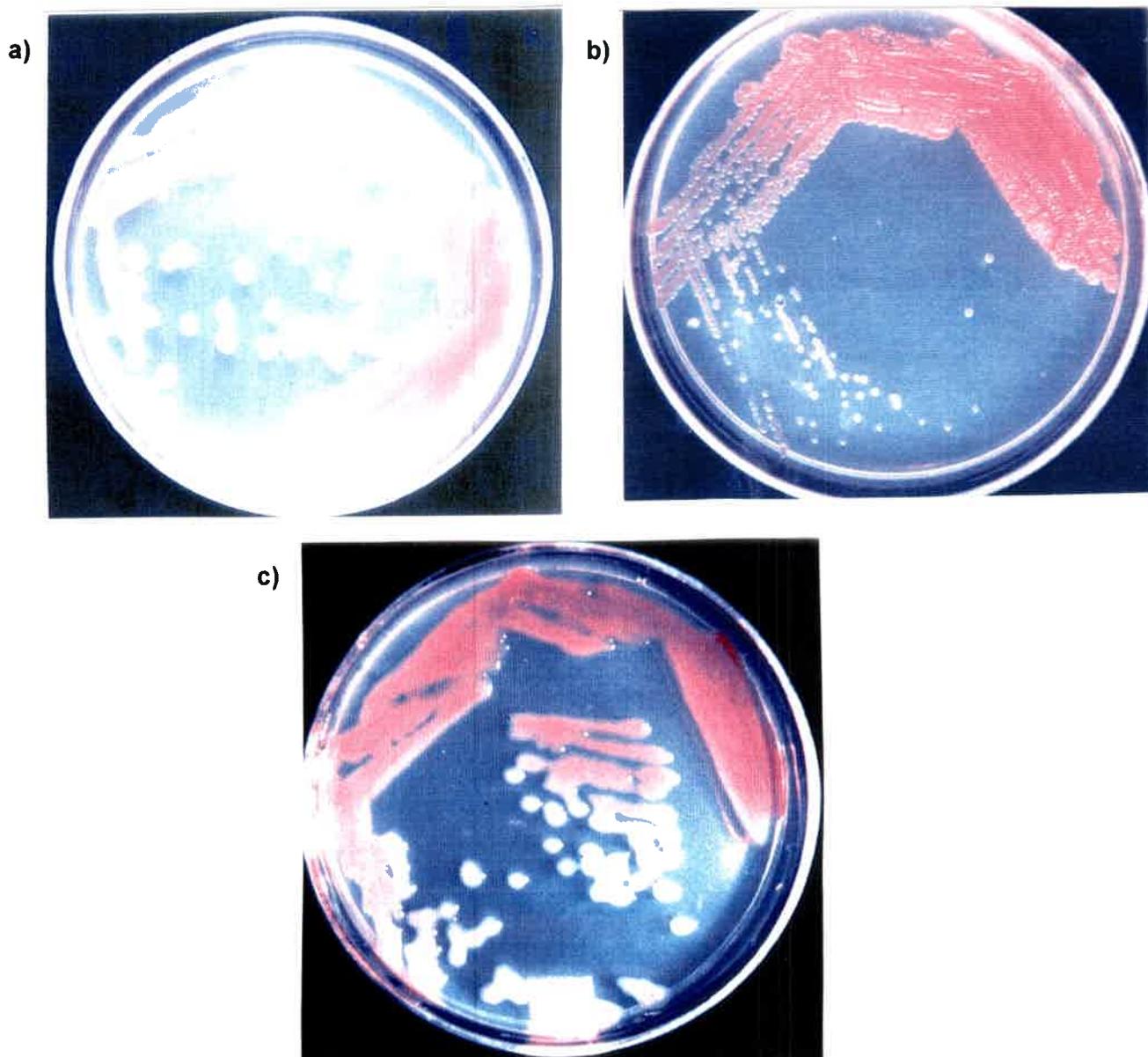
**Fig. N° 11. Perfil electroforético de los LPS de mutantes Tn5 de *Azospirillum brasilense Cd*.**  
**calles 1: *A. brasilense Cd* (wt); 2: clon con sensibilidad aumentada a SDS: 484-Tn5;**  
**3: *A. brasilense Cd* Tn5-PG.**



**Fig. N° 12. Curva de crecimiento de *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> en condiciones de estrés salino.**

**wt: *A. brasilense* Cd medio control; 200: medio suplementado con 200 mM de NaCl; 300: medio suplementado con 300 mM de NaCl; lps: *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>.**

Otra característica estudiada en esta mutante (Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>) fue la morfología de las colonias en medio MML. En la Fig. N° 13 puede observarse que las colonias de dicha mutante son más pequeñas y de aspecto no mucoso, contrariamente a lo que ocurre con la cepa salvaje y la mutante hiperproductora de EPS, donde las colonias son de mayor tamaño y mucosas. Por tanto, el aspecto de la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> en medio sólido no parece ser consecuencia de una menor producción de EPS respecto a la cepa salvaje.



**Fig. N° 13. Morfología de las colonias en medio MML de *A. brasilense* Cd (a), *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> (b) y *A. brasilense* Cd Tn5-PG (c).**

Debido a que el aspecto no mucoso de las colonias de la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>, podría estar relacionado a un menor contenido de EPS, se investigó la producción de estas moléculas, mediante el crecimiento en placas de medio MML conteniendo calcofluor. Los resultados mostraron que dicha mutante tiene niveles de fluorescencia comparables a su cepa parental, lo cual indicaría que no está afectada la producción de EPS. Este resultado fue confirmado mediante la determinación cuantitativa de EPS (tabla N° 12).

Tabla N° 12. Contenido de EPS de *A. brasilense* Cd y *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>, producidos en medio MML.

$\mu\text{g EPS/mg proteínas}$	
<i>A. brasilense</i> Cd (wt)	<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-LPS <sup>a</sup>
12,79 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	19,53 $\pm$ 5,76 <sup>a</sup>

Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de cuatro determinaciones (n=4). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD, p<0.05).

## IV.6. ESTUDIOS DE ADHERENCIA Y COLONIZACIÓN DE MUTANTES DE *Azospirillum brasilense* Cd ALTERADAS EN SU LPS, E HIPERPRODUCTORA DE EPS.

IV.6.a. Anclaje y colonización de las mutantes de *A. brasilense* Cd Tn5-PG y *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> a raíces de plántulas de maíz:

IV.6.a.i. Anclaje:

Se utilizaron plántulas de maíz de siete días de crecimiento, las cuales fueron inoculadas con  $6 \times 10^7$  UFC/plántula.

No se observaron diferencias significativas en el anclaje de las mutantes Cd Tn5-PG y Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> a raíces de maíz con respecto a la cepa salvaje (tabla N° 13). Estos resultados muestran por un lado, que una mayor producción de EPS no implica necesariamente un mayor número de bacterias ancladas. Por otra parte, en el caso de la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>, parecería ser que las alteraciones observadas en el perfil electroforético de los LPS no resultan en una incapacidad para el anclaje. Sin embargo no es posible descartar que los LPS no participen en este mecanismo.

Tabla N° 13. Anclaje de *A. brasilense* Cd Tn5-PG y *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> a raíces de plántulas de maíz.

	UFC inoculadas por plántula	UFC/raíz (anclaje)
<i>A. brasilense</i> Cd (wt) <i>nifA-lacZ</i>	$6,7 \times 10^7$	$1.53 \times 10^6 \pm 0.41^a$
<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-PG <i>nifA-lacZ</i>	$6,2 \times 10^7$	$1.58 \times 10^6 \pm 0.24^a$
<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-LPS <sup>a</sup> <i>nifA-lacZ</i>	$7,0 \times 10^7$	$0.95 \times 10^6 \pm 0.14^a$

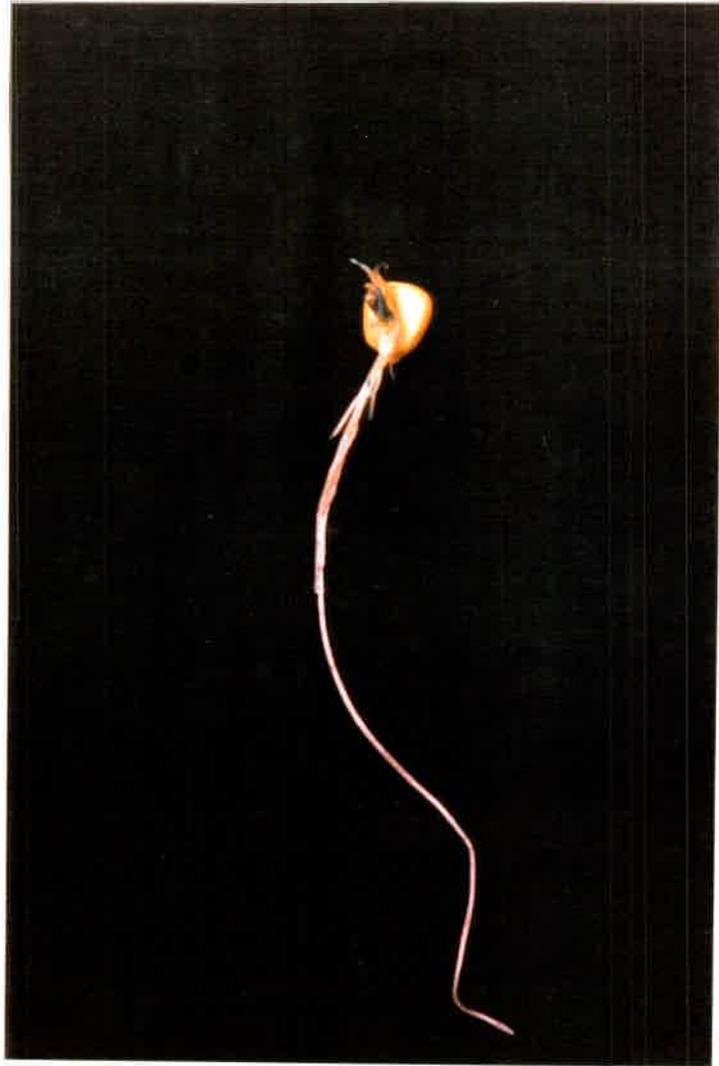
Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de cuatro determinaciones (n=4). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

#### IV.6.a.ii. Patrón de colonización:

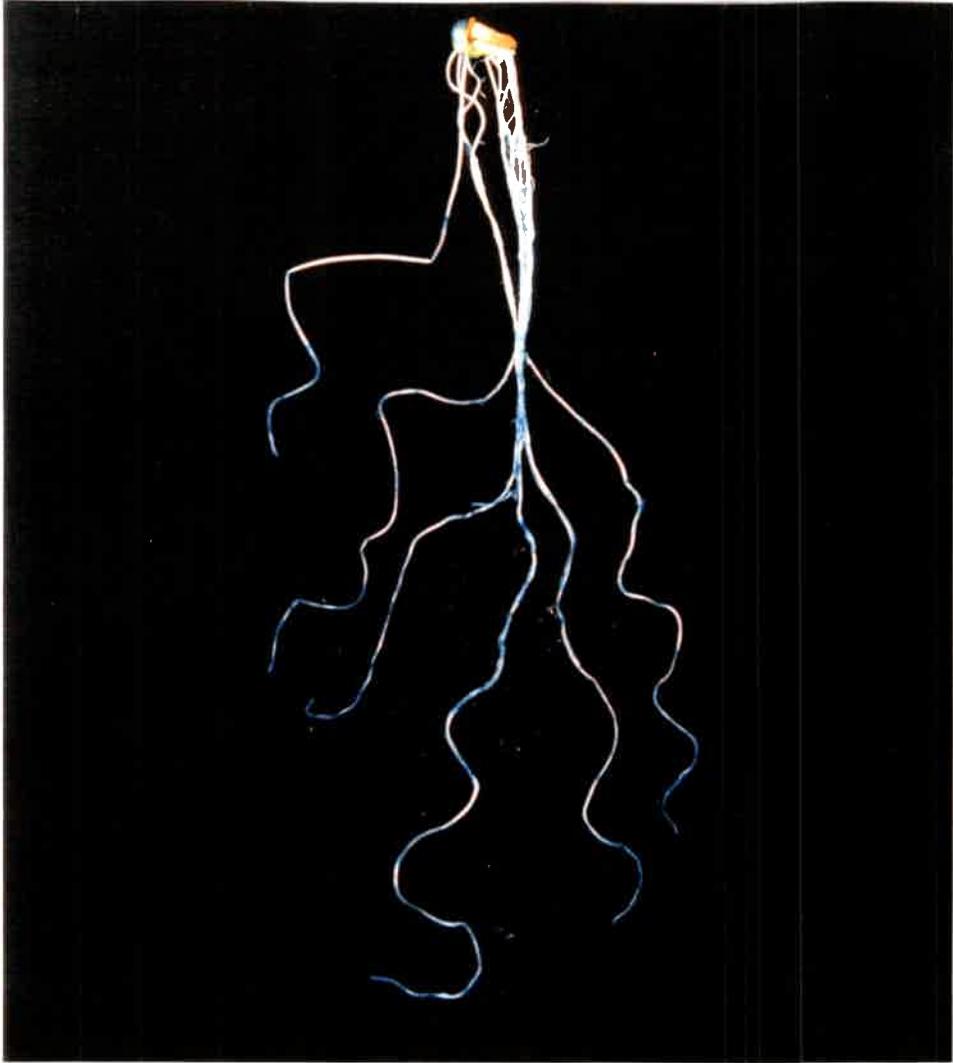
Cada planta fue inoculada con  $2,3 \times 10^7$  UFC. La colonización fue examinada a los 15 días después de la inoculación. Después del teñido las bacterias fueron detectadas como zonas azules sobre la superficie radical (Fig. N° 14).

El patrón de colonización de las mutantes Cd Tn5-PG y Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> muestra algunas alteraciones con respecto a la cepa salvaje. En el caso de la mutante Cd Tn5-PG, se observa muy poca colonización tanto en las plántulas controles (C pg), como tratadas (T pg). Es posible que la sobreproducción de EPS perturbe la colonización radicular en alguna etapa posterior al anclaje (ver tabla N° 13).

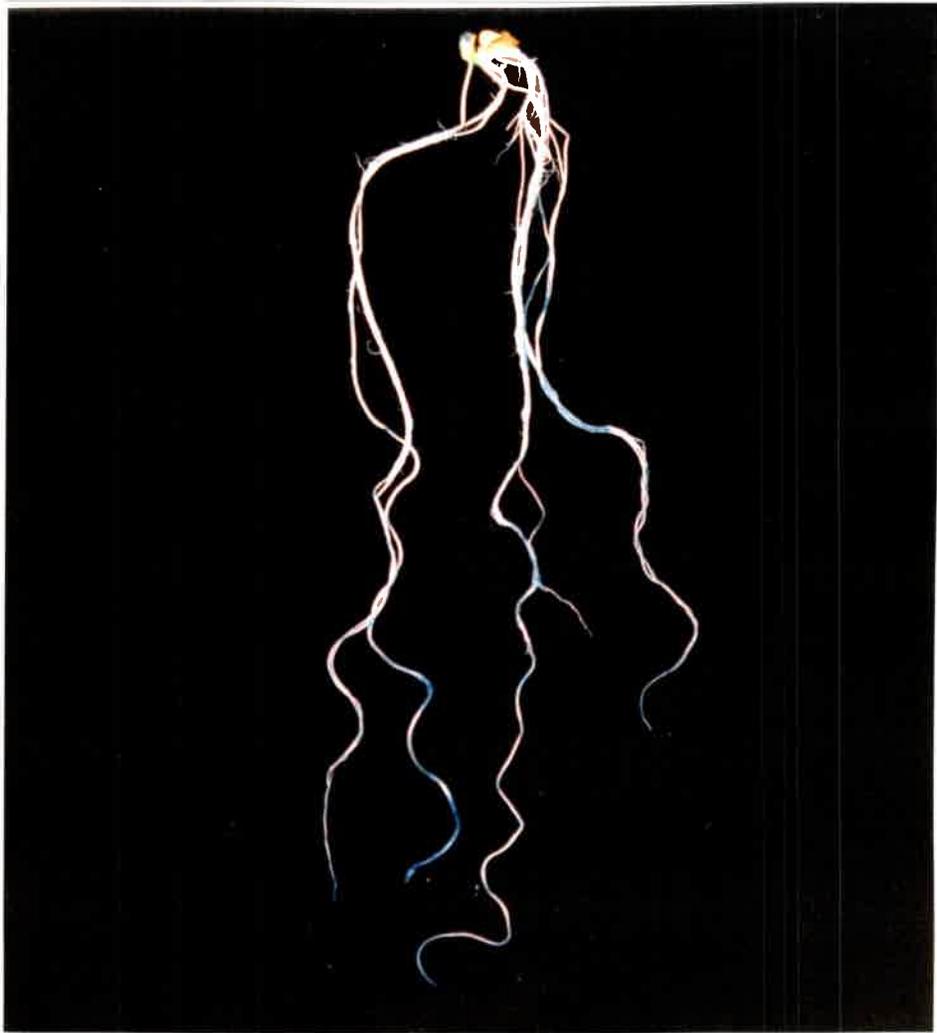
En la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>, la colonización de plántulas controles (C lps) también fue inferior a la de la cepa salvaje, indicando que una configuración normal de estas macromoléculas es requerida para una correcta colonización. En plántulas tratadas se observó buena colonización (T lps). Este último resultado permite suponer que la nueva conformación de los LPS resultaría en un fenotipo favorable para la colonización de maíz en condiciones de estrés salino.



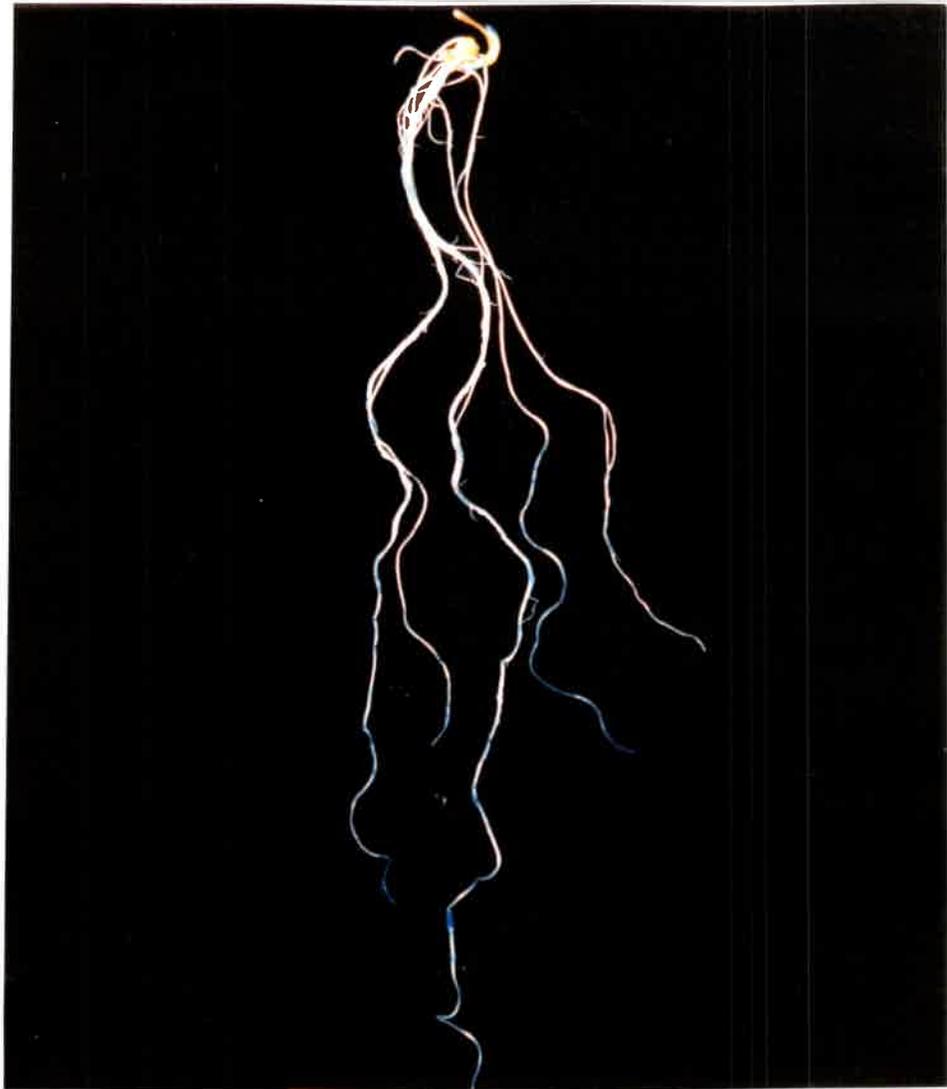
**NI**  
**(ver leyenda Fig. N° 14, pág. 102)**



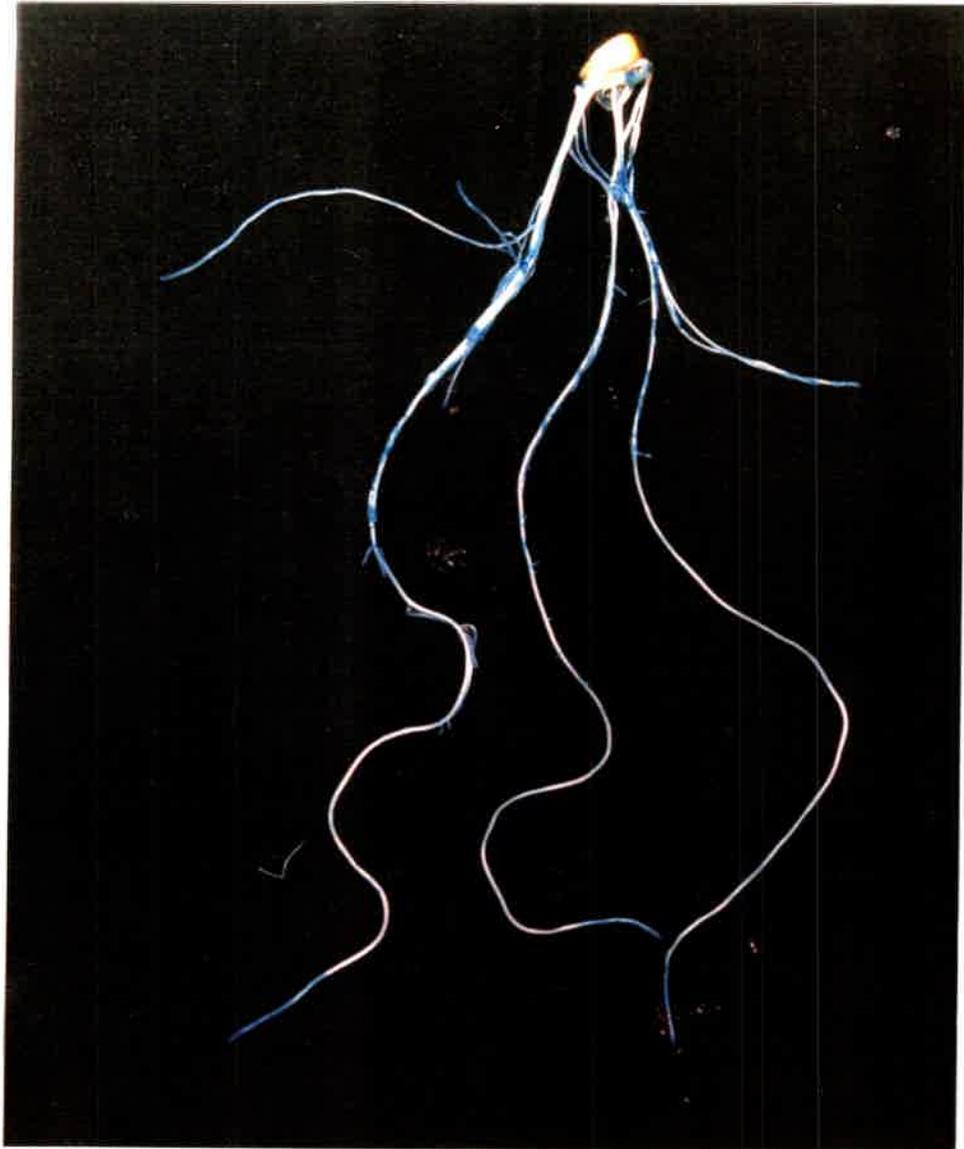
C wt



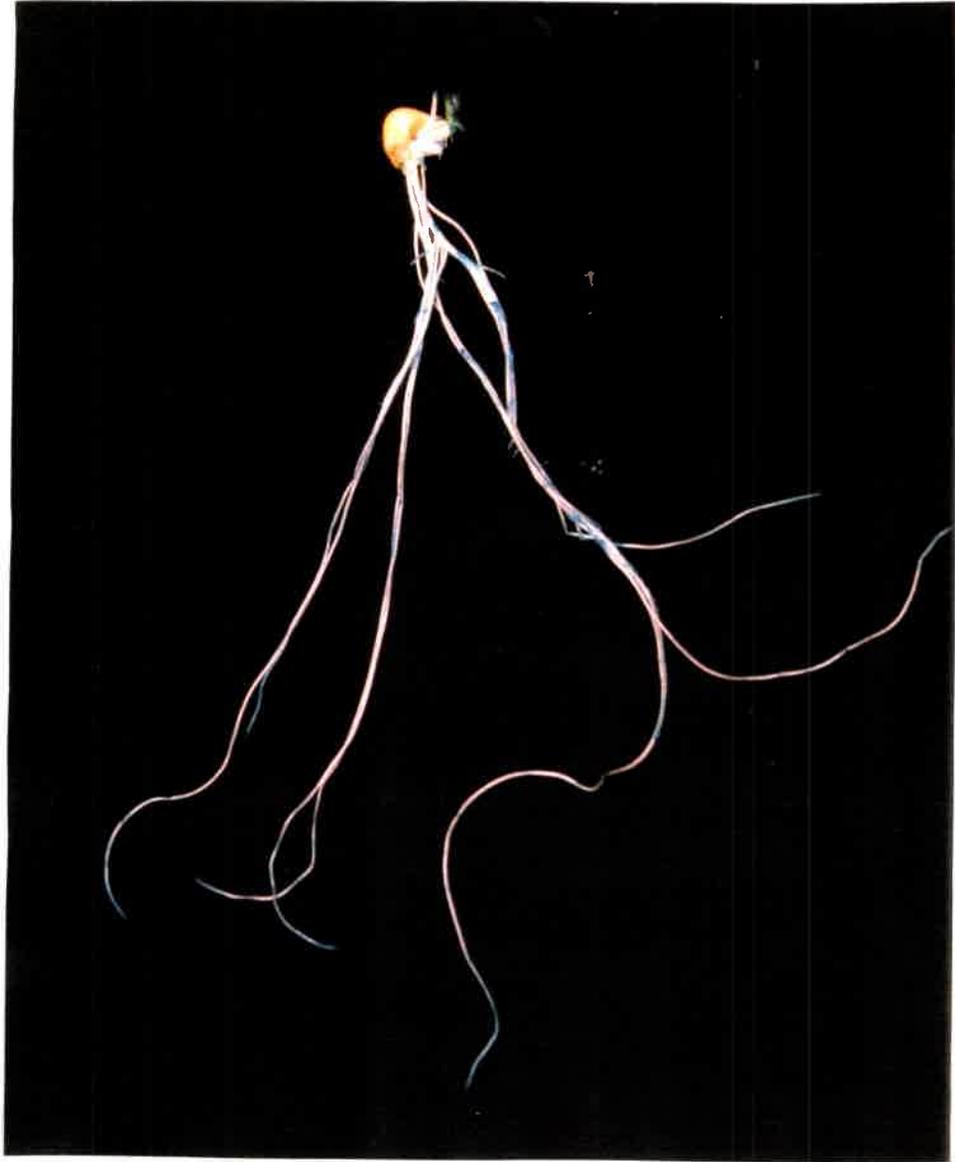
C pg



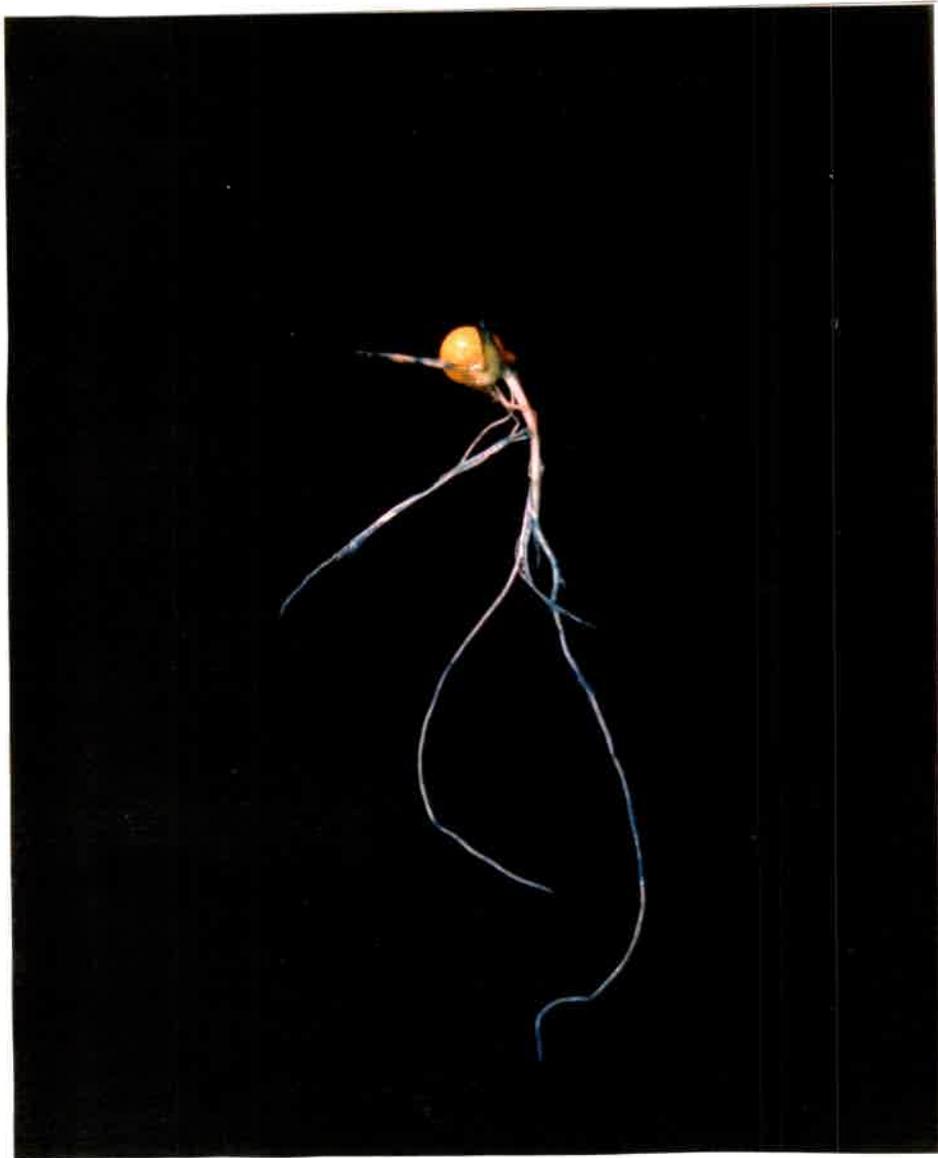
**C Ips**



T wt



T pg



T Ips

Fig. N° 14. Patrón de colonización de raíces de plántulas de maíz crecidas en condiciones control y en estrés salino de *A. brasilense* Cd (wt), *A. brasilense* Cd Tn5-PG y *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>.

NI: Planta no inoculada; C wt: Planta control, inoculada con *A. brasilense* Cd; T wt: Planta estresada, inoculada con *A. brasilense* Cd; C pg: Planta control, inoculada con *A. brasilense* Cd Tn5-PG; T pg: Planta estresada, inoculada con *A. brasilense* Cd Tn5-PG; C Ips: Planta control, inoculada con *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>; T Ips: Planta estresada, inoculada con *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>.

#### IV.6.a.iii. Grado de colonización (endófitos):

Para confirmar los resultados obtenidos con respecto al patrón de colonización, se determinó el grado de colonización endófito. Para ello se utilizaron plántulas desarrolladas en las mismas condiciones descritas para el patrón de colonización. Cada planta fue inoculada con el mismo número de bacterias ( $2,3 \times 10^7$  UFC) y la colonización fue examinada a los 15 días después de la inoculación.

El grado de colonización (endófitos) se determinó mediante recuento en placa, como se describe en III.10.i de Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en la tabla N° 14. Puede observarse que no hay diferencias significativas en cuanto al número de bacterias mutante y wt que colonizan el interior de las raíces de maíz de plántulas crecidas en condiciones normales. Sin embargo los resultados obtenidos con las plántulas crecidas en estrés salino concuerdan con el patrón de colonización, observando una ausencia de colonización por parte de la mutante Cd Tn5-PG, en un grado tal que no pudo ser detectada mediante este método. La colonización de plántulas estresadas por la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> resultó ser superior que la de su cepa parental.

Tabla N° 14. Colonización (endófitos) de raíces de plántulas de maíz por *A. brasilense* Cd Tn5-PG y *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>.

	Plántulas creciendo en	Plántulas creciendo en
	medio MPCL	medio MPCL + 200 mM NaCl
	UFC/mg prot.	
<i>A. brasilense</i> Cd	$3,45 \times 10^4 \pm 1,35^a$	$0,61 \times 10^4 \pm 0,23^b$
<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-PG	$4,86 \times 10^4 \pm 2,86^a$	ND ( $< 10^3$ )
<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-LPS <sup>a</sup>	$2,72 \times 10^4 \pm 1,64^a$	$4,30 \times 10^4 \pm 0,18^{ac}$

ND: no detectado.

Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de cuatro determinaciones (n=4). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

## **IV.7. CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE LAS MUTANTES DE *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> y Cd Tn5-PG.**

En vista de las características fenotípicas observadas en las mutantes obtenidas y con el propósito de obtener información sobre la región interrumpida por el transposón Tn5, responsable de los cambios observados, se inició la caracterización genética de las mutantes.

### **IV.7.a. Clonado de los fragmentos conteniendo las inserciones Tn5:**

Una mezcla de digestión *EcoRI* del ADN total de ambas mutantes (Cd Tn5-PG y Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>) fue ligada (independientemente) en pSUP102 digerido con *EcoRI*. La mezcla de ligación fue utilizada para transformar células electrocompetentes de *E. coli* S17-1. Los clones transformantes fueron seleccionados en placas de LB conteniendo Km (25µg/ml), propia del Tn5 y Tc (5µg/ml), propia del vector.

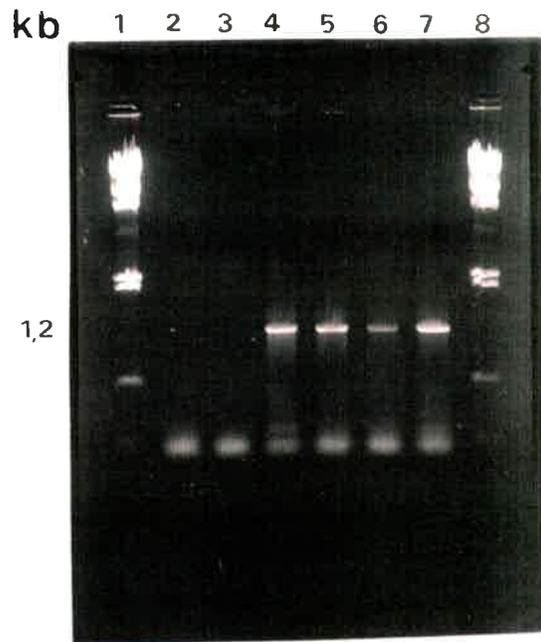
#### **IV.7.a.i. Amplificación mediante PCR de clones transformantes:**

Para corroborar la presencia de secuencias de inserción propias del transposón Tn5 en los clones transformantes se realizó PCR utilizando primers específicos que conducen a la amplificación de las secuencias de inserción del Tn5, generando un producto de 1,2 kb. Se observó que los clones obtenidos a partir de ambas mutantes, denominados *E. coli* S17-1 (pEJpg1) y *E. coli* S17-1 (pEJlps1), resultan en productos de amplificación del tamaño arriba indicado (Fig. N° 15 y 16).

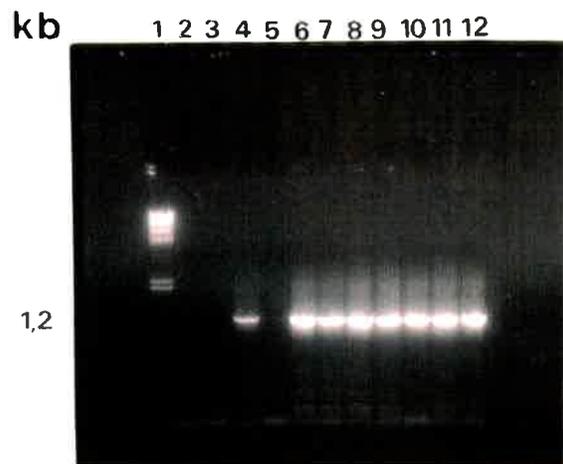
#### **IV.7.a.ii. Análisis de Restricción:**

De los clones positivos se realizaron extracciones de plásmidos según indica en la sección III.11.b de Materiales y Métodos. Los plásmidos obtenidos fueron digeridos con *EcoRI* y analizados por electroforesis en geles de agarosa 0,8%.

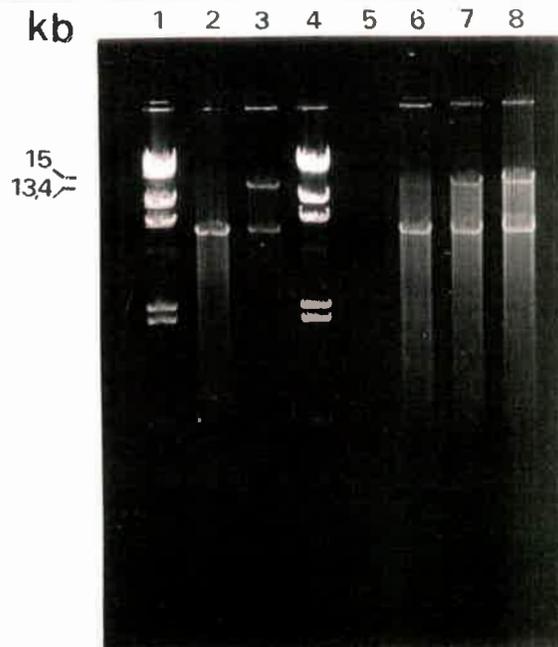
Los fragmentos *EcoRI* clonados en pSUP102 resultan de aproximadamente 15 kb y 13,4 kb para las mutantes Cd Tn5-PG y Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>, respectivamente (Fig. N° 17).



**Fig. N° 15. Amplificación de secuencias de inserción usando primers IS50.**  
**Calles: 1 y 8 marcador de peso molecular (ADN *NHindIII*); 2, agua; 3, control negativo *A. brasilense* wt; 4, vector pGS9 (Tn5); 5, *A. brasilense* Tn5-LPS<sup>a</sup>; 6 y 7 clones transformantes *E. coli* S17-1 (pEJlps1).**



**Fig. N° 16. Amplificación de secuencias de inserción usando primers IS50.**  
**Calles: 1 marcador de peso molecular (ADN *NHindIII*); 2, agua; 3, control negativo *A. brasilense* wt; 4, vector pGS9 (Tn5); 5, *A. brasilense* Cd Tn5-PG; 6 a 12 clones transformantes *E. coli* S17-1(pEJpg1).**



**Fig. N° 17. Análisis de los productos de digestión *EcoRI*.**  
**Calles 1 y 4: marcador de peso molecular (ADN  $\lambda$ HindIII);**  
**2 y 6: pSUP102; 3: pEJlps1; 7 y 8: pEJpg1.**

#### IV.7.a.iii. Mutagénesis reversa:

Para corroborar que el fenotipo observado en las mutantes obtenidas es producido por la inserción del Tn5 en los fragmentos *EcoRI* clonados, los plásmidos pEJpg1 y pEJlps1; fueron movilizados por conjugación a *A. brasilense* Cd wt. Los exoconjugantes obtenidos Km<sup>r</sup> fueron chequeados para la pérdida de resistencia a tetraciclina (propia del vector), seleccionando de esta forma clones en los cuales han ocurrido eventos de doble recombinación, intercambiándose el fragmento wt por el mutado (mutagénesis reversa). Dichos clones fueron denominados *A. brasilense* Cd PG-1 y *A. brasilense* Cd LPS<sup>a</sup>-1 según hayan sido generadas por homogenización del plásmido pEJpg1 ó del plásmido pEJlps1, respectivamente.

En los clones obtenidos se examinó el fenotipo para la producción de EPS en el caso de la mutante Cd PG-1 y movilidad del LPS en el sistema de buffer SDS-Tricina, para la mutante Cd LPS<sup>a</sup>-1. Los resultados (Tabla N° 15 y Fig. N° 18) indican que los

fragmentos clonados conteniendo las inserciones Tn5 fueron responsables de los fenotipos observados en las mutantes Cd Tn5-PG y Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>.

Tabla N° 15. Contenido de EPS de *A. brasilense* Cd, *A. brasilense* Cd Tn5-PG y *A. brasilense* Cd PG-1, producidos en medio MML.

$\mu\text{g EPS/mg proteínas}$		
<i>A. brasilense</i> Cd (wt)	<i>A. brasilense</i> Cd Tn5-PG	<i>A. brasilense</i> Cd PG-1
$12,79 \pm 0,33^a$	$36,85 \pm 2,45^b$	$31,16 \pm 4,46^b$

Los datos representan la media  $\pm$  el error estándar de cuatro determinaciones (n=4).

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre las muestras analizadas (ANOVA, test LSD,  $p < 0.05$ ).

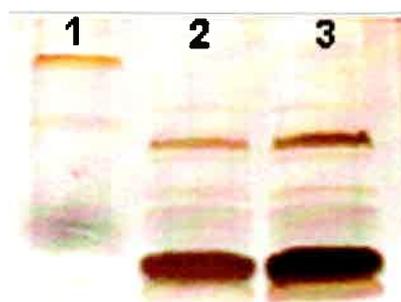


Fig. N° 18. Perfil electroforético de los LPS de *A. brasilense* wt (calle 1), *A. brasilense* Tn5-LPS<sup>a</sup> (calle 2) y *A. brasilense* Cd LPS<sup>a</sup>-1 (calle 3).

#### IV.7.a.iv. Hibridización:

Los fragmentos *EcoRI* conteniendo las inserciones Tn5 clonados en pSUP102 de ambas mutantes fueron escindidos a partir de geles de agarosa 0,8 % y posteriormente purificados según se detalla en la sección III.11.k. de Materiales y Métodos estos fragmentos fueron marcados con 14-dCTP-biotina y utilizados como sondas para la hibridización del ADN digerido con *EcoRI* de ambas mutantes y de la cepa wt.

Para el caso de la mutante Cd Tn5-PG se comprobó hibridización con una banda de aproximadamente 15 kb, concordando con el tamaño del fragmento clonado en el plásmido pEJpg1. La secuencia homóloga fue encontrada en la cepa wt con un tamaño aproximado de 8,4 kb (Fig. N° 19). En la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>, una banda de 13,4 kb mostró hibridización positiva, mientras que la secuencia homóloga en la cepa wt correspondió a una banda de 7,6 kb (Fig. N° 20).



**Fig. N° 19. Hibridización con sonda Tn5-PG**  
**Calle 1: *A. brasilense* wt; 2: *A. brasilense* Cd Tn5-PG**

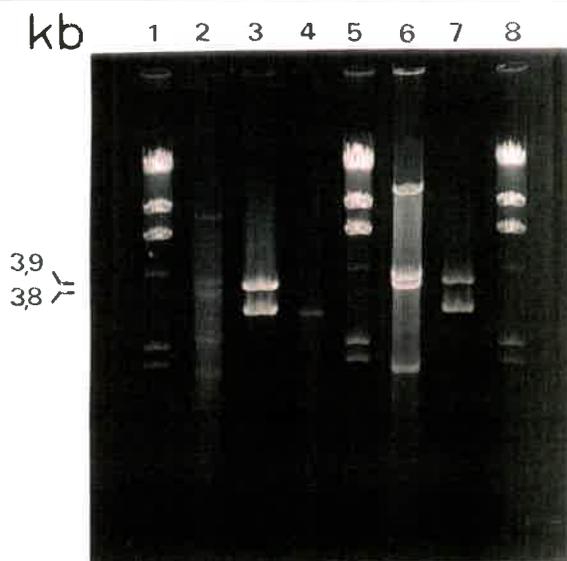


**Fig. N° 20. Hibridización con la sonda Tn5-LPS**  
**Calle 1: *A. brasilense* wt; 2: *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>**

#### **IV.7.b. Subclonado y secuenciamiento:**

Dado que el transposón Tn5 contiene un sitio *Bam*HI que no interrumpe el gen de resistencia a kanamicina (*nptII*), se intentó clonar el fragmento que contiene el gen *nptII*, una de las secuencias de inserción, y parte del ADN de *Azospirillum* que linda con la misma. Para ello, los plásmidos pEJlps1 y pEJpg1 fueron digeridos con *Eco*RI/*Bam*HI y

subclonados en pBluescript SK (pBSK). Los plásmidos recombinantes resultantes, se utilizaron para transformar células electrocompetentes de *E. coli* JM109 como se detalla en el punto III.11.n. de Materiales y Métodos. El análisis de restricción *EcoRI/Bam*HI de los plásmidos contenidos en los clones transformantes, denominados pEJlps2 y pEJpg2 (según hayan sido obtenidos a partir de pEJlps1 y pEJpg1 respectivamente), reveló la presencia de un fragmento de aproximadamente 3,8 kb para la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> y de 3.9 kb en el caso de la mutante Cd Tn5-PG (Fig. N° 21).



**Fig. N° 21. Análisis de los productos de digestión *EcoRI/Bam*HI de los plásmidos aislados de los clones transformantes *E. coli* JM109 (pEJlps2) y *E. coli* JM109 (pEJpg2).**

**Calles: 1, 5 y 8: marcador de peso molecular (ADN  $\lambda$ HindIII); 2: pEJlps1; 3: clon transformante *E. coli* JM109 (pEJlps2); 4: pBSK; 6: pEJpg1; 7: clon transformante *E. coli* JM109 (pEJpg2).**

Los fragmentos subclonados en pBSK de ambas mutantes fueron secuenciados desde el Tn5 hacia el ADN genómico empleando el primer ISs según se indica en la sección III.11.o de Materiales y Métodos. La estrategia de secuenciamiento se realizó con

el propósito de obtener información sobre la región interrumpida por el Tn5 y responsable de los cambios en EPS y LPS.

Las secuencias obtenidas, correspondientes a la primera lectura desde el Tn5, para cada una de las mutantes se presentan en las Fig. N° 22 y 23.

La búsqueda de homología se realizó en la base de datos de GenBank, usando el programa BLASTX 2.0.10. Ambas secuencias de nucleótidos fueron traducidas y la secuencia de proteínas deducida fue comparada con las existentes en la base de datos. Las secuencias de las proteínas deducidas fueron alineadas con las secuencias de proteínas que presentaron mayor homología (Fig. N° 24 y 25).

Los resultados obtenidos indican que el fragmento secuenciado, correspondiente a la mutante Cd Tn5-PG, muestra una identidad, a nivel de proteína, de 54 % y similitud de 67 % a D-alanina-D-alanina ligasa de *Zymomonas mobilis* (ver Fig. N° 24); 43% de identidad y 65% de similitud a D-alanina-D-alanina ligasa de *Bartonella bacilliformis*, y porcentajes menores de identidad y similitud a D-alanina-D-alanina ligasa de *Rickettsia prowazekii*, *Mycobacterium smegmatis*, *M. Tuberculosis*, *Aquifex aeolicus*, *Enterococcus hirae*, *Haemophilus influenzae*, *E. coli*, *Rhizobium* sp. NGR234.

Estudios sobre la caracterización bioquímica y genética en *E. coli* (al-Bar *et al.*, 1992) mostraron que esta enzima es un monómero con una localización citoplasmática y que participa en la biosíntesis del péptidoglucano catalizando la siguiente reacción:



Los resultados de la secuencia parcial de la mutante Cd Tn5-PG sugieren que este gen además de estar involucrado en la biosíntesis del péptidoglucano, también está relacionado a la regulación de la síntesis de EPS y a la tolerancia a salinidad en *A. brasilense*.

El fragmento secuenciado correspondiente a la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> reveló una identidad, a nivel de proteína, de 79 % y similitud de 90% a glucosa-1-fosfato timidil transferasa de *Salmonella enterica* (ver Fig. N° 25), *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*; 76% de identidad y 89 % de similitud a glucosa-1-fosfato timidil transferasa de *Streptococcus pneumoniae*, 76% de identidad y 89 % de similitud a glucosa-1-fosfato timidil transferasa de *Neisseria meningitidis* y *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 76 % de identidad y 88% de similitud a la de *Xanthomonas campestris*, 76 % de identidad y 86% de similitud a la de *Rhizobium* sp. NGR234; 75% de

identidad y 88% de similitud a la de *Azorhizobium caulinodans*; 75% de identidad y 88% de similitud a la de *Leptospira interrogans*; 74 % de identidad y 88% de similitud a la de *Burkholderia pseudomallei*, y *Klebsiella pneumoniae*; 73% de identidad y 90% de similitud a la de *Yersinia enterocolitica*; 72% de identidad y 85% de similitud a la de *Sinorhizobium meliloti*, y 71% de identidad y 84% de similitud a la de *Enterococcus faecalis*. En varias de estas bacterias, la glucosa-1-fosfato timidil transferasa es una enzima que participa en la biosíntesis del LPS. Por ejemplo, en *E. coli* VW187, glucosa-1-fosfato timidil transferasa participa en la biosíntesis de las unidades repetitivas-O del LPS. Esta enzima es codificada por el gen *rfbA*, el cual se encuentra en el cluster de genes *rfb*, y participa específicamente en la biosíntesis del precursor dTDP-ramnosa (Marolda y Valvano, 1995). Además, dicha enzima participa en la biosíntesis del galactoglucano (EPSII) de *Sinorhizobium meliloti*.

En *Sinorhizobium meliloti* Rm2011 la biosíntesis del galactoglucano (EPSII) es dirigida por los genes *exp*. El análisis de la secuencia de un fragmento de 32 kb del megaplásmido 2, el cual contiene los genes *exp*, reveló la presencia de 25 marcos de lectura abierto. La homología de los productos deducidos de los genes *exp*, sugieren que éstos codifican para 4 proteínas involucradas en la biosíntesis de dTDP-glucosa y dTDP-ramnosa, 6 glicosiltransferasas, un complejo de transportadores ABC y una proteína homóloga a las proteínas NodO de *Rhizobium*. Dentro de las glicosiltransferasas se encontró un alto grado de homología a RfbA (*rfbA*) de *S. typhimurium* (Becker *et al.*, 1997).

En *Salmonella enterica*, glucosa-1-fosfato timidil transferasa participa en la biosíntesis de dTDP-L-ramnosa entre el antígeno O (biosíntesis del LPS) (Liu *et al.*, 1993), catalizando la siguiente reacción:



Los resultados de la secuencia parcial de la mutante Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> sugieren que este gen estaría también involucrado en la biosíntesis de LPS en *A. brasilense*.

				G	TTCTCCACCA
TCCAAGCGAC	GAGAGCCCCG	TAGGTGAGCC	CCACGGATGC	GGCCTGTTCG	
GGAACCAGCG	ACAGCGGCGT	CATGCCC GCC	TGGTTGTTGA	TTCCAGGAA	
AAAGAGTCCG	TCGGTCCCAC	TTTTACGATC	ATCCCAGCGG	AAGTCGCTGC	
GCGAAACGCC	GCGGCACCCC	AGGGTCCGAT	GGGCCAGGAC	CGCCAACCTC	
TTGGCTTCTT	CCGCGACATG	CTCGGGAATC	TGCGCGGGCA	CAGTATGAAC	
GGCATGACCG	GCGCTGTATT	TAGCCGTGTA	GTCATACACC	TGTGCTTCAA	
AGCGGATCTC	CGTCACGGTC	AGGGGGCGGC	ATTCGCCGTC	CAGCCCGCCC	
ATGACGCCCA	CGGTCAGCTC	GCGGCCCGGG	ATGAACTCCT	CGACCAGGGC	
GCGCTCGCCG	AAGGTCCAGG	CGTCGCCGAC	CGGGCTGTTC	TGCCCCTCGC	
GCACCAGCGT	GACCCCGACG	GTCGAGCCTT	CGTCCACCGG	CTTGACGATG	
TAGGGGGCGG	GCATCGGGT				

**Fig. N° 22. Secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento secuenciado de la mutante de *A. brasilense* Cd Tn5-PG.**

				GCACAGG
CCCGGCTGAC	CGGCGAGGGC	TGGACTCCCG	GCACCTTCCA	CTATGGCGGG
GCGCCGGCCA	CCACTTGGCA	CGGCTTCGCC	GAGCGGATCG	TCGATCGCGC
CGCCGCCCCG	ATCGGCCGCC	GTCCGGCCGT	GACCGCCATC	ACCACCGCCG
ACTTTCCGAC	ACCGGCCCGA	CGGCCCGCCA	ATTCCGTCCT	CGACACCGCA
CGCCTCGGCC	AGGCTACGG	CATCCCGCCG	GCGGATTGGA	TGGCTGGACT
CGACCGCGTG	CTTGACGACA	TCCTCGACGA	AACCCAGGGC	GTGGGAGCGA
AGGCATGAAG	GGCATCATTC	TGGCCGGCGG	GTCCGGCACC	CGGCTCTACC
CGCTGACGCA	GGTGACCAGC	AAGCAGCTCC	TGCCGGTGTT	CGACAAGCCG
ATGATCTATT	ATCCGCTGTC	GACGCTGATG	CTGGCCGGCA	TCCGCGACAT
CCTGATCATC	ACCACACCGC	AGGACCAGTC	GCAGTTCCAG	CGCCTTCTGG
GCGACGGCAG	CCAGTGGGGC	ATATCGCTTA	CCTACGCCGA	GCAGCCGAAT

**Fig. N° 23. Secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento secuenciado de la mutante de *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>.**

```

Abr      175  PMPAPYIVKPVDEGSTVGVTLVREGQNS-----PVGDAWTFGERALVEEFIPGRELTVG
Zmo      129  PLRPYVVKPVNEGSSVGVAIIDESFNDGQPIRKDQIDPWKNFKTLLEEFIKGRELTVG
Consenso  * . * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Abr      121  VMGGLDGECRPLTVTEIRFEAQVYDYTAKYSAGHAVHTVPAQIPEHVAEEAKRLAVLAHR
Zmo      189  VMG-----DKALAVTELCPNNGFYDYKAKYTDGMTTHICPAKIPAEIAEKAMALSLKAHQ
Consenso  *** . * * * * . * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Abr      61  TLGCRGVSRSDFRWDDRKS GTDGLFFLEINNQPGMTPLSLVPEQAASVGLTYGALVAVMW
Zmo      244  LLGCRGPSRSDFRWDD-EAGLDGLELLEVNTOPGMTPLSLVPEQAKQLGIDYVALCRMIV
Consenso  ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Abr      1  E
Zmo      303 E
Consenso  *

```

Fig. N° 24. Alineamiento de secuencias de la proteína deducida de *A. brasilense* Cd Tn5-PG (Abr) y D-alanina-D-alanina ligasa de *Zymomonas mobilis* (Zmo). Las áreas sombreadas en negro indican aminoácidos idénticos y las sombreadas en gris aminoácidos con propiedades químicas similares.

```

Abr      1  KGIILAGGSGTRLYPLTQVT SKQLLPVFDKPMIYYPLSTLMLAGIRDILIIITPQDQSQF
Sen      5  KGIILAGGSGTRLYPVTMAVSKQLLPVIYDKPMIYYPLSTLMLAGIRDILIIISTPQDTPRF
Consenso  ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

```

```

Abr      61  QRLLDGGSQWGISLTYAEQPN
Sen      65  QQLLDGGSQWGLNLQYKVQPS
Consenso  * * * * * * * * * * * * * *

```

Fig. N° 25. Alineamiento de secuencias de la proteína deducida de *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> (Abr) y glucosa-1-fosfato timidil transferasa de *Salmonella enterica* (Sen). Las áreas sombreadas en negro indican aminoácidos idénticos y las sombreadas en gris aminoácidos con propiedades químicas similares.

## **IV.8. SELECCIÓN DE MUTANTES DE *A. brasilense* Cd RESISTENTES O SENSIBLES A ESTRÉS SALINO.**

En vista de los resultados obtenidos precedentemente y con el objeto de investigar determinantes genéticos de *A. brasilense* asociados a la tolerancia a salinidad, se intentó obtener mutantes de *A. brasilense* resistentes o sensibles a salinidad, para lo cual se emplearon diferentes metodologías.

### **IV.8.a. Selección de mutantes resistentes a la salinidad:**

La determinación de la concentración inhibitoria mínima demostró que 400 mM de NaCl es la mínima concentración que produce inhibición total del crecimiento en *Azospirillum brasilense* Cd, corroborando datos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio (Rivarola *et al.*, 1998). Esta concentración junto con 500 mM de NaCl se utilizaron para seleccionar clones resistentes al estrés salino.

#### **IV.8.a.i. Mutante inducida por luz UV:**

Empleando esta metodología no se obtuvieron clones de *A. brasilense* resistentes a 400 o 500 mM de NaCl.

#### **IV.8.a.ii. Mutante espontánea:**

No se pudieron seleccionar clones resistentes a 400 o 500 mM de NaCl utilizando esta metodología.

#### **IV.8.a.iii. Obtención de mutantes por transposición de *Azospirillum brasilense*:**

Se realizaron tres conjugaciones, de las cuales se obtuvieron 2864 transconjugantes. Todos ellos fueron analizados para la resistencia o sensibilidad a estrés salino.

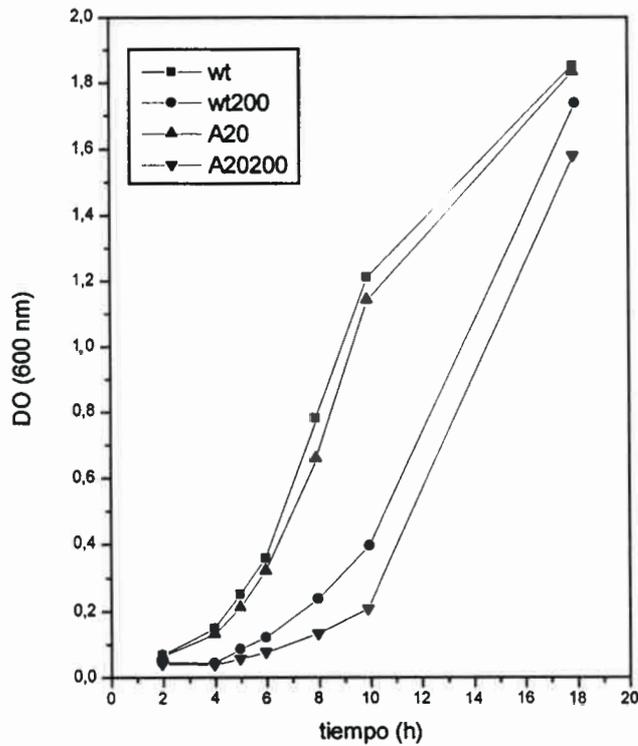
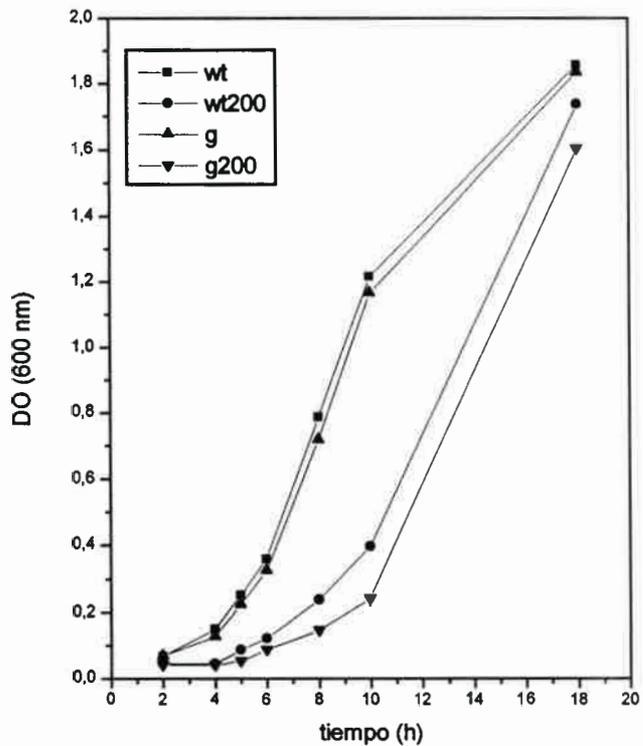
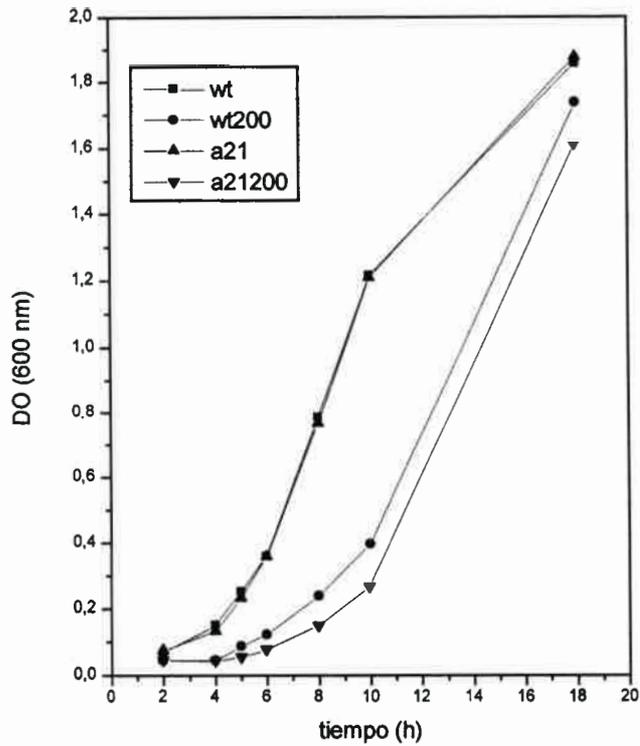
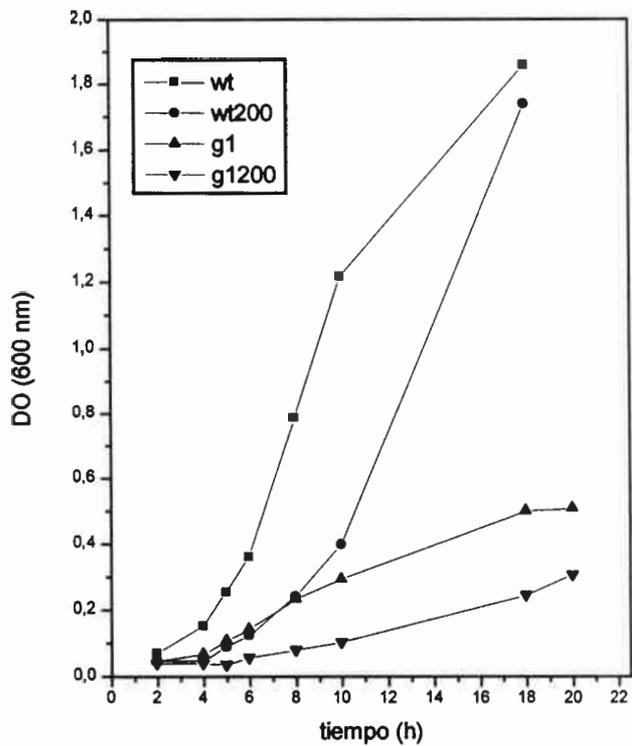
#### **IV.8.a.iii.1. Selección de mutantes resistentes a la salinidad:**

No se obtuvieron clones resistentes al estrés salino (tanto a 500 como a 400 mM de NaCl).

#### **IV.8.a.iii.2. Selección de mutantes sensibles a la salinidad:**

La concentración usada para seleccionar clones sensibles a estrés salino fue 200 mM de NaCl.

De los transconjugantes obtenidos se encontraron 13 clones con menor crecimiento, respecto a la cepa salvaje, en medio MML sólido con 200 mM de NaCl. Sin embargo, algunos de estos clones también estaban alterados en su capacidad de crecer en el medio control. En la Fig. N° 26 se muestran las curvas de crecimiento para siete de dichos mutantes. Aquellos en los cuales el crecimiento está afectado en condiciones normales no resultan de interés en esta instancia dado que posiblemente están alterados en forma pleiotrópica, y no en mecanismos asociados más específicamente a la tolerancia a salinidad. Sin embargo el mutante a21 mostró diferencias con el crecimiento de la cepa salvaje sólo en concentraciones de sal elevadas (Fig. N° 26). En la Fig. N° 27 se muestra el comportamiento del mismo comparado con la cepa salvaje durante 40 h luego de la inoculación en un medio con 300 mM de NaCl.



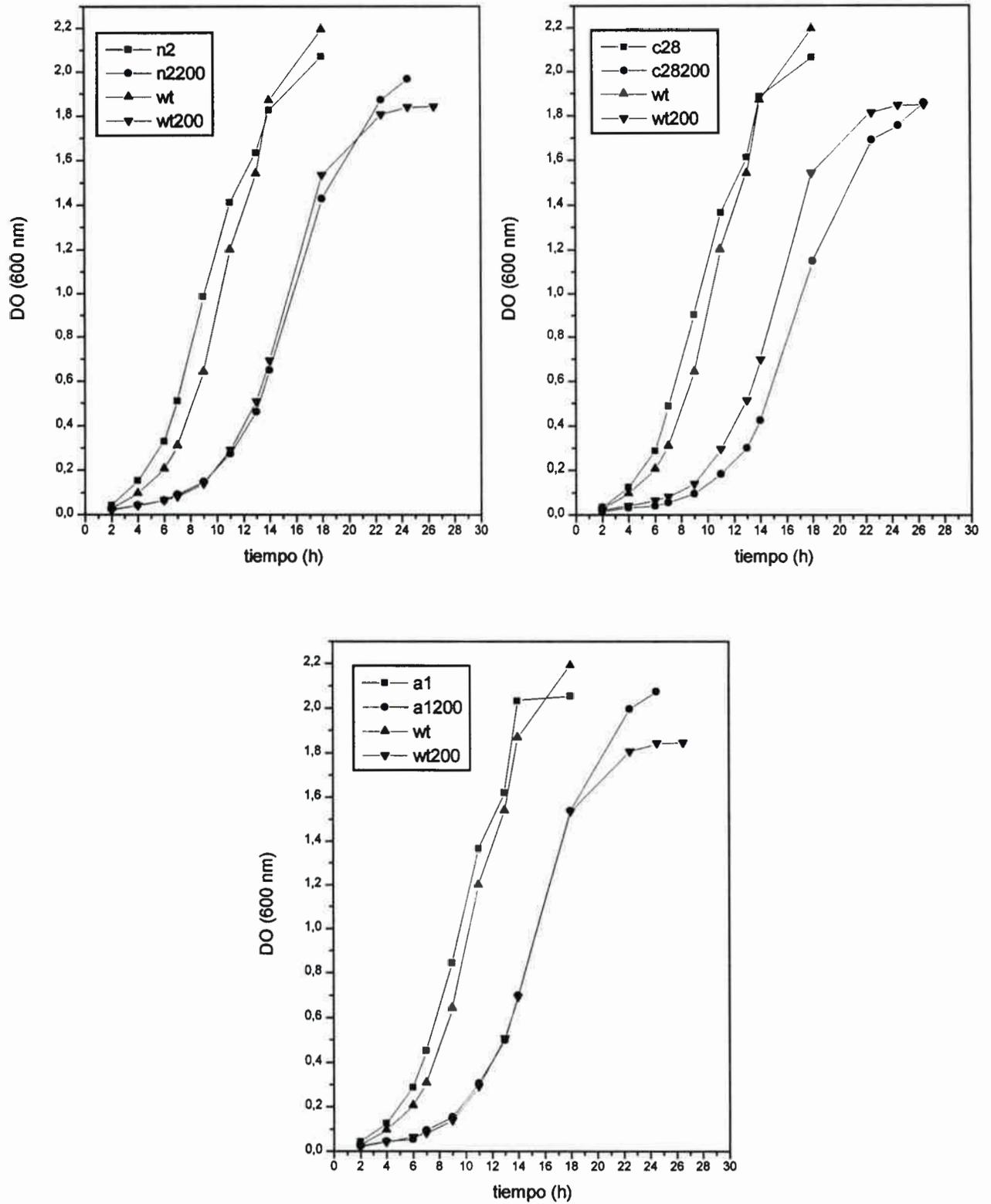
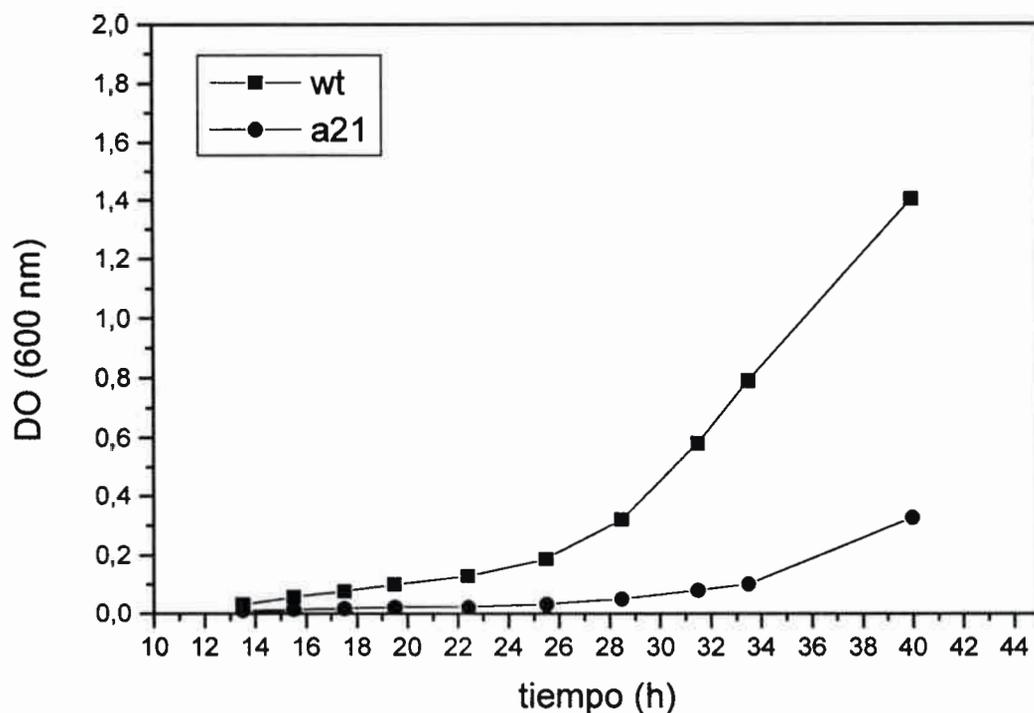


Fig. N° 26. Curvas de crecimiento de mutantes Tn5 de *A. brasilense* en condiciones de estrés salino. wt: *A. brasilense* Cd medio control; 200: medio suplementado con 200 mM de NaCl; g1, a21, g, A20, n2, a1 y c28: mutantes Tn5-*lacZ* de *A. brasilense*.



**Fig. N° 27. Curva de crecimiento de *Azospirillum brasilense* Cd wt y mutante a21 en condiciones de estrés salino (300 mM NaCl).**

**Wt:** *A. brasilense* wt; **a21:** mutante Tn5-*lacZ* sensible a salinidad.

El retardo en el crecimiento en medio salino de la mutante a21 estaría indicando que el gen interrumpido estaría asociado con la tolerancia a la salinidad. La selección y caracterización de mutantes sensibles a salinidad, como el clon a21, se espera permita avanzar en el estudio de los mecanismos involucrados en una respuesta tan compleja como la del estrés salino.

**V. CONCLUSIONES:**

1- La adherencia a las raíces de maíz de *Azospirillum brasilense* Cd sometido a estrés salino se encuentra alterada tanto en la fase de adsorción como en la de anclaje.

a.- Con respecto a la primera, la alteración podría ser causada por modificaciones en la fuerza iónica del medio de adsorción, y/o modificaciones en las moléculas de la superficie bacteriana, inducidas por el estrés salino. Sin embargo, las bacterias estresadas pueden adsorberse de forma normal en medio salino (grupo Tt), lo cual refleja una capacidad de adaptación de este microorganismo a las condiciones de salinidad.

b.- La segunda fase (anclaje), ha resultado la más afectada por la salinidad. Todos los grupos estudiados muestran una disminución en el número de bacterias ancladas a raíces de maíz.

2- El crecimiento de plántulas de maíz en condiciones de salinidad (NaCl 200mM) se ve afectado, encontrándose comprometida fundamentalmente la expansión radical.

- La adsorción y anclaje de *Azospirillum brasilense* a raíces de plántulas estresadas se encuentra disminuida. Este resultado demuestra que ambos componentes, planta y bacteria, están alterados por la salinidad.

Las evidencias precedentes en su conjunto sugieren que el efecto benéfico que otorga esta bacteria a los cultivos (fijación de nitrógeno, producción de fitohormonas) con el consecuente aumento en el rendimiento de las cosechas, podría estar comprometido en suelos salinos.

3- La membrana externa de *Azospirillum brasilense* Cd sometido a estrés salino presenta modificaciones en el patrón de proteínas y de LPS y en la composición cuantitativa de EPS.

4- El periplasma de las bacterias también presenta importantes cambios en los patrones de proteínas y de glucanos.

Es posible así que la menor adherencia de estas bacterias a las raíces de maíz estén asociadas con los cambios moleculares de la superficie celular. En este sentido, Croes *et al.* (1993) sugiere al flagelo polar de *Azospirillum brasilense* como el responsable de la adsorción. Concordantemente la proteína del flagelo polar tiene el mismo peso molecular y localización que una proteína ausente en la membrana externa de bacterias

estresadas. Del mismo modo, la disminución en el contenido de exopolisacáridos (EPS), y los cambios cualitativos tanto de EPS como de LPS deben ser considerados en relación al menor anclaje de *Azospirillum brasilense*.

5- El estrés salino aumenta la expresión de *nifA* en *Azospirillum brasilense* Cd, pero los resultados sugieren que el producto de *nifA* se encuentra en una forma inactiva.

6- La transcripción de *nifH* en *A. brasilense* Cd está disminuida en bacterias sometidas a estrés salino, lo que afecta en forma negativa la capacidad de fijar nitrógeno.

7- Los exudados radicales de plántulas de maíz tanto controles como estresadas inducen la transcripción de *nifA* en *A. brasilense* Cd; sin embargo no se observó inducción cuando la bacteria creció en presencia de estrés salino.

8- No se observó un aumento significativo en la expresión de *nifH* cuando la bacteria fue incubada en presencia de exudados radicales.

Es posible que la falta de respuesta de la bacteria estresada a los exudados radicales pueda ser debida a las modificaciones en los componentes de superficie de *A. brasilense* provocadas por el estrés salino.

9- Con el propósito de caracterizar los determinantes genéticos de la bacteria asociados al estrés salino, se analizó el comportamiento en medios con elevadas concentraciones de sal de mutantes generadas por transposición Tn5. Con dicha estrategia no se obtuvieron mutantes de *Azospirillum brasilense* capaces de crecer en altas concentraciones de sal (NaCl 500mM). Sin embargo, se obtuvo una mutante hiperproductora de EPS (*A. brasilense* Cd Tn5-PG), la cual tiene incrementada la producción de dichas macromoléculas en un 100 % y muestra un retardo en el crecimiento en medio salino, comparada a su cepa parental. Es posible que la producción aumentada de EPS modifique la adaptación de la cepa mutante al estrés salino teniendo en cuenta que la cepa salvaje en condiciones de salinidad disminuye la producción de este polisacárido.

- No se observaron diferencias en el perfil electroforético de los LPS de la mutante Cd Tn5-PG con respecto a la cepa salvaje, indicando que la mutación no afecta a los LPS.

- Mientras que el número de bacterias ancladas a raíces de plántulas de maíz de *A. brasilense* Cd Tn5-PG fue similar al de la cepa salvaje, la colonización de las raíces controles y estresadas, fue muy inferior a la de su cepa parental. Este resultado estaría reflejando una incapacidad de la mutante para colonizar el interior de las raíces. Este comportamiento podría derivar de un anclaje demasiado firme (por su alta producción de EPS) que imposibilitaría la invasión al interior.

- El fragmento *EcoRI* conteniendo el Tn5 en el ADN de la mutante de *A. brasilense* Cd Tn5-PG fue clonado dando lugar al plásmido pEJpg1. Mutagénesis reversa de la cepa salvaje empleando dicho plásmido reprodujo el fenotipo mutante. Posteriormente el fragmento interno *EcoRI/BamHI* fue subclonado y secuenciado. La secuencia parcial de la proteína deducida mostró homología con la D-alanina-D-alanina ligasa de *Zymomonas mobilis* (54% de identidad y 67% similitud) involucrada en la síntesis del péptidoglucano. Por tanto, es importante destacar la posible relación entre la integridad de la membrana externa de *Azospirillum brasilense*, la regulación de la síntesis de EPS, la tolerancia a salinidad, y la colonización de raíces de maíz.

10- Se obtuvo una mutante con alteraciones en el perfil electroforético de los LPS (*A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup>). La morfología de las colonias de esta mutante resultó ser diferente a las de la cepa salvaje, ya que mientras las colonias de esta última son grandes y de aspecto mucoso, las de la mutante son más pequeñas y de aspecto no mucoso.

- La producción de EPS por esta mutante no está afectada, como así tampoco el crecimiento en medios salinos en comparación con la cepa salvaje.

- El anclaje de esta mutante a las raíces de plántulas de maíz fue similar al de su cepa parental, indicando que la alteración en el LPS no afectaría esta fase de la adherencia.

- La colonización de raíces de plántulas de maíz controles de la mutante de *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> fue ligeramente inferior a la de la cepa salvaje; mientras que en condiciones salinas la colonización resultó ser superior a la de la cepa salvaje.

- El fragmento *EcoRI* conteniendo el Tn5 en el ADN de la mutante de *A. brasilense* Cd Tn5-LPS<sup>a</sup> fue clonado dando lugar al plásmido pEJlps1. Mutagénesis reversa de la cepa salvaje empleando dicho plásmido reprodujo el fenotipo mutante. Posteriormente el

fragmento interno *EcoRI/BamHI* fue subclonado y secuenciado. La secuencia parcial de la proteína deducida mostró homología, a nivel de proteína, a glucosa-1-fosfato timidil transferasa de *Salmonella enterica*, *E. coli*, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae* (79% de identidad y 90% de similitud); y porcentaje menores de homología a glucosa-1-fosfato timidil transferasa de *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Xanthomonas campestris*, *Rhizobium* sp. NGR234, *Azorhizobium caulinodans*, *Leptospira interrogans*, *Burkholderia pseudomallei*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica*, *Sinorhizobium meliloti*, y *Enterococcus faecalis*. En varias de estas bacterias esta enzima participa en la biosíntesis del LPS. Mientras que en *Sinorhizobium meliloti* está asociada a la síntesis del galactoglucano (EPSII).

11- Con respecto a la obtención de mutantes sensibles a estrés salino, se obtuvieron cuatro exoconjugantes que mostraron igual crecimiento en medio control y un leve retardo en el crecimiento en medio con 200 mM de NaCl, comparado a la cepa salvaje. Sin embargo en 300 mM de NaCl uno de los clones (denominado a21) presenta un marcado retardo en el crecimiento, indicando probablemente que el gen interrumpido participe en los mecanismos de osmotolerancia. Es importante destacar que la respuesta de *Azospirillum brasilense* frente al estrés salino seguramente involucra a más de un gen.

### **V.1. Conclusiones generales y perspectivas futuras:**

En la primera etapa de este trabajo se ha realizado una caracterización fenotípica detallada sobre el comportamiento de *A. brasilense* en altas concentraciones de sal, analizando las características y modificaciones de diversos componentes de la bacteria. Además en una segunda etapa, el estudio realizado ha permitido identificar genes específicos de la bacteria asociados a su tolerancia a salinidad y capacidad de asociación con la planta en condiciones de estrés salino. Una de esas mutantes con alteración en la síntesis de péptidoglucano e hiperproductora de EPS (Cd Tn5-PG) presenta modificaciones en la tolerancia a salinidad. De lo mencionado anteriormente se desprende la importancia de la integridad del péptidoglucano no sólo en la tolerancia a salinidad y producción de componentes superficiales como el EPS, sino también en la interacción planta-bacteria. Por otra parte, la obtención, caracterización fenotípica y genética de una mutante de *A. brasilense* con alteraciones en los LPS permitirá investigar en detalle si

existe participación de ese polisacárido en la interacción temprana *Azospirillum*-planta. Cabe destacar que no han sido reportados previamente mutantes de *A. brasilense* alterados en el LPS.

Finalmente la obtención de una mutante alterada específicamente en su tolerancia a estrés salino brinda una valiosa herramienta para darle continuidad a los estudios de este mecanismo tan complejo como es la tolerancia a estrés salino.

**VI. BIBLIOGRAFÍA:**

- al-Bar O.A., O'Connor C.D., Giles I.G. and Akhtar M. 1992. D-alanine: D-alanine ligase of *Escherichia coli*. Expression, purification and inhibitory studies on the cloned enzyme. *Biochem. J.* **282**: 747-752.
- Achtman M., Mercer A., Kusecek B., Pohl A., Heuzenroeder M., Aaronson W., Sutton A., and Silver R. 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* **39**: 315-335.
- Altabe S., Iñón de Iannino N., de Mendoza D., and Ugalde R. 1994. New osmoregulated  $\beta$  (1-3),  $\beta$  (1-6) glucosyltransferase (s) in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **176**: 4890-4898.
- Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
- App A., Watanabe I., Alexander M., Ventura W., Daez C., Santiago T., and De Datta S. 1980. Non-symbiotic nitrogen fixation associated with the rice plant in flooded soils. *Soil Sci.* **130**: 283-289.
- Arsène, F., Katupitiya, S., Kennedy, I., and Elmerich, C. 1994. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions.* **7**: 748-757.
- Arunakumari, A., Lamm, R., and Neyra-Estens, C. 1992. Changes in cell surface properties of azospirilla in relation to cell pleomorphism and aggregation. *Symbiosis.* **13**: 291-305.
- Assmus B., Hutzler P., Kirchhof G., Amann R., Lawrence J., and Hartmann A. 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1013-1019.

- Balandreau J. 1986. Ecological factors and adaptative processes in N<sub>2</sub>-fixing bacteria populations of the plant environment. *Plant and Soil*. **90**: 73-92.
  
- Baldani V., James E., Baldani J., and Döbereiner J. 1993. Colonization of rice by the nitrogen-fixing bacteria *Herbaspirillum* Spp. and *Azospirillum brasilense*. In: *New Horizons in Nitrogen Fixation*. p 705. Palacios R., Moor J., and Newton W., Eds., Kluwer Academic, Dordrecht.
  
- Baldani V., Baldani J., and Döbereiner J. 1983. Effects of *Azospirillum* inoculation on root infection and nitrogen incorporation in wheat. *Can. J. Microbiol.* **29**: 924-929.
  
- Baldani V., Alvarez M., Baldani J., and Döbereiner J. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* Spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. *Plant Soil*. **90**: 35-46.
  
- Baldani J., Caruso L., Baldani V., Goi S., and Döbereiner J. 1997. Recent advances in BNF with non-legume plants. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 911-922.
  
- Bashan, Y. 1986. Migration of the rhizosphere bacteria *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3407-3414.
  
- Bashan, Y., and Holguin, G. 1994. Root-to-root travel of the beneficial bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2120-2131.
  
- Bashan, Y., and Holguin, G. 1995. Inter-root movement of *Azospirillum brasilense* and subsequent root colonization of crop and wheat seedlings growing in soil. *Microb. Ecol.* **29**: 269-281.
  
- Bashan, Y., and Holguin, G. 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.*, **43**: 103-121.

- Bashan, Y., and Levanony, H. 1988. Active attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to quartz sand and to a light-textured soil by protein bridging. J. Gen. Microbiol. **134**: 2269-2279.
  
- Bashan, Y., and Levanony, H. 1989b. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hair as compared with root surface of wheat. Can. J. Microbiol. **35**: 936-944.
  
- Bashan, Y., and Levanony, H. 1990. Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. Can. J. Microbiol. **36**: 591-608.
  
- Bashan, Y., Levanony, H., and Whitmoyer R. 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. J. Gen. Microbiol. **137**: 187-196.
  
- Bashan Y., Puente M., Rodriguez-Mendoza M., Holguin G., Toledo G., Ferrera-Cerrato R., and Pedrin S. 1995a. Soil parameters which affect the survival of *Azospirillum brasilense*. NATO ASI Ser. Ser. G. **37**: 441-449.
  
- Bashan Y., Puente M., Rodriguez-Mendoza M., Toledo G., Holguin G., Ferrera-Cerrato R., and Pedrin S. 1995b. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1938-1945.
  
- Bashan Y., Singh M., and Levanony H. 1989a. Contribution of *Azospirillum brasilense* Cd to growth of tomato seedlings is not through nitrogen fixation. Can. J. Bot. **67**: 2429-2434.
  
- Becker A., Rüberg S., Küster H., Roxlau A., Keller M., Ivashina T., Cheng H., Walker G., and Pühler A. 1997. The 32-kilobase *exp* gene cluster of *Rhizobium meliloti* directing the biosynthesis of galactoglucan: Genetic organization and properties of the encoded gene products. J. Bacteriol. **179**: 1375-1384.
  
- Beijerinck M. 1925. Über ein *Spirillum* welches freien Stickstoff binden kann? Zentbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt.2, **63**: 353-359.

- Boddey R., Chalk P., Victoria R., Matsui E., and Döbereiner J. 1983. The use of the <sup>15</sup>N isotope dilution technique to estimate the contribution of associated biological nitrogen fixation to the nitrogen nutrition of *Paspalum notatum* cv batatis. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1036-1045.
  
- Bleakley B., Gaskins M., Hubbell D., and Zam S. 1988. Flocculation by *Azospirillum lipoferum* grown on poly-β-hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 2986-2995.
  
- Boddey R., Baldani V., Baldani J., and Döbereiner J. 1986. Effect of inoculation of *Azospirillum* on the nitrogen assimilation of field-grown wheat. *Plant and Soil.* **95**: 109-121.
  
- Boivin, C., Camut, S., Malpica, C., Truchet, G. and Rosenberg, C. 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell.* **2**: 1157-1170.
  
- Bolsa de Cereales, 1997. N° 3012.
  
- Boyer, H. and Roulland-Dussoix, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**: 459-465.
  
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
  
- Breedveld M., and Miller K. 1994. Cyclic β-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* **58**: 145-161.
  
- Breedveld M., Hadley J., and Miller K. 1995. A novel cyclic β-1,2-glucan mutant of *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **177**: 6346-6351.
  
- Bottini R., Fulchieri M., Pearce D., and Pharis R. 1989. Identification of Gibberellins A<sub>1</sub>, A<sub>3</sub>, and iso-A<sub>3</sub> in cultures of *Azospirillum lipoferum*. *Plant Physiol.* **90**: 45-47.

- Burdman, S., Kigel, J. and Okon, Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Biochem.* **29**: 923-929.
  
- Cangelosi G., Hung L., Puvanesarajah V., Stacey G., Ogza D., Leigh J., and Nester E. 1987. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interactions. *J. Bacteriol.* **169**: 2086-2091.
  
- Cangelosi G., Martinetti G., Leigh J., Lee C., Theines C., and Nester E. 1989. Role of *Agrobacterium tumefaciens* ChvA protein in export of  $\beta$ -1,2-glucan. *J. Bacteriol.* **171**: 1609-1615.
  
- Cantero, J., Cantero, A., y Cisneros, J. 1996. La vegetación de los paisajes hidrohalomórficos del centro de Argentina. Universidad Nacional de Río Cuarto, pp 23.
  
- Carlson, R., Sanders, R., Napoli, C., and Albersheim, P. 1978. Host-symbiont interactions. III. Purification and characterization of *Rhizobium* lipopolysaccharides. *Plant Physiol.* **62**: 912-917.
  
- Carlson, R., Kalembasa, S., Turowski, D., Pachori, P., and Noel, K. 1987. Characterization of the lipopolysaccharide from a *Rhizobium phaseoli* mutant that is defective in infection thread development. *Journal of Bacteriology.* **169**: 4923-4928.
  
- Chen, H., Batley, M., Redmond, J., and Rolfe, B. 1985. Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range *Rhizobium* due to changes in exopolysaccharides synthesis. *Journal of Plant Physiology.* **120**: 331-349.
  
- Chomczynski. P. 1992. One-hour downward alkaline capillary transfer for blotting of DNA and RNA. *Analytical Biochemistry.* **201**: 134-139.
  
- Cordovilla M., Ligeró F., and Lluch C. 1994. The effect of salinity on N fixation and assimilation in *Vicia faba*. *Journal of Experimental Botany.* **45**: 1483-1488.

- Cordovilla M., Ligerio F., and Lluch C. 1996. Growth and nitrogen assimilation in nodules in response to nitrate levels in *Vicia faba* under salt stress. *Journal of Experimental Botany*. **47**: 203-210.
  
- Costa J. 1991. Structural studies of some viscous, acid bacterial exopolysaccharides. PhD thesis. The Ohio State Univ. Columbus, Ohio.
  
- Creus C., Sueldo R., and Barassi C. 1997. Shoot growth and water status in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings grown under osmotic and salt stresses. *Plant Physiol. Biochem.* **35**: 939-944.
  
- Croes, C., Moens, S., Van Bastelaere, E., Vanderleyden, J., and Michiels, K. 1993. The polar flagellum mediates the *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2261-2269.
  
- Day J., and Döbereiner J. 1976. Physiological aspects of N<sub>2</sub>-fixation by a *Spirillum* from *Digitaria* roots. *Soil Biol. Biochem.* **8**: 45-50.
  
- Deflaun M., Tanzer A., McAteer A., Marchall B., and Levy S. 1990. Development of an adhesion assay and characterization of an adhesion-deficient mutant of *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 112-119.
  
- Del Gallo, M., Negi, M., and Neyra, C. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Journal of Bacteriology*. **171**: 3504-3510.
  
- De Mot R., and Vanderleyden J. 1989. Application of two-dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* **35**: 960-967.
  
- de Zamaroczy, M., Paquelin, A., and Elmerich, C. 1993. Functional organization of the *glnB-glnA* cluster of *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **175**: 2507-2515.

- de Zamaroczy, M., Paquelin, A., Peltre, G., Forchhammer, K., and Elmerich, C. 1996. Coexistence of two structurally similar but functionally different P<sub>II</sub> proteins in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* **178**: 4143-4149.
  
- Dische, Z. 1962. General color reactions. In *Methods Carbohydr. Chem.* **1**: 478-492.
  
- Döbereiner, J. 1989. Isolation and Identification of roots associated diazotrophs. In: Skinner F, Boodey R, Fendrik I (eds) *Nitrogen fixation with non-legumes*. Kluwer, The Netherlands, pp 103-108.
  
- Döbereiner, J. 1997. Biological nitrogen fixation in the tropics: social and economic contributions. *Soil Biol. and Biochem.* **29**: 771-774.
  
- Döbereiner J., Urquiaga S., and Boddey R. 1995a. Alternatives for nitrogen nutrition of crops in tropical agriculture. *Fertil. Res.* **42**: 339-346.
  
- Döbereiner, J., Baldani V., and Reis V. 1995b. Endophytic occurrence of diazotrophic bacteria in non-leguminous crops. In: *Azospirillum VI and related Microorganisms*, Fendrik I., del Gallo M., Vanderleyden J., and de Zamaroczy M. Eds., pp 3-14. Springer-Verlag, Berlin.
  
- Döbereiner J., and Pedrosa I. 1987. Nitrogen-fixing bacteria in non-leguminous crop plants. *Sci Tech Publishers/Springer Verlag, Madison, WI.*
  
- Dommergues Y., Balandreau J., Rinaudo G., and Weinhard P. 1973. Non-Symbiotic nitrogen fixation in the tropical rhizosphere of rice, maize and different tropical grasses. *Soil Biol. Biochem.* **5**: 83-89.
  
- Dreyfus, B.L., Elmerich, C. and Dommergues, Y. 1983. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 711-713.
  
- Dylan, T., Ielpi, L., Stanfield, S., Kashyap, L., Douglas, C., Yanovski, M., Nester, E., Elinski, D. and Ditta, G. 1986. *Rhizobium meliloti* genes required for nodule development

are related to chromosomal virulence genes in *Agrobacterium tumefaciens*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. **83**: 4403-4407.

- Elmerich C. 1985. Molecular Biology and Ecology of diazotrophs associated with non-leguminous. *Biotechnology*. **2**: 967-978.

- Elmerich, C., De Zamaroczy, M., Arsène, F., Pereg, L., Paquelin, A. and Kaminski, A. 1997. Regulation of *nif* gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum* *Soil Biol. Biochem.* **29**: 847-852.

- Eskew D., Eaglesham A., and App A. 1981. Heterotrophic <sup>15</sup>N fixation and distribution of newly fixed nitrogen in a rice-flooded soil system. *Plant Physiol.* **68**: 48-52.

- Espósito, G., Gesumaría, J., Castillo, C., Zorza, E., Sayago, F. y Daita, F. 1997. Cuartas Jornadas Científico-Técnicas. Fac. de Agronomía y Veterinaria, UNRC. Acta de resúmenes: 204-206.

- Eysers M., Vanderleyden J., and Van Gool A. 1988. Attachment of *Azospirillum* to isolated plant cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **49**: 435-439.

- Ferro-Luzzi Ames G., Prody C., and Kustu S. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* **160**: 1181-1183.

- Fougère F., Le Rudulier D., and Streeter J. 1991. Effects of salt stress on amino acid, and carbohydrate composition of roots, bacteroids, and cytosol of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **96**: 1228-1236.

- Fulchieri M., Lucangeli C., and Bottini R. 1993. Inoculation with *Azospirillum lipoferum* affects growth and gibberellin status of corn seedling roots. *Plant and Cell Physiology* **34**: 1305-1309.

- Gafny, R., Okon, Y., and Kapulnik, Y. 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 69-75.

- Gowri P., and Srivastava S. 1996. Encapsulation as a response of *Azospirillum brasilense* sp7 to zinc stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 319-322.
- Graham, P. 1991. Stress Tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475-484.
- Haahtela K., Wartiovaara T., Sundman V., and Skujins J. 1981. Root-associated N<sub>2</sub> fixation (Acetylene reduction) by *Enterobacteriaceae* and *Azospirillum* strains in cold-climate spodosols. *App. Environ. Microbiol.* **41**: 203.
- Hanahan, D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Heinrich D., and Hess D. 1985. Chemotactic attraction of *Azospirillum lipoferum* by wheat roots and characterization of some attractants. *Can. J. Microbiol.* **31**: 26-31.
- Hellriegel H., and Wilfarth H. 1888. Beilageheft zu der Zeitschrift des Vereins. F.d. Rübenezuckerindustrie des Deutschen Reiches, November 1888.
- Jain D., and Patriquin D. 1984. Root hair deformation, bacterial attachment and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1208-1213.
- Kapulnik Y., Feldman M., Okon Y., and Henis Y. 1985. Contribution of nitrogen fixed by *Azospirillum* to the N nutrition of spring wheat in Israel. *Soil. Biol. Biochem.* **17**: 509-515.
- Katupitiya, S., Millet, J., Vesk, M., Viccards, L., Zeman, A., Lidong, Z., Elmerich, C., and Kennedy, I. 1995. A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1987-1995.
- Katupitiya, S., New, P., Elmerich, C., and Kennedy, I. 1995. Improved N<sub>2</sub> fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: studies of colonization using reporter genes. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 447-452.

- Kennedy I., and Tchan Y. 1992. Biological nitrogen fixation in non-leguminous field crops: recent advances. *Plant Soil*. **141**: 93-118.
  
- Kloepper J., Schooners B., and Baker P. 1992. Proposed elimination of the term *Endorhizosphere*. *Phytopathology*. **82**: 726-727.
  
- Klossak R., and Bohlool B. 1983. Prevalence of *Azospirillum* spp in the rhizosphere of tropical grasses. *Can. J. Microbiol.* **29**: 649-652.
  
- Korhonen T., Tarkka E., Ranta H., and Haahtela K. 1983. Type 3 fimbriae of *Klebsiella* sp.: molecular characterization and role in bacterial adhesion to plant roots. *J. Bacteriol.* **155**: 860-865.
  
- Krieg N., and Döbereiner J. 1984. Genus *Azospirillum*. In Holt JG, Krieg NR (eds) *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 9<sup>th</sup> edn. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 94-104.
  
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature (London)*. **227**: 680-685.
  
- Lamm R., and Neyra C. 1981. Characterization and cyst production of azospirilla isolated from selected grasses growing in New Jersey and New York. *Can. J. Microbiol.* **27**: 1320-1325.
  
- Le Gouill C., Parent J., Rola-Pleszczynski M., and Stankova J. 1994. Analysis of recombinant plasmids by a modified alkaline lysis method. *Analytical Biochemistry*. **219**: 164.
  
- Leigh, J., Signer, E., and Walker, G. 1985. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. **82**: 6231-6235.

- Levanony H., Bashan Y., Romano B., and Klein E. 1989. Ultrastructural localization and identification of *Azospirillum brasilense* Cd on and within wheat roots by immuno-gold labelling. *Plant Soil*. **117**: 207-218.
  
- Liang, Y., Kaminski, P., and Elmerich, C. 1991. Identification of *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. *Mol. Microbiol.* **5**: 2735-2744.
  
- Liang, Y., de Zamaroczy, M., Arsène, F., Paquelin, A., and Elmerich, C. 1992. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 113-120.
  
- Liu D., Haase A.M., Lindqvist L., Lindberg A.A. and Reeves P.R. 1993. Glycosyl transferases of O-antigen biosynthesis in *Salmonella enterica*: identification and characterization of transferase genes of groups B, C2, and E1. *J. Bacteriol.* **175**: 3408-3413.
  
- Lloret, J., Bolaños, L., Lucas, M., Peart, J., Brewin, N., Bonilla, I., and Rivilla, R. 1995. Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3701-3704.
  
- Lloret, J., Wulff, B., Rubio, J., Downie, J., Bonilla, I., and Rivilla, R. 1998. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1024-1028.
  
- Lopez-de-Victoria G., Fiedler D., Zimmer-Faust R., and Lovell C. 1994. Motility behavior of *Azospirillum* in response to aromatic compounds. *Can. J. Microbiol.* **40**: 705-711.
  
- Lüderitz, O., Freudenberg, M., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E., and Shaw, D. 1982. Lipopolysaccharides of Gram-negative Bacteria. Current topics in membranes and transport. Vol. 17. Academic Press, Inc.

- Madi L., and Henis Y. 1989. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: Conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion. *Plant and Soil*. **155**: 89-98.
  
- Malik K., and Zafar Y. 1985. Quantification of root associated nitrogen fixation in Kallar grass as estimated by <sup>15</sup>N isotope dilution. In: Malik K *et al.* (eds) Proc. Int. Symp. Nitrogen and the Environment. Nuclear Institute for Agriculture and Biology. Faisalabad, Pakistan, pp 161-171.
  
- Mandimba G., Heulin T., Bally R., Guckert A., and Balandreau J. 1986. Chemotaxis of free-living bacteria towards maize mucilage. *Plant Soil*. **90**: 129-136.
  
- Marelli, H.1994. La siembra directa en Argentina. INTA. EEA. Marcos Juárez. Hoja Informativa No 295.
  
- Marolda C., and Valvano M. 1995. Genetic analysis of the dTDP-rhamnose biosynthesis region of the *Escherichia coli* VW187 (O7:K1) *rfb* gene cluster: Identification of functional homologs of *rfbB* and *rfbA* in the *rff* cluster and correct location of the *rffE* gene. *J. Bacteriol.* **177**: 5539-5546.
  
- Matsumoto S., Zhao Q., Yang J., Zhu S., and Li L. 1994. Salinization and its environmental hazards on sustainable agriculture in east Asia and its neighboring regions. In: Transactions of the 15<sup>th</sup> World Congress of Soil Science. 10-16 July 1994, Acapulco. Vol. 3a. Edited by J. D. Etchevers. International Society of Soil Science, Mexico city. Pp. 236-255.
  
- Matthyse A. 1983. Role of bacterial cellulose fibrils in *Agrobacterium tumefaciens* infection. *J. Bacteriol.* **154**: 906-915.
  
- Matthyse A. 1987. Characterization of nonattaching mutants of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **169**: 313-323.
  
- Matthyse A., Holmes K., and Gurlitz R. 1981. Elaboration of cellulose fibrils by *Agrobacterium tumefaciens* during attachment to carrot cells. *J. Bacteriol.* **145**: 583-595.

- Mellor R. 1992. Is trehalose a symbiotic determinant in symbioses between higher plants and microorganism? *Symbiosis*. **12**: 113-129.
  
- Michiels, K., Maris, M., Vanstocken, M., Vanderleyden, J., and Van Gool, A. 1985. DNA homology of *Azospirillum* with the *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal virulence region. *Arch. Intern. Physiol. Biochim.* **94**: 797-803.
  
- Michiels, K., Vanderleyden J., Van Gool A., and Signer E. 1988. Isolation and characterization of *Azospirillum brasilense* loci that correct *Rhizobium meliloti* *exoB* and *exoC* mutations. *Journal of Bacteriology*. **170**: 5401-5404.
  
- Michiels K., Vanderleyden J., and Van Gool A. 1989. *Azospirillum*-plant root associations: a review. *Biology and Fertility of Soils*. **8**: 365-368.
  
- Michiels, K., Verreth C., and J. Vanderleyden. 1990. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 705-711.
  
- Michiels, K.W., Croes, C.L. and Vanderleyden, J. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. of General Microb.* **137**: 2241-2246.
  
- Milcamps A., Stigter J., Vanderleyden J., and de Bruijn F. 1994. Isolation and characterization of the *Azospirillum brasilense* Sp7 *ntrA* gene. *Abstr. 7<sup>th</sup> Int. Symp. Mol. Plant-Microbe Interact.*, Edinburgh, U.K., June-July.
  
- Miller J. H. 1972. Assay of  $\beta$ -galactosidase. In *Experiments of Molecular Genetics*, pp. 352-355. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
  
- Miller K., and Wood J. 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-136.

- Moens S., Michiels K., and Vanderleyden J. 1995. Glycosylation of the flagellin of the polar flagellum of *Azospirillum brasilense*, a Gram-negative nitrogen-fixing bacterium. *Microbiology*. **141**: 2651-2657.
  
- Moens S., and Vanderleyden J. 1996. Functions of bacterial flagella. *Critical Reviews in Microbiology*. **22**: 67-100.
  
- Murty M., and Ladha J. 1987. Differential colonization of *Azospirillum lipoferum* on roots of two varieties of rice (*Oriza sativa* L.). *Biology and Fertility Soils*. **4**: 3-7.
  
- Nakashini, I., Kimura, K., and Yamazaki, E. 1974. Complex formation of gel-forming bacterial (1-3)- $\beta$ -D-glucan (curdlan type polysaccharides) with dyes in aqueous solution. *Carbohydr. Res.* **32**: 47-52.
  
- Neyra C., Atkinson A., and Olubayi O. 1995. Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity. *NATO ASI Ser. Ser. G*. **37**: 429-439.
  
- Okon Y., Gakmakgi L., Nur I., and Chet I. 1980. Aerotaxis and Chemotaxis of *Azospirillum brasilense*. *Microbiol. Ecol.* **6**: 277-280.
  
- Okon Y., and Kapulnik Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil*. **90**: 3-16.
  
- Okon Y., and Itzigsohn R. 1992. Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and the ecological role of PHB in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Lett.* **103**: 131-139.
  
- Okon, Y. and Labandera-González, C. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol, Biochem.* **26**: 1591-1601.
  
- Patriquin D., and Döbereiner J. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium-reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and the other grasses in Brazil. *Can. J. Microbiol.* **24**: 734-742.

- Pereira J., Cavalcante V., Baldani J., and Döbereiner J. 1988. Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. *Plant soil*. **110**: 269-274.
  
- Prinsen E., Cosatcurta A., Michiels K., Vanderleyden J., and Van Onckelen H. 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: Evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *MPMI*. **6**: 609-615.
  
- Puvanesarajah, V., Schell, F., Stacey G., Douglas C., and Nester E. 1985. Role for 2-linked- $\beta$ -D-glucan in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**: 102-106.
  
- Puvanesarajah, V., Schell, F., Gerhold, D., and Stacey, G. 1987. Cell surface polysaccharides from *Bradyrhizobium japonicum* an a nonnodulating mutant. *Journal of Bacteriology*. **169**: 137-141.
  
- Rao A., and Venkateswarlu B. 1982. Associative Symbiosis of *Azospirillum lipoferum* with dicotyledonous succulent plants of the indian desert. *Can. J. Microbiol.* **28**: 778-782.
  
- Rao A., and Venkateswarlu B. 1985. Salt tolerance of *Azospirillum brasilense*. *Acta Microbiol. Hung.* **32**: 221-224.
  
- Reinhold B., Hurek T., Frenndrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans D., and Deley J. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. nov, a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca*). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37**: 43-51.
  
- Rivarola, V., Castro, S., Mori, G., Jofré, E., Fabra, A., Garnica, R., and Balegno, H. 1998. Response of *Azospirillum brasilense* Cd to Sodium Chloride Stress. *Antonie van Leeuwenhoek*. **73**: 255-261
  
- Sadasivan L., and Neyra C. 1985. Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.* **163**: 716-723.

- Sadasivan L., and Neyra C. 1987. Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *J. Bacteriol.* **169**: 1670-1677.
  
- Sambrook, J., Fritsch, E., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring harbor, N.Y.
  
- Schloter M., Kirchof G., Heinzmann U., Döbereiner J., and Hartmann A. 1994. Immunological studies of the wheat root colonization by the *Azospirillum brasilense* strains Sp7 and Sp245 using strain-specific monoclonal antibodies. In: *Nitrogen Fixation with Non-Legumes*, Hegazi N., Fayez M., Monib M., Eds., pp. 291-297. American University of Cairo Press, Cairo.
  
- Schöllhorn R., and Burris R. 1966. Study of intermediates in nitrogen fixation. *Fed. Proc.* **25**: 710.
  
- Schöter, M., S. Moens, C. Croes, G. Reidel, M. Esquenet, R. De Mot, A. Hartmann and K. Michiels. 1994. Characterization of cell surface components of *Azospirillum brasilense* Sp7 as antigenic determinants for strain-specific monoclonal antibodies. *Microbiology.* **140**: 823-828.
  
- Selveraj, G. and Iyer, V. 1983. Suicide plasmid vehicles for insertion mutagenesis in *Rhizobium meliloti* and related bacteria. *J. Bacteriol.* **156**: 1292-1300.
  
- Simon, R., Prierer, U., and Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. *Bio/Technology.* **1**: 784-791.
  
- Simon, R., Quandt, J., and Klipp, W. 1989. New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene.* **80**: 131-169.
  
- Skorupska, A., Derylo, M., and Lorkiewocz, Z. 1985. Rol of non-carbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Arch. Microbiol.* **1**: 307-310.

- Smith R., Bouton J., Schank S., Quesenberry K., Tyler M., Milam J., Gaskins M., and Littell R. 1976. Nitrogen fixation in grasses inoculated with *Spirillum lipoferum*. *Science* **193**: 1003-1005.
- Tarrand J., Krieg N., and Döbereiner J. 1978. A taxonomy study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* Sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **24**: 967-980.
- Tsai & Frash. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115-119.
- Tung W., and Chow K. 1996. A modified medium for efficient electrotransformation of *Escherichia coli*. Elsevier Trends Journals Technical Tips. 00013.
- Umali-Garcia M., Hubbell D., Gaskins M., and Dazzo F. 1980. Association of *Azospirillum* with grass roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**: 219-226.
- Valverde, C., Hozbor, D., and Lagares, A. 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques.* **22**: 230-236.
- Van Bastelaere, E., De Mot, R., Michiels, K. and Vanderleyden, J. 1993. Differential gene expression in *Azospirillum* spp. by plant-root exudates: Analysis of protein profiles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**: 335-342.
- Van Berkum P., and Bohlool B. 1980. Evaluation of nitrogen fixation by bacteria in association with roots of tropical grasses. *Microbiol. Rev.* **44**: 491-517.
- Vande Broek, A., Michiels, J., Van Gool, A. and Vanderleyden, J. 1993. Spatial-Temporal Colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *MPMI.* **6**: 592-600.
- Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. 1995. Review: Genetics of the *Azospirillum*-Plant Root Association. *Critical Reviews in Plant Sciences.* **14**: 445-466.

- Vanstockem, M., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Gool, A. 1987. Transposon Mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Physical Analysis of Tn5 and Tn5-Mob Insertion Mutants. *Applied and Environmental Microbiology*. **53**: 410-415.
  
- Van Rhijn P., Vanstockem M., Vanderleyden J., and De Mot R. 1990. Isolation of behavioral mutants of *Azospirillum brasilense* by using Tn5-*lacZ*. *Appl. Environ. Microbiol.* **4**: 990-996.
  
- Vesper S. 1987. Production of pili (fimbriae) by *Pseudomonas fluorescens* and correlation with attachment to corn roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1397-1405.
  
- Vesper S., and Bauer D. 1986. Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 134-141.
  
- Volkmar K., Hu Y., and Steppuhn H. 1998. Physiological responses of plants to salinity: A review. *Canadian Journal of Plant Science*. **78**: 19-27.
  
- Volpin H., Burdman S., Castro-Sowinski S., Kapulnik Y., and Okon Y. 1996. Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa roots. *MPMI*. **9**: 388-394.
  
- Von Bulow J., and Döbereiner J. 1975. Potential for nitrogen fixation in maize genotypes in Brazil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **72**: 2389-2393.
  
- Waelkens, F., Maris, M., Verreth, C., Vanderleyden, J., and Van Gool, A. 1987. *Azospirillum* DNA shows homology with *Agrobacterium* chromosomal virulence genes. *FEMS Microbiological Letters*. **43**: 241-246.
  
- Westphal, O. and Jann, K. 1965. Bacterial lipopolysaccharides. In Whistler R. (ed.), *Meth. Carbohydr. Chem.* **5**: 83-91.

- Whatley M., Bodwin J., Lippincott B., and Lippincott J. 1976. Role for *Agrobacterium* cell envelope lipopolysaccharide in infection site attachment. *Infection and Immunity*. **13**: 1080-1083.
  
- Yoshida T., and Ancajas R. 1973. Nitrogen-fixing activity in upland and flooded rice fields. *Soil Sci Soc Ann Proc*. **37**: 42-46.
  
- Zhang, Y., Burris, R., Ludden, P. and Roberts, G. 1997. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 195-204.

# Saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots

Edgardo Jofré, Sonia Fischer, Viviana Rivarola, Héctor Balegno, and Gladys Mori

**Abstract:** The present work was designed to study the effect of saline stress on the attachment of *Azospirillum brasilense* to maize and wheat roots. We demonstrate that both attachment steps (adsorption and anchoring) are altered. A 100-kDa protein disappeared under these experimental conditions. Coincidentally, a 100-kDa flagellum protein has been identified as the agent responsible for adsorption. However, the adhesive properties of bacteria appear to involve other factors, such as the ionic strength of the medium. The impairment of anchoring ability was correlated with alterations in exopolysaccharide, glucan, and lipopolysaccharide contents.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, saline stress, *Azospirillum*-root interaction.

**Résumé :** La présente étude a évalué l'effet d'un stress salin sur l'adhérence d'*Azospirillum brasilense* aux racines du maïs et du blé. Nous avons démontré que les deux étapes de l'adhérence (adsorption et accrochage) étaient modifiées. Dans ces conditions expérimentales une protéine de 100 kDa disparaissait mais par coïncidence une protéine flagellaire de 100 kDa a été identifiée comme responsable de l'adsorption. Les propriétés d'adhérence des bactéries semblent par contre impliquer d'autres facteurs comme la force ionique du milieu. L'incapacité d'accrochage des bactéries a été mise en corrélation avec des changements dans le contenu en exopolysaccharides, en glucanes et en lipopolysaccharides.

**Mots clés :** *Azospirillum brasilense*, stress salin, interaction racine-*Azospirillum*.

[Traduit par la rédaction]

## Introduction

Members of the genus *Azospirillum* associate with plant roots and have been shown to improve the growth of many agriculturally important crops (Vande Broek et al. 1993). Yield increases have been attributed to mechanisms such as nitrogen fixation, phytohormone production, and nitrate reduction (Assmus et al. 1995; Vande Broek and Vanderleyden 1995).

Success in crop yield enhancement by microorganisms depends on efficient plant root colonization. Several bacterial properties are believed to contribute to this capacity, such as chemotaxis toward root exudates, metabolism of root exudate components, suppression of competing microorganisms, and most importantly, the ability to bind to the plant root surface (Vande Broek et al. 1993). Attachment of *Azospirillum brasilense* to wheat roots (Michiels et al. 1990), as well as to maize roots (Jofré et al. 1996), proceeds in two steps. First, bacteria adsorb rapidly and reversibly on the root surface; in this step, a protein cell-surface component is involved. Croes et al. (1993) presented evidence for the role of the bacterial polar

flagellum as a wheat root adhesin. Several hours after adsorption, bacteria become irreversibly anchored on the adsorption site surface. This second step is probably mediated by surface polysaccharides (exopolysaccharides (Schloter et al. 1994) or lipopolysaccharides (Lüderitz et al. 1982)).

In the field, deleterious agents may reduce or eliminate the beneficial effects of *Azospirillum* on plant growth. Previous studies in our laboratory demonstrated that the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, at concentrations used on crops, directly alters the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize roots (Jofré et al. 1996). We have recently focused our attention on the fact that, in Latin America, salt-stressed agricultural land ranges from 400 to 950 million ha (Graham 1991). The objective of this research was to determine the effect of saline stress on the attachment of *Azospirillum brasilense* to maize and wheat roots as well as on the involvement of proteins and polysaccharides in the bacteria-root interaction.

## Materials and methods

### Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma Chemical (St. Louis, Mo.). Methyl [<sup>3</sup>H]thymidine (6.70 Ci/mmol; 1 Ci = 37 GBq) was purchased from New England Nuclear (Boston, Mass.).

### Bacterial strains and media

*Azospirillum brasilense* Cd (ATCC 29710) used in this study was kindly supplied by Embrapa (Seropédica, Brazil). Cells were maintained and restreaked every 3 weeks on fresh plates of Luria-Bertani

Received September 9, 1997. Revision received March 2, 1998. Accepted March 6, 1998.

E. Jofré, S. Fischer, V. Rivarola, H. Balegno, and G. Mori.<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36, Km. 601, 5800-Río Cuarto-Córdoba, Argentina.

<sup>1</sup> Author to whom all correspondence should be addressed (e-mail: gmori@exa.unrc.edu.ar).

(LB) medium supplemented with 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>.

The time course of cellular growth was examined in liquid medium supplemented with NaCl to final concentrations of 0, 100, 200, 300, and 400 mM. Cultures were grown at 32 ± 2°C on a rotary shaker at 100 rpm. The osmotic pressure of the different media was measured with a vapor pressure osmometer (model 5500 C; Wescor, Logan, Utah). Bacterial growth was monitored spectrophotometrically at 600 nm.

For adsorption and anchoring experiments, a single colony from a fresh stock plate was inoculated in 10 mL of LB medium supplemented with 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 2.5 mM MgSO<sub>4</sub>, and methyl [<sup>3</sup>H]thymidine (200 µCi). Control bacterial cultures were grown aerobically on a rotary shaker to an optical density (OD<sub>600</sub>) of 1.0 (1.4 × 10<sup>8</sup> bacteria/mL, as determined by plating). A second colony was inoculated in the same way in the same medium supplemented with 300 mM NaCl and methyl [<sup>3</sup>H]thymidine (200 µCi). Cultures of these treated bacteria were grown to an OD<sub>600</sub> of 1.0, which corresponded to a similar number of control bacteria (1.12 × 10<sup>8</sup> bacteria/mL).

#### Cultivation of maize and wheat seedlings and preparation of roots

Seeds of *Zea mays* and *Triticum aestivum* were surface sterilized as previously described (Jofré et al. 1996). Sterilized seeds were germinated on plates containing wet filter paper and cotton for 3 days at 23°C in the dark. Individual sterile seedlings were aseptically transferred to cotton-plugged 200 × 22 mm glass tubes containing Marin-Prevel-Charpentier-Lavigne (MPCL) medium (Michiels et al. 1991). These were placed in a growth chamber with a 16 h day : 8 h night cycle, a constant temperature of 23°C, and a relative humidity of 80%. Roots were cut from 5-day-old maize and 21-day-old wheat seedlings with approximately equally-sized root systems and placed individually in sterile test tubes containing 4.5 mL of MPCL medium.

#### Bacterial adsorption to maize and wheat roots

The procedure utilized was based on that used by Michiels et al. (1991). Radioactively-labelled control and NaCl-treated bacteria grown as described above were collected by centrifugation, washed twice in sterile 0.85% NaCl to remove the unincorporated label, and suspended in the original volume of MPCL medium. Cellular specific activity was determined in one aliquot. Both control and treated cells had comparable radioactivity, demonstrating that the uptake of methyl [<sup>3</sup>H]thymidine was not altered in the treated group. Portions (0.5 mL) of labelled and washed bacterial cells were added to the tubes containing a maize or wheat root in 4.5 mL of MPCL. Four treatments were examined: (i) cells grown in control medium were added to the maize or wheat root in MPCL (C; control bacteria in control medium); (ii) cells grown in control medium were added to the maize or wheat root in MPCL supplemented with 300 mM NaCl (Ct; control bacteria in treated medium); (iii) cells grown in high-salt medium (LB plus 300 mM NaCl) were added to the maize or wheat root in MPCL (T; treated bacteria in control medium); and (iv) cells grown in high-salt medium were added to the maize or wheat root in MPCL supplemented with 300 mM NaCl (Tt; treated bacteria in treated medium).

In all treatments, the pH was 6.5–7. Bacterial suspensions were decanted after a 2-h incubation on a rotary shaker at 30°C and 50 rpm. Roots were washed three times by immersion in distilled water for 1 min without agitation and gently dried on a piece of filter paper. The amount of radioactivity associated with the root was measured in a liquid scintillation counter. In each treatment, the percentage of initial radioactivity (in a 0.5-mL washed control or treated bacterial suspension) remaining on the root and the number of bacteria adsorbed to the root were calculated. Since the initial control inoculum contained 1.4 × 10<sup>8</sup> bacteria/mL, 1% adsorption corresponds to 7 ×

10<sup>5</sup> bacteria/root. The total number of experiments was four and each experiment was performed with 3 or 4 roots/treatment.

#### Bacterial anchoring to maize and wheat roots

The same procedure and experimental design were used as in the adsorption experiments, except that MPCL medium was substituted for nitrogen-free medium (NMF) and the incubation time was 24 h instead of 2 h. MPCL medium is a nitrogen-free minimal salts medium containing 0.5% fructose that induces high exopolysaccharide production (Michiels et al. 1990). The total number of experiments was four and each experiment was performed with 3 or 4 roots/treatment.

#### Microscopical observations

Cells of *Azospirillum brasilense* Cd grown on LB agar plates with or without 300 mM NaCl and supplemented with 200 µg calcofluor/mL (Fluorescent Brightener 28; Sigma) were observed under an epifluorescent microscope (Zeiss) at 365 nm. Calcofluor is a fluorescent dye that binds to β-linked polysaccharides (Michiels et al. 1990).

#### Exopolysaccharides, capsular polysaccharides, and periplasmic glucans

Exopolysaccharide (EPS) and capsular polysaccharide (CPS) contents were determined in the four treatment groups of bacteria maintained under the same conditions as in the anchoring experiments, but without the roots. After 24 h of incubation in the anchoring medium, the cultures were centrifuged and EPS were precipitated from the supernatant with three volumes of cold ethanol and measured by the anthrone method (Dische 1962). Capsular polysaccharides were extracted following the technique of Skorupska et al. (1985), separating extractable from nonextractable CPS, and measured as above. Periplasmic glucans were isolated from 5-mL cultures of control and treated bacteria grown to an OD of 1.0. After centrifugation at 3500 × g for 10 min, cells were washed in 1 mL of water and pellets treated with 200 µL of 75% v/v ethanol at 70°C for 30 min (Breedveld et al. 1995). The alcoholic supernatant was concentrated under vacuum, the residue dissolved in 20 µL of water, and the anthrone reaction performed.

Extract aliquots were spotted onto TLC plates (Silica gel G 60; Sigma). The chromatograms were developed in *n*-butanol – acetic acid – ethyl ether – water (9:6:3:1) for EPS and CPS and in ethanol–butanol–water (5:5:4) for glucans. For visualization, the TLC plates were sprayed with 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in methanol and heated at 120°C for 10 min.

#### Protein gel electrophoresis

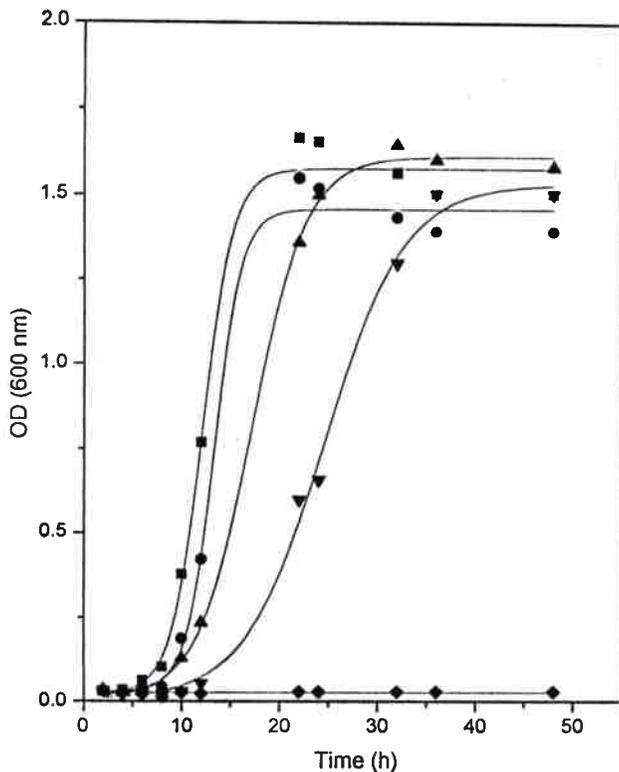
Total, periplasmic, and outer membrane proteins were extracted from control and treated cultures of *Azospirillum brasilense* Cd grown up to an OD of 1.0. Protein concentration was determined according to Bradford (1976) with bovine serum albumin as a standard.

Total proteins were extracted by the phenol method (De Mot and Vanderleyden 1989). Periplasmic proteins were released following Ferro-Luzzi Ames et al. (1984). After extraction, proteins were separated by sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE; Laemmli 1970) in slab 10% gels. Outer membrane proteins were prepared as described by Achtman et al. (1983) and separated, as above, in slab 10% gels containing 4 M urea.

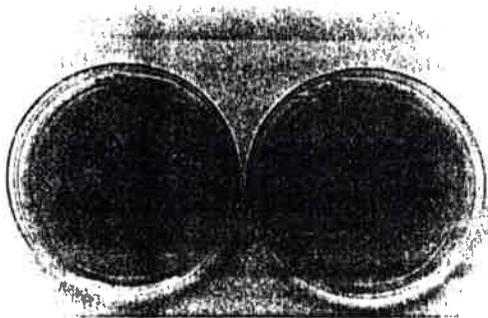
#### Isolation and analysis of lipopolysaccharides of *Azospirillum brasilense* Cd

Control and treated cells grown on LB agar plates were used for lipopolysaccharide (LPS) extraction, following the method of Valverde et al. (1997). Released LPS were analyzed by SDS-PAGE. After electrophoresis, gels were silver stained (Tsai and Frash 1982).

**Fig. 1.** Effect of NaCl on the growth of *Azospirillum brasilense*. Growth was measured by the increase in absorbance at 600 nm. ■, control; ●, 100 mM NaCl; ▲, 200 mM NaCl; ▼, 300 mM NaCl; ◆, 400 mM NaCl.



**Fig. 2.** Agar plates of *Azospirillum brasilense* Cd exhibiting the morphology of the colonies grown with (left) or without (right) a supplement of 300 mM NaCl.



#### Statistical analysis

Means were compared using the Student *t* test at the 0.05 significance level. Each treatment mean was compared with the control (C).

## Results and discussion

### Effect of NaCl concentration on growth of *Azospirillum brasilense* Cd

Growth of bacteria in the presence of different NaCl concentrations indicated that the strain could tolerate up to 200 mM NaCl in the medium without an appreciable decline in growth.

**Fig. 3.** Electrophoretic analysis of the LPS of *Azospirillum brasilense* Cd visualized with silver stain. Lane 1, control; lane 2, 300 mM NaCl.



However, at 300 mM NaCl, there was a 66% decrease in the growth of the 24-h culture (logarithmic phase), but the maximum growth in the control was attained at 48 h (stationary phase). Total growth inhibition was seen at higher concentrations (400 mM NaCl; Fig. 1). Parts of these results have been previously published.

All additional analyses were carried out using the 300 mM NaCl concentration.

### Effect of saline stress on *Azospirillum brasilense* Cd morphology

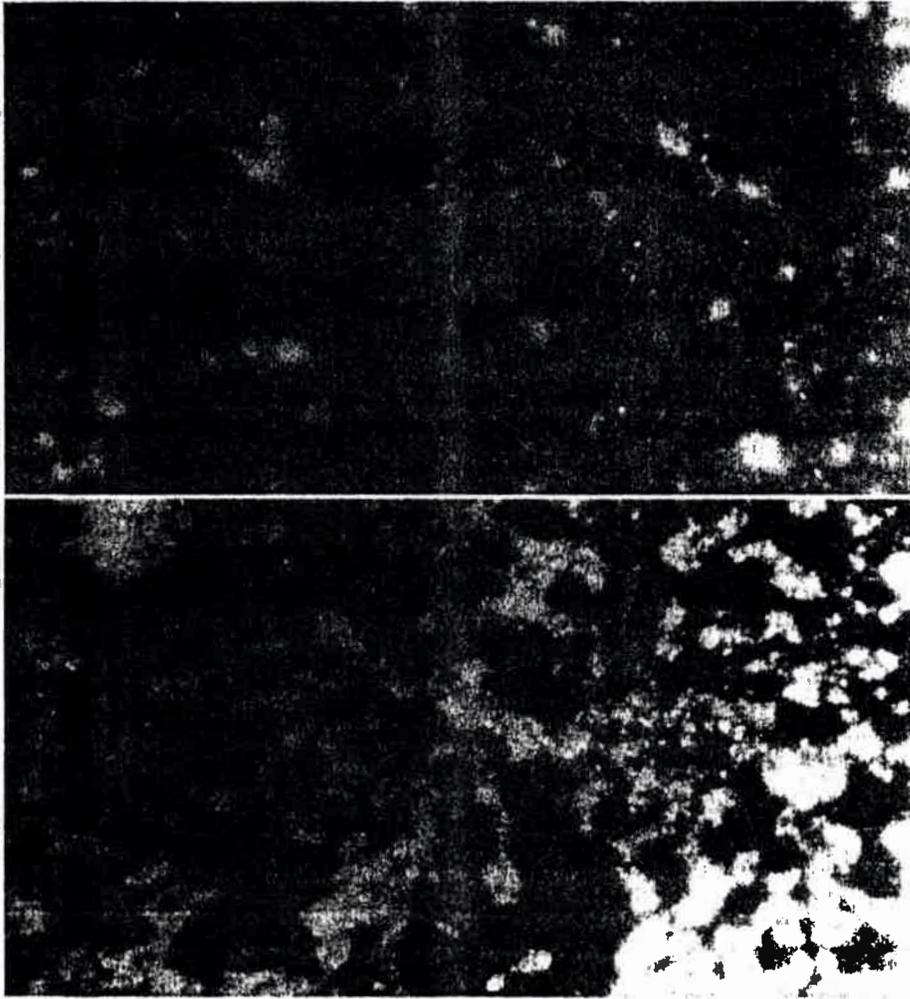
When grown on LB solid medium, control colonies were mucoid and pink. In contrast, colonies grown on NaCl-treated solid medium were smaller, drier in appearance, and more pigmented (Fig. 2). This change may reflect salt-induced structural alterations of the LPS as described by Lloret et al. (1995). In this study, changes in the LPS profile were seen when analyzed by SDS-PAGE (Fig. 3). The different morphology could also be caused by an alteration in EPS production. Since EPS production has been correlated with the ability to bind calcofluor (Del Gallo et al. 1989), we grew *Azospirillum brasilense* in control and treated media supplemented with calcofluor. As shown in Fig. 4, treated cells present less fluorescence than the control, indicating an impairment in EPS production.

### Adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots: effects of saline stress

The number of adsorbed bacteria diminished significantly in the treated group (T) for both plant species (Table 1), suggesting that saline affected the first step of the *Azospirillum*-plant interaction. The mechanism of this alteration could be modifications of the bacterial surface induced by saline stress and (or) changes in the medium ionic strength. To distinguish between these alternatives, control bacteria were allowed to adsorb to the root in the treated medium (Ct). Because adsorption was also altered under these conditions, the mechanism appears to be related to the second alternative.

Gafny et al. (1986) demonstrated that the number of bacte-

**Fig. 4.** *Azospirillum brasilense* Cd in LB with (top) or without (bottom) a supplement of 300 mM NaCl. EPS were revealed with calcofluor (epifluorescent microscopy). Cultures were grown to an OD<sub>600</sub> of 1.0. The numbers of bacteria in both groups were similar (see Materials and methods).



ria adsorbed to maize roots is affected by the ionic strength of the medium. On the other hand, minor and no differences were observed in the maize and wheat (Tt) groups, respectively, which could be due to an adaptation of the bacteria to the treated medium.

We analyzed total, periplasmic, and outer membrane protein profiles in control and treated bacteria to evaluate possible modifications to the bacterial surface. Total protein profile analysis showed minor changes in the treated group under these conditions (data not shown). However, in the treated group, there were several differences in periplasmic proteins compared with the control; the 26-, 30-, 35-, and 41-kDa bands were diminished (Fig. 5a). On the other hand, an 11-kDa protein, absent in the control, appeared in the treated group, while a 39-kDa band disappeared. The most important changes were seen in the outer membrane proteins (Fig. 5b), whose control pattern consisted of four main bands: 42, 100, 116, and 122 kDa. The 100-kDa protein was absent in the treated group.

Although factors controlling successful colonization of the

root by *Azospirillum* species are not yet fully understood, earlier studies suggested the involvement of a 100-kDa protein in the rapid and reversible adsorption of the bacteria to the roots (Madi and Henis 1989). Later, Croes et al. (1993) presented strong evidence involving the polar flagellum in this first attachment step. They demonstrated that nonflagellate mutants are unable to adsorb to the plant root surface (Croes et al. 1993; Michiels et al. 1991). The *Azospirillum brasilense* polar flagellum consists mainly of a 100-kDa protein (Schloter et al. 1994), which was identified as the adhesin-protease sensitive factor whose elimination inhibited adsorption. In the present work, we have observed the disappearance of a 100-kDa protein in the 300 mM NaCl treated bacterial outer membrane (Fig. 5b). Loss of this protein could explain the diminished bacterial adsorption found in the treated group (T) and could be considered as more indirect evidence that the polar flagellum functions as a root adhesin. On the other hand, this result is consistent with well-documented changes, induced by environmental stimuli, that occur in the outer membrane of bacte-

**Table 1.** Effects of 300 mM NaCl on the adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots.

Treatment	No. of bacteria/root	
	Maize	Wheat
C	9.76×10 <sup>5</sup> ±0.34×10 <sup>5</sup>	55.6×10 <sup>5</sup> ±7.5×10 <sup>5</sup>
T	5.35×10 <sup>5</sup> ±1.00×10 <sup>5</sup> **	24.1×10 <sup>5</sup> ±4.1×10 <sup>5</sup> **
Ct	7.53×10 <sup>5</sup> ±0.76×10 <sup>5</sup> *	31.5×10 <sup>5</sup> ±5.3×10 <sup>5</sup> *
Tt	7.88×10 <sup>5</sup> ±1.19×10 <sup>5</sup>	46.3×10 <sup>5</sup> ±9.8×10 <sup>5</sup>

Notes: C, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium to an OD<sub>600</sub> of 1, and adsorbed to a root in control adsorption medium after 2 h of incubation; T, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium plus 300 mM NaCl to an OD<sub>600</sub> of 1, and adsorbed to a root in control adsorption medium after 2 h of incubation; Ct, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium to an OD<sub>600</sub> of 1, adsorbed to a root in medium plus 300 mM NaCl after 2 h of incubation; Tt, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium plus 300 mM NaCl to an OD<sub>600</sub> of 1, and adsorbed to a root in adsorption medium plus 300 mM NaCl after 2 h of incubation. The pH was 7. Values are the means ± SE of four experiments (in each experiment, 3–4 roots/treatment were examined). Treated means differ from control means at  $p < 0.01$  (\*) and  $p < 0.0025$  (\*\*).

**Table 2.** Effects of 300 mM NaCl on the anchoring of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots.

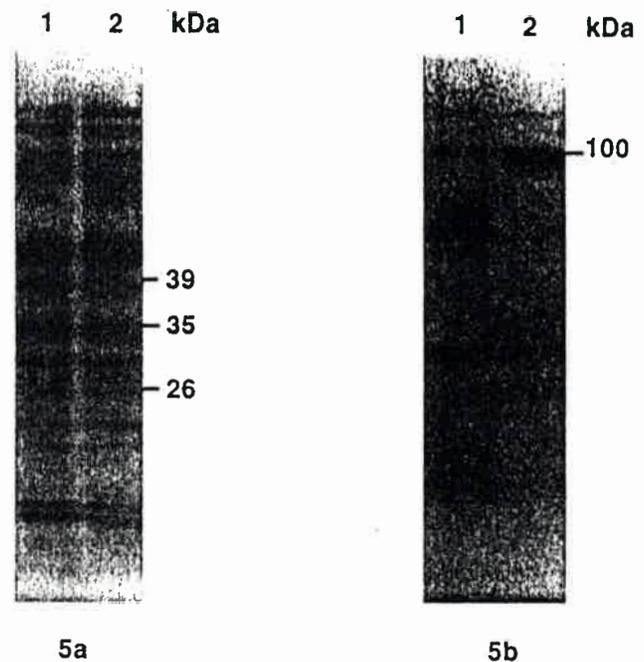
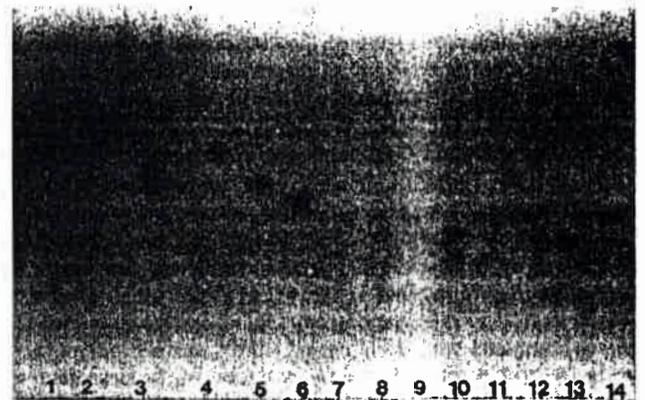
Treatment	No. of bacteria/root	
	Maize	Wheat
C	2.72×10 <sup>6</sup> ±0.56×10 <sup>6</sup>	19.9×10 <sup>6</sup> ±0.75×10 <sup>6</sup>
T	0.85×10 <sup>6</sup> ±0.21×10 <sup>6</sup> **	8.4×10 <sup>6</sup> ±0.41×10 <sup>6</sup> *
Ct	0.84×10 <sup>6</sup> ±0.13×10 <sup>6</sup> **	1.7×10 <sup>6</sup> ±0.26×10 <sup>6</sup> **
Tt	0.38×10 <sup>6</sup> ±0.09×10 <sup>6</sup> **	5.8×10 <sup>6</sup> ±0.98×10 <sup>6</sup> **

Notes: C, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium to an OD<sub>600</sub> of 1, and anchored to a root in control NMF medium after 24 h of incubation; T, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium plus 300 mM NaCl to an OD<sub>600</sub> of 1, and anchored to a root in control NMF medium after 16 h of incubation; Ct, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium to an OD<sub>600</sub> of 1, and anchored to root in medium plus 300 mM NaCl after 16 h of incubation; Tt, bacteria labeled with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine, grown in LB medium plus 300 mM NaCl to an OD<sub>600</sub> of 1, and anchored to a root in NMF medium plus 300 mM NaCl after 16 h of incubation. The pH was 7. Values are the means ± SE of four experiments (in each experiment, 3–4 roots/treatment were examined). Treated means differ from control means at  $p < 0.0025$  (\*) and  $p < 0.0005$  (\*\*).

ria (Forst and Inouye 1988). However, the adhesive properties cannot be ascribed solely to a flagellum protein, since control bacteria in saline medium (Ct) also presented a minor adsorption capacity and treated bacteria adapted to saline stress could adsorb normally. It seems likely that the ionic strength conditions of the medium also play a role in the interaction.

#### Anchoring of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots: effects of saline stress

Table 2 shows that this attachment step was significantly altered in the three groups, Ct, T, and Tt, in both plant species studied. The last group was one of the most affected, with a 70% diminution in the number of bacteria anchored. In spite of normal adsorption, treated bacteria in saline medium were not able to anchor to the root. Dei Gallo et al. (1989) demon-

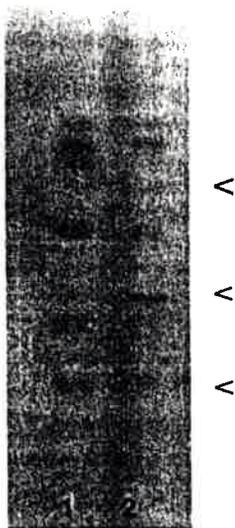
**Fig. 5.** Electrophoretic analysis of *Azospirillum brasilense* periplasmic and external membrane proteins. (a) Periplasmic proteins. Lane 1, control; lane 2, 300 mM NaCl. (b) External membrane proteins. Lane 1, 300 mM NaCl; lane 2, control.**Fig. 6.** TLC of EPS (lanes 7–10) and CPS (lanes 11–14) isolated from *Azospirillum brasilense* in anchoring conditions. Lane 1, glucose; lane 2, rhamnose; lane 3, mannose; lane 4, fucose; lane 5, fructose; lane 6, galactose; lanes 7 and 11, C; lanes 8 and 12, Ct; lanes 9 and 13, T; lanes 10 and 14, Tt.

strated, by scanning and transmission microscopy, that two main forms of EPS exist on the outer bacterial surface: the CPS component, which appears to be more dense and tightly bound to the cell, and the EPS component, which appears lighter, extending away from the cell. EPS were reduced by 55, 60, and 64% in the Ct, T, and Tt groups, respectively, while CPS was diminished only in the Ct treatment (Table 3). The EPS

**Table 3.** Polysaccharide and glucan contents of *Azospirillum brasilense* Cd in anchoring conditions ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  protein).

Polysaccharides	C	Ct	T	Tt
EPS	228.48 $\pm$ 22.85	104.39 $\pm$ 12.1**	89.74 $\pm$ 7.3**	82.46 $\pm$ 7.3**
Extractable CPS	89.48 $\pm$ 6.51	128.37 $\pm$ 16.4*	102.73 $\pm$ 13.36	165.5 $\pm$ 2.83**
Nonextractable CPS	460.8 $\pm$ 51.16	121.08 $\pm$ 23.5**	425.36 $\pm$ 33.26	326.96 $\pm$ 42.4
Glucans	22.36 $\pm$ 0.91	Not determined	9.76 $\pm$ 1.14**	Not determined

Notes: C, control bacteria in control anchoring medium; Ct, control bacteria in treated anchoring medium; T, treated bacteria in control anchoring medium; Tt, treated bacteria in treated anchoring medium. Values are the means  $\pm$  SE of four to six experiments. Treated means differ from control means at  $p < 0.05$  (\*) and  $p < 0.0005$  (\*\*).

**Fig. 7.** TLC of periplasmic glucans isolated from *Azospirillum brasilense* Cd. Lane 1, control; lane 2, treated. Arrows indicate the main changes observed (see Results and discussion).

reduction was in accordance with the diminished fluorescence found with calcofluor (Fig. 4). Furthermore, TLC analysis demonstrated qualitative changes in the composition of EPS, the most important of which were the disappearance of the 0.30-band in the Ct and T groups and the appearance of a new band ( $R_f = 0.38$ ; Fig. 6). CPS-TLC analysis revealed differences only in the T group. Periplasmic glucans were reduced by 56% in the treated group (Table 3) and TLC revealed that a glucan with an  $R_f$  of 0.155 disappeared while two new bands were visible (0.295 and 0.485; Fig. 7).

Michiels et al. (1990) demonstrated that *Azospirillum brasilense* Sp7 mutants with deficient or altered surface polysaccharide structure were impaired in the anchoring process. Our results are in agreement with this observation, since there is a relationship between the impaired anchoring of stressed bacteria and reduced EPS content as well as altered monosaccharide composition. However, the attachment mechanism appears to be complex, perhaps involving several molecules. For instance, in *Agrobacterium tumefaciens*, the production of periplasmic  $\beta$ -1,2 glucans is necessary for the attachment and subsequent tumor production on plants (Puvanesarajab et al. 1985). In our study, glucans were not only diminished in content in stressed bacteria but were also changed in their compo-

sition (Table 3; Fig. 6). In the symbiosis between rhizobia and their host plants the LPS have been shown to be important (Dazzo et al. 1991). In our study, these molecules were altered in their electrophoretic motility by salt stress. LPS are the major components of the outer membrane of Gram-negative bacteria and are relevant to both outer membrane stability and the interaction of the bacteria with other organisms and with the environment (Lüderitz et al. 1982).

One interesting observation is that stress-adapted bacteria that could adsorb normally to the roots (Tt) failed in the anchoring step. This result provides new evidence that the first step is weak and reversible and that normal polysaccharide composition is needed for an effective interaction. The changes in morphology (Fig. 2) are likely related to the altered EPS and LPS composition.

We conclude that, under these experimental conditions, saline stress affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots. In particular, the involvement of the 100-kDa adhesin in the first step and EPS, glucans, and LPS in the second step was demonstrated. In view of our results, we consider that it is of agronomic importance to continue investigating the harmful effects of salt on the *Azospirillum*-cereal interaction. Further studies are in progress to investigate this process with seedlings grown under saline conditions and to obtain EPS- and LPS-altered and salt-resistant *Azospirillum* mutants.

### Acknowledgements

We are grateful to Donna Balegno for her help in preparing the English manuscript. This work was supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), the Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de Córdoba (CONICOR), and the Secretaría de Ciencia y Técnica (SECYT) de la Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. E.J. received a scholarship from the SECYT of the Universidad Nacional de Río Cuarto and from CONICOR. S.F. received a scholarship from CONICOR.

### References

- Achtman, M., Mercer, A., Kisecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A., and Silver, R.P. 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect. Immun.* 39: 315-335.
- Assmus, B., Hutzler, P., Kirchof, G., Amann, R., Lawrence, J., and Hartmann, A. 1995. In situ localization of *Azospirillum brasilense* in the rhizosphere of wheat with fluorescently labeled, rRNA-

- targeted oligonucleotide probes and scanning confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1013–1019.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Breedveld, M.W., Benesi, A., Marco, M., and Miller, K. 1995. Effects of phosphate limitation on synthesis of periplasmic cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1045–1053.
- Croes, C., Moens, S., van Bastelaere, E., Vanderleyden, J., and Michiels, K. 1993. The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 2261–2269.
- Dazzo, F.B., Truchet, G., Hollingsworth, R., Hrabak, E., Pankratz, H., Phillip-Hollingsworth, S., Salzwedel, J., Chapman, K., Appenzeller, L., Squartini, A., Gerhold, D., and Orgambide, G. 1991. *Rhizobium* lipopolysaccharide modulates infection thread development in white clover root hairs. *J. Bacteriol.* **173**: 5371–5384.
- Del Gallo, M., Negi, M., and Neyra, C. 1989. Calcofluor- and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* **172**: 3504–3510.
- De Mot, R., and Vanderleyden, J. 1989. Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* **35**: 960–967.
- Dische, Z. 1962. General color reactions. *Methods Carbohydr. Chem.* **1**: 478–492.
- Ferro-Luzzi Ames, G., Prody, C., and Kustu, S. 1984. Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* **160**: 1181–1183.
- Forst, S.A., and Inouye, M. 1988. Environmentally regulated gene expression for membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Cell Biol.* **4**: 21–42.
- Gafny, R., Okon, Y., Kapulnik, Y., and Fischer, M. 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 69–75.
- Graham, P. 1991. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475–484.
- Jofré, E., Mori, G., Castro, S., Fabra, A., Rivarola, V., and Balegno, H. 1996. 2,4-Dichlorophenoxyacetic affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize roots. *Toxicology*, **107**: 9–15.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)*, **227**: 680–685.
- Lloret, J., Bolaños, L., Mercedes Lucas, M., Peart, J.M., Brewin, N., Defonso Bonilla, H., and Rivilla, R. 1995. Ionic stress and osmotic pressure induce different alterations in the lipopolysaccharide of a *Rhizobium meliloti* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3701–3704.
- Lüderitz, O., Freudenberg, M., Galanos, C., Lehmann, V., Rietschel, E., and Shaw, D. 1982. Lipopolysaccharides of Gram-negative bacteria. Current topics in membranes and transport. Vol. 17. Academic Press, New York.
- Madi, L., and Henis, Y. 1989. Aggregation in *Azospirillum brasilense* Cd: conditions and factors involved in cell-to-cell adhesion. *Plant Soil*, **115**: 89–98.
- Michiels, K., Verreth, C., and Vanderleyden, J. 1990. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide mutants that are affected in flocculation. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 705–711.
- Michiels, K.W., Croes, C., and Vanderleyden, J. 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microb.* **137**: 2241–2246.
- Puvanesarajab, V., Schell, F., Stacey, G., Douglas, C., and Nester, E. 1985. Role for 2 linked  $\beta$ -glucans in the virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* **164**: 102–110.
- Schlöter, M., Moens, S., Croes, C., Reidel, G., Esquenet, M., De Mot, R., Harunann, A., and Michiels, K. 1994. Characterization of cell surface components of *Azospirillum brasilense* Sp7 as antigenic determinants for strain-specific monoclonal antibodies. *Microbiology (Reading, U.K.)*, **140**: 823–828.
- Skorupska, A., Derylo, M., and Lorkiewicz, Z. 1985. Role of non-carbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Arch. Microbiol.* **1**–3: 307–310.
- Tsai, C.M., and Frash, C. 1982. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **119**: 115–119.
- Valverde, C., Hozbor, D., and Lagares, A. 1997. Rapid preparation of affinity-purified lipopolysaccharide samples for electrophoretic analysis. *Biotechniques*, **22**: 230–236.
- Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. 1995. Review: genetics of the *Azospirillum*-plant root association. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **14**(5): 445–466.
- Vande Broek, A., Michiels, J., Van Gool, A., and Vanderleyden, J. 1993. Spatial-temporal colonization patterns of *Azospirillum brasilense* on the wheat root surface and expression of the bacterial *nifH* gene during association. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**(5): 592–600.





## Response of *Azospirillum brasilense* Cd to Sodium Chloride Stress

Viviana Rivarola\*, Stella Castro, Gladys Mori, Edgardo Jofré, Adriana Fabra, Rosana Garnica & Héctor Balegno

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5800-Río Cuarto-Córdoba, Argentina (\* author for correspondence: email: vrivarola@exa.unrc.edu.ar)

Received 9 September 1997; accepted 10 March 1998

**Key words:** *Azospirillum*, bacteria, glucans, glutamate, K<sup>+</sup>, PGPR, polyamines, saline stress

### Abstract

Growth of *Azospirillum brasilense* Cd in the presence of different NaCl concentrations showed that it tolerates up to 200 mM NaCl in the medium, without appreciable decline in growth rate. At 300 mM NaCl, a decrease of 66% in growth was observed at 24 h of culture. At 48 h of culture, bacteria in the presence of 300 mM NaCl reached the maximum optical density value that was attained at 12 h by control cultures. This investigation was designed to elucidate the effect of saline stress on *Azospirillum brasilense* Cd and the physiologic mechanism involved in its possible salinity tolerance. For this reason, studies of other osmolytes, as well as of putrescine metabolism and protein patterns were done with bacteria grown with this NaCl concentration in the medium, at 24 and at 48 hours. *A. brasilense* responded to saline stress elevating the intracellular concentration of glutamate at 24 h, and of K<sup>+</sup> at 48 h. Glucan pattern, putrescine metabolism, and total and periplasmic protein patterns of the treated group showed several changes with respect to the control. In spite of the several cellular functions affected by saline stress, the results imply that *A. brasilense* Cd shows salinity tolerance in these experimental conditions.

### Introduction

The genus *Azospirillum* comprises free-living N<sub>2</sub> fixing rhizosphere bacteria belonging to a group that exerts beneficial effects on plant growth, namely the plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Because of these properties, numerous studies on *Azospirillum* ecology, physiology, and biochemistry have been carried out during the past 15 years (Vande Broek & Vanderleyden, 1995). However, despite these studies and the enormous evidence concerning *Azospirillum* stimulation of plant development, little attention has been paid to the effect of noxious environmental agents on these bacteria, such as herbicides and soil infertility conditions. Previous studies in our laboratory demonstrated that the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) (1 mM) interferes with the growth and activity of *Azospirillum brasilense* Cd in pure culture (Rivarola et al., 1992; Fabra et al. 1993; Mori et al., 1995; Castro et al., 1996). We also demonstrated that 2,4-D, at the concentrations used

on crops, directly alters *Azospirillum brasilense* Cd attachment to roots (Jofré et al., 1996).

We have recently focused our attention on the fact that, in Latin America, the land affected by salt ranges from 400 to 950 million ha (Graham, 1991). It was therefore considered of interest to study the effect of saline stress on *Azospirillum brasilense* Cd. Most bacteria have developed flexible modes of adaptation and osmoadaptation strategies include the accumulation of organic osmolytes, which can become the crucial factor for the stability of enzymes and other cellular components (Galinski, 1993). In this sense, Miller and Wood (1996) proposed that proline and glycine betaine act as osmoprotectants in *Azospirillum brasilense*, but as far as we know, no studies have been done in order to find out if other molecules are related to osmotolerance in this bacterium. Thus, this investigation was designed to study the role of other possible osmolytes in *Azospirillum brasilense* Cd and the physiologic mechanism involved in its possible salinity

tolerance, looking for its potential use in these soil infertility conditions.

## Materials and methods

### Chemicals

Most of the chemicals were obtained from Sigma Chemicals (St. Louis, MO), while [1,4-<sup>14</sup>C]putrescine dihydrochloride (117 mCi/mmol) and L-[1-<sup>14</sup>C]-ornithine (52.6 mCi/mmol) were purchased from New England Nuclear (Boston, MA).

### Bacterial strain and growth conditions

The strain used in this study was *Azospirillum brasilense* Cd (ATCC 29710) it was routinely maintained in solid medium, containing NH<sub>4</sub>Cl 2.5 g l<sup>-1</sup>, malic acid 5 g l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g l<sup>-1</sup>, NaCl 0.1 g l<sup>-1</sup>, FeEDTA 0.066 g l<sup>-1</sup>, KOH 4.5 g l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 0.02 g l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.4 mg l<sup>-1</sup>, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.47 mg l<sup>-1</sup>, biotin 10 μg l<sup>-1</sup>, pyridoxal 20 μg l<sup>-1</sup> and agar 15 g l<sup>-1</sup>. Cultures were transferred monthly and stored at 4 °C. The same broth medium was used in all the experiments. Cultures were grown at 32 ± 2 °C in a rotatory shaker at 100 rpm. The osmolarity of the medium was increased by the addition of NaCl to the final concentrations of 100, 200, 300, 400 and 500 mM. The osmotic pressure of the different media was measured with a Vapor Pressure osmometer [Wescor (model 5500 C), Logan, Utah]. Bacterial growth was monitored spectrophotometrically at 620 nm.

In one experiment, 1 mM putrescine was also added to the treated medium at the start of incubation. In another experiment, polyethylene glycol (PEG) 8000 (30 mM) was used instead of NaCl. No changes of pH were detected after supplementation.

All the subsequent determinations and assays were carried out with control (1.7 mM NaCl) and 300 mM NaCl treated cultures grown for 24 and 48 hours. After centrifugation, cells were washed twice in the corresponding culture medium (either control or treated, in order to maintain the osmolarity).

### Protein determination

Protein concentration was determined by the method of Bradford (1976), using bovine serum albumin as standard.

### Determination of intracellular potassium levels

Cultures were assayed for potassium concentration using the procedure outlined by Bernard et al. (1993). Cell pellets were suspended in 0.1 M perchloric acid for 24 h. K<sup>+</sup> levels were determined using a Tecnolab-T410 Model Ion Analyzer.

### Glucan determination

To isolate glucans, cell pellets were extracted with 75% ethanol at 70 °C for 30 min (5) (Breedveld et al., 1995). After centrifugation, the alcoholic supernatant was concentrated under vacuum and the residue dissolved in water. Quantitative determination was carried out by the anthrone method (Dische, 1962). Aliquots containing 5 μg of glucans were spotted onto TLC plates (Silica gel G 60, Sigma) and chromatographed with ethanol-butanol-water (5:5:4, v/v). For visualization of the different bands, the TLC plates were sprayed with 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in methanol and heated at 120 °C for 10 min.

### Determination of L-glutamate

L-glutamate was determined with glutamic acid dehydrogenase, as described by Bernt and Bergmeyer (1965). Cell pellets were treated with 4 parts by weight of 0.6 M perchloric acid and centrifuged for 10 min at 3,000 g. The supernatants were adjusted to pH 9 with 2 M phosphate solution (K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> and K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 12), allowed to stand for 10 min in an ice bath and then filtered. After 10 min at room temperature, the filtrates were analysed. The assay contained: 1 ml 0.5 M glycine-0.4 M hydrazine buffer (pH 9), 67 μl of the filtrate, 67 μl 0.03 M diphosphopyridine nucleotide, and 17 μl of a glutamic acid dehydrogenase solution containing 10 mg protein/ml. Absorbance was measured at 366 nm, and results expressed as nmoles L-glutamate/mg protein.

### Polyamine transport assay

This assay was done following the method of Tkanchenko and Chudinov (1994), modified as follows: cultures were centrifuged and the cells washed with transport assay solution [0.15 mM NaCl and 50 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.4 (PBS)] and resuspended in 1 ml of the same solution. Polyamine uptake was initiated in cells incubated at 37 °C by the addition of [<sup>14</sup>C]putrescine (4 μCi/μmol). After 60 min of incubation, an aliquot of 100 μl was centrifuged, washed

and the putrescine influx measured in the cellular pellet. To the rest of the cell suspension, 1 ml PBS was added, the preparation was then centrifuged and the pellet suspended in 1 ml PBS, incubated for 10 min at 37 °C and again centrifuged. The radioactivity in the supernatant was measured to determine putrescine efflux. The scintillation liquid used contained 0.2 g of (1,4-bis [5 - phenyl - 2 - oxazolyl] benzene; 2, 2'-p - phenylene - bis [5 - p - phenyloxazole]) and 4 g of 2,5 - diphenyloxazole/litre of triton X-100/toluene (1:3, v/v).

#### *Polyamine determination*

Polyamine content in the cells was determined following Smith and Best (1977). Bacteria were lysed by grinding the cellular pellets (1.5 g) with alumina (2 g/g of wet cells) in a mortar for 5 min. The lysates were suspended in PBS and centrifuged at  $3,500 \times g$  for 15 min. Proteins were precipitated with 50% trichloroacetic acid and removed by centrifugation at  $420 \times g$ . The resulting supernatants were neutralized with sodium bicarbonate and kept in darkness for 16 h after the addition of 0.2 ml dansyl chloride solution (30 mg/ml); 0.1 ml of a proline solution containing 1.5 mg/ml was added to each sample in order to remove the excess of dansyl chloride; after 30 min at room temperature, the sample was dried with a current of warm air. The dry residue was dissolved in water: toluene (1:2, v/v) and, after mixing for a few minutes, the sample was centrifuged. The toluene layer was separated, a fraction of it placed on a TLC plate (Silica gel G 60, Sigma) and chromatographed using chloroform:triethylamine (5:1, v/v). Polyamine locations were detected by means of UV light, extracted with acetone and the concentration determined with a spectrofluorometer (excitation 359 nm and emission 500 nm). The results were compared with dansylated polyamine standards.

#### *Ornithine decarboxylase activity determination*

Ornithine decarboxylase activity was determined by measuring the  $^{14}\text{CO}_2$  released from L-[1- $^{14}\text{C}$ ]ornithine (Noguchi et al., 1976). Bacteria were lysed as described above. The mixtures were suspended in 1 ml of 0.1 mM Tris buffer (pH 7.4) containing 0.5 mM pyridoxal phosphate and 25 mM dithiothreitol and centrifuged at  $3,600 \times g$  for 15 min. The supernatants (containing 250  $\mu\text{g}$  of protein) were used for the enzyme determination after the addition of 50  $\mu\text{l}$  of the substrate mixture containing

0.4  $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$  L-[1- $^{14}\text{C}$ ]ornithine. These tubes, with a final volume of 350  $\mu\text{l}$ , were placed in vials containing a piece of filter paper with 10% KOH and tightly stoppered. The vials were then incubated at 37° for 1 h. The enzymatic reaction was stopped by injecting 0.2 ml of 0.3 N HCl into the tube. The radioactivity was measured in the KOH after the addition of 5 ml of scintillation liquid. Enzyme activity was expressed as nmol  $\text{CO}_2$  released / mg protein / h.

#### *Protein gel electrophoresis*

Total bacterial proteins were extracted as described by De Mot and Vanderleyden (1989).

Periplasmic proteins were released following the method of Ferro-Luzzi Ames et al. (1984). Briefly, control and treated cells from 24 and 48 h cultures were collected by centrifugation for 10 min at  $1,100 \times g$ . The supernatant was decanted thoroughly to avoid resuspension of the cells. The pellet was resuspended in the residual medium and 20  $\mu\text{l}$  of  $\text{CHCl}_3$  was added. After vortexing, the tubes were maintained at room temperature for 15 min, and then 0.2 ml of 0.01 M Tris hydrochloride (pH 8.0) was added. Cells were separated by centrifugation at  $6,000 \times g$  for 20 min, and the supernatant fraction containing the periplasmic proteins withdrawn with a Pasteur pipette.

Total and periplasmic proteins were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), following the technique of Laemmli (1970).

#### *Statistical analysis*

Experimental differences were compared either by the Student *t*-test or the ANOVA test at the 0.05 significance level.

## **Results and discussion**

#### *Effect of NaCl concentration on growth of Azospirillum brasilense Cd (ATCC 29710)*

Growth of the bacteria in the presence of different NaCl concentrations showed that the strain could tolerate, without appreciable decline in the growth, up to 200 mM NaCl in the medium. However, as shown by Figure 1, at 300 mM NaCl (osmolarity: -1.21 MPa), there was a 66% decrease in the growth rate at 24 h of culture (exponential phase), though growth reached the control maximum at 48 h (stationary phase). At

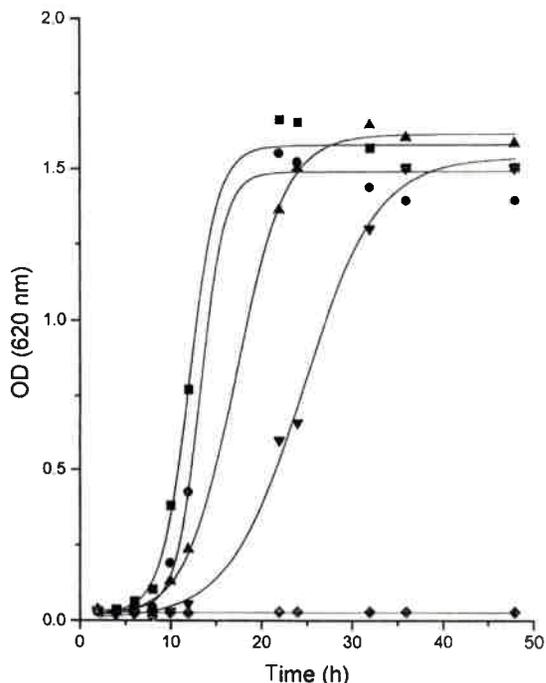


Figure 1. Effect of NaCl on growth of *Azospirillum brasilense*. Growth was measured by the increase in absorbance at 620 nm. Control (■); plus 100 mM NaCl (●); plus 200 mM NaCl (▲); plus 300 mM NaCl (▼); plus 400 mM NaCl (◆).

higher concentrations of NaCl total growth inhibition was seen (Figure 1).

Because of these results, we decided to carry out the subsequent analysis with 300 mM NaCl concentration, at two times: 24 and 48 hours. On the other hand, Douka et al. (1983) reported the salinity of the soil for different depths, corresponding the concentration of 300 mM to approximately 67 cm.

To test whether the effect observed in the growth was due to the osmotic stress produced by high salt concentrations or to an ionic effect, growth was analysed in the presence of PEG 8000 (30 mM; osmolarity: -1,21 MPa) instead of NaCl. PEG is a non-ionic, nonmetabolizable osmoticum which has been frequently used in osmotic stress experiments. The results obtained were similar to those observed in the presence of 300 mM NaCl indicating that the growth decrease effect was purely osmotic and not the result of specific ions present at high concentrations.

#### Analysis of glutamate, potassium and glucans

Measures (1975) observed that Gram-negative organisms such as *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Escherichia*

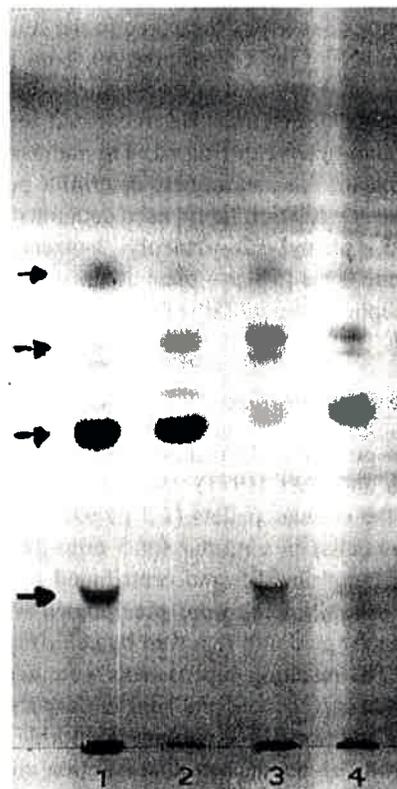


Figure 2. TLC of glucans isolated from *Azospirillum brasilense* Cd grown in control medium for 24 h (lane 1); in treated medium (added with 300 mM NaCl) for 24 h (lane 2); in control medium for 48 h (lane 3) and in treated medium for 48 h (lane 4). Arrows indicate the main alterations observed in the pattern of the treated groups.

and *Klebsiella*, when subjected to high salinity in the medium, responded by elevating the intracellular pools of amino acids, especially glutamate. It has also been pointed out that elevated levels of salinity present an environment low in water potential, and the net effect of this osmotic stress is to remove water from the cell's interior, leading to an increase in the intracellular  $K^+$  concentration (Measures, 1975). In our study, we demonstrate that in *Azospirillum brasilense* Cd, glutamate was increased by approximately 600% at 24 h in the stressed bacteria, but at 48 h there were no differences between control and stressed bacteria. An increase of the intracellular  $K^+$  and glucan contents was observed at 48 h in the treated group (Table 1), while the glucan pattern was altered at both times studied (Figure 2).

It can be assumed that glutamate acts as an osmolyte in the exponential phase of the growth curve, while  $K^+$  and glucans, appear to accumulate later, in the stationary phase, maintaining in this manner the

Table 1. Effect of 300 mM sodium chloride on glutamate, potassium and glucan contents in *Azospirillum brasilense* Cd

Growth	Conditions	Glutamate nmoles/mg.protein	Potassium nmoles/mg dry cell wt	Glucans $\mu\text{g/mg protein}$
24 h	C	7.9 $\pm$ 1.1	203.7 $\pm$ 50	110.4 $\pm$ 15.6
	T	52.7 $\pm$ 13.7*	156.9 $\pm$ 30	93.8 $\pm$ 12.9
48 h	C	3.5 $\pm$ 0.7	210 $\pm$ 14	28.5 $\pm$ 10.1
	T	3.6 $\pm$ 0.9	934 $\pm$ 32**	254.3 $\pm$ 41**

C: control; T: 300 mM NaCl. Cultures were grown with (T) and without NaCl (C) for 24 and 48 h. The treated group shows a decrease of 66% in the growth at 24 h of culture, attaining control values at 48 h. Data are means  $\pm$  S.E. of 3-6 determinations. \*  $p < 0.005$ ; \*\*  $p < 0.0005$ .

Table 2. ODC activity, and putrescine transport and content in *Azospirillum brasilense* grown in 300 mM NaCl

Growth	Conditions	ODC activity nmol $^{14}\text{CO}_2$ / mg protein/h	Putrescine uptake nmoles/mg protein	Putrescine efflux nmoles/mg protein	Putrescine content $\mu\text{g/g pellet}$
24 h	C	70.8 $\pm$ 18.3	14.2 $\pm$ 6.8	4.77 $\pm$ 1.4	283.7 $\pm$ 8.0
	T	14.1 $\pm$ 2.6	40.3 $\pm$ 23.5**	1.07 $\pm$ 0.2**	94.1 $\pm$ 3.6**
48 h	C	37.4 $\pm$ 8.5	2.2 $\pm$ 1.2	4.36 $\pm$ 2.5	140.0 $\pm$ 2.0
	T	8.0 $\pm$ 3.3*	54.3 $\pm$ 22.8***	1.07 $\pm$ 0.2**	109.2 $\pm$ 8.1*

C: control; T: 300 mM NaCl. Cultures were grown with (T) and without (C) NaCl for 24 and 48 h. Data are means  $\pm$  S.E. of 3-6 determinations. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.005$ ; \*\*\*  $p < 0.0005$ .

cellular turgor and allowing the bacteria to adapt to the saline conditions.

#### Polyamine studies

Several studies have demonstrated variations of the polyamine content in bacteria subjected to different kinds of stress. In this regard, an increase of these amines has been found in halophile bacteria (Tabor & Tabor, 1985). Other authors (Tkanchenko & Chudinov, 1994) suggested that in *E. coli* osmotic stress produces a decrease in the intracellular concentration of putrescine due to its efflux into the medium. Under our experimental system, the ornithine decarboxylase (ODC) activity was inhibited by 80% in both 24 and 48 h treated cultures; this enzyme is the first in the metabolic pathway of the polyamines leading to the production of putrescine. Thus, the diminution in the putrescine content, the higher the uptake of this amine; the minor efflux is correlated with the inhibition of ODC activity in treated culture (Table 2).

Rivarola et al. (1992) demonstrated that polyamines could reverse the growth inhibitory effects pro-

duced by some chemical stress agents such as 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Therefore, an experiment was designed to grow the bacteria in medium supplemented with 300 mM NaCl plus 1 mM putrescine. Under these conditions, the inhibition was not reversed, indicating that putrescine does not act as an osmoprotectant.

In *E. coli*, Tkanchenko and Chudinov (1994) demonstrated the existence of a  $\text{K}^+$ /putrescine antiport mechanism where the increase of intracellular  $\text{K}^+$  is accompanied by a decline of putrescine in the cells and its increase in the environment. In *A. brasilense*, the putrescine efflux was not increased, suggesting that in this case the antiport mechanism was not activated.

On the other hand, Fujihara and Yoneyama (1993) found that in *Rhizobium fredii* and *Bradyrhizobium japonicum* homospermidine could maintain the intracellular pH and repair the imbalance caused by osmotic stress. We did not find this amine in *Azospirillum brasilense*, neither in the control nor in the treated cells.

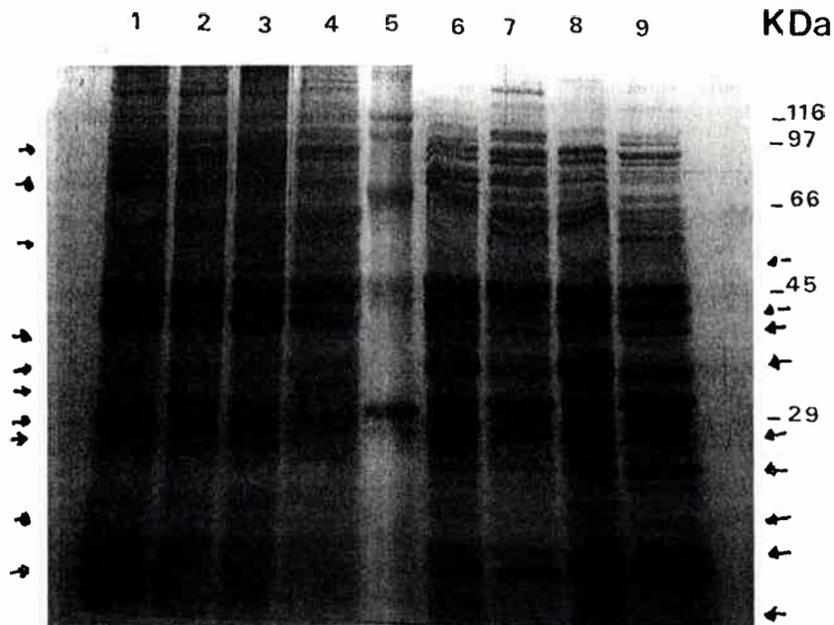


Figure 3. Electrophoretogram of total (lanes 1 to 4) and periplasmic proteins (lanes 6 to 9) from *Azospirillum brasilense* Cd grown for 24 h in control medium (lanes 1 and 6) and in 300 mM treated medium (lanes 2 and 7); for 48 h in control medium (lanes 3 and 8) and in treated medium (4 and 9). Lane 5: molecular weight standards. Arrows indicate some of the alterations observed in the pattern of the treated groups.

### Protein profiles

The analysis of total protein profiles (Figure 3) demonstrates several changes in the 24 h treated group (lane 2) with respect to the control (lane 1); for example, the 14 kDa protein had disappeared, while the 23 kDa was evidently diminished. On the other hand, bands 6, 31, 34, 66, 82 and 165 kDa were more pronounced, while the 56 kDa band appeared as a diffused doublet in the control, and as a single and well defined band in the treated group. Finally, the 25 kDa band appeared only in the latter group. After 48 h of culture, the treated group still displayed some alterations in its protein pattern (lane 4). Thus, the 23 kDa band was diminished, while the 31 and 34 kDa were increased, and the 56 kDa presented the same appearance as at 24 h. Except for these changes, the 48 h treated group pattern was similar to that of the 24 h control. This observation appears to be related to the growth performance.

With respect to periplasmic proteins, figure 3 shows that in the treated group (lane 7) there are many differences with regard to the control (lane 6), involving mostly low molecular weight proteins; for example, at 24 h, bands 2, 11, 14, 15, 17, 22, 25, 27, 35, 37, 39, and 42 kDa were diminished, while the 41

kDa band was increased. At 48 h, the treated group pattern remained similar, except that bands 14 and 22 appeared normal (lane 9).

The protein analysis was carried out as a preliminary study to determine if saline stress induces in *A. brasilense* changes in the pattern that could be related with saline tolerance acquisition. In this sense, it is indeed necessary to optimize protein separation with a bidimensional polyacrylamide electrophoresis, and to focus attention on specific osmotic stress induced proteins.

Furthermore, periplasmic proteins are possibly involved in the *A. brasilense*-root interaction (De Mot & Vanderleyden, 1989). The changes observed in these patterns could be indicating some interference in that process. Even glucans, which are also altered in these conditions, play a key role in bacteria-plant interaction in most species of the family *Rhizobiaceae*. Thus, we are studying the mechanism of adsorption and anchoring of control and treated bacteria to maize and wheat.

In conclusion, saline stress seems to affect several cellular functions of *Azospirillum brasilense* Cd. This can be seen in the protein profiles, as well as in the enzymatic activities studied. These bacteria tolerated up

to 300 mM NaCl, reaching the normal growth values at 48 h of culture. Glutamate, K<sup>+</sup> and glucans are acting as osmolytes in these conditions. Further studies are being carried out to elucidate the genetic mechanisms involved in this response and to study the effect of the saline stress on the bacteria-plant interaction.

### Acknowledgments

This work was supported by the Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), the Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de Córdoba (CONICOR) and the Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto, ARGENTINA.

### References

- Bernard T, Jebbar M, Rassouli R, Himdi-Kabbab S, Hamelin J & Blanco C (1993) Ectoine accumulation and osmotic regulation in *Brevibacterium linens*. *J. Gen. Microbiol.* 139: 129–136
- Bernt E & Bergmeyer HU (1965) L Glutamate-determination with glutamic dehydrogenase. *In: Bergmeyer HU (Ed) Methods of Enzymatic Analysis*. pp 384–388. Verlag Chem Academic Press
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248–254
- Breedveld MW, Benesi AJ, Marco ML & Miller KJ (1995) Effects of phosphate limitation on synthesis of periplasmic cyclic  $\beta$ -(1,2)-glucans. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1045–1053
- Castro S, Fabra A, Mori G, Rivarola V, Giordano W & Balegno H (1996) Characterization of 2,4-D transport and its relationship with polyamines in *Azospirillum brasilense* Cd. *Toxicology Letters* 84: 33–36
- De Mot R & Vanderleyden J (1989) Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.* 35: 960–967
- Dische Z (1962) General color reactions. *Methods Carbohydr. Chem.* 1: 478–492
- Douka CE, Xenoulis AC & Paradellis T (1983) Salinity tolerance of a *Rhizobium meliloti* strain isolated from salt affected soils. *Folia Microbiol.* 9: 316–324
- Fabra A, Giordano W, Rivarola V, Mori G, Castro S & Balegno H (1993) The interaction of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, ribosomes and polyamines in *Azospirillum brasilense*. *Toxicology* 83: 19–29
- Ferro-Luzzi AG, Prody C & Kustu S (1984) Simple, rapid, and quantitative release of periplasmic proteins by chloroform. *J. Bacteriol.* 160: 1181–1183
- Fujihara S & Yoneyama T (1993) Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P 220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1104–1109
- Galinski EA (1993) Compatible solutes of halophilic eubacteria: molecular principles, water-solute interaction, stress protection. *Experientia* 49: 487–496
- Graham P (1991) Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* 38: 475–484
- Jofré I, Mori G, Castro S, Fabra A, Rivarola V & Balegno H (1996) 2,4-Dichlorophenoxyacetic affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize roots. *Toxicology* 107: 9–15
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227: 680–685
- Measures JC (1975) Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature (Lond)*. 257: 398–400
- Miller K & Wood J (1996) Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 101–136
- Mori G, Fabra A, Castro S, Rivarola V, Giordano W & Balegno H (1995) Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on polyamine transport and metabolism in *Azospirillum brasilense* Cd. *Toxicology* 98: 23–26
- Noguchi T, Kashigawa A & Tanaka T (1976) Changes in ornithine decarboxylase activity in normal tissues of tumor-bearing mice during tumor growth. *J. Biochem. (Tokyo)* 79: 451–454
- Rivarola V, Fabra A, Mori G & Balegno H (1992) In vitro protein synthesis is affected by the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in *Azospirillum brasilense*. *Toxicology* 73: 71–79
- Smith T & Best G (1977) Polyamines in barley seedlings. *Phytochem.* 16: 841–843
- Tabor CW & Tabor H (1985) Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 49: 81–89
- Tkanchenko A & Chudinov A (1994) Participation of putrescine in the antiport mechanism of potassium transport in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 28: 81–83
- Vande Broek A & Vanderleyden J (1995) Review: genetics of the *Azospirillum* – Plant root association. *Critical Reviews in Plant Sciences* 14: 445–466

# Differential gene expression in *Azospirillum brasilense* Cd under saline stress

Edgardo Jofré, Viviana Rivarola, Héctor Balegno, and Gladys Mori

**Abstract:** Previous studies in our laboratory demonstrated that the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots was altered when the bacteria were grown under saline stress. The aim of this work was to analyze the interaction when either the plant or both components were exposed to saline conditions. We demonstrated that this stress altered the early stages of development, in this plant model, leading to an inadequate colonization. The effect of saline stress on the expression of *A. brasilense* N<sub>2</sub> fixation gene promoters was also studied. While *nifA* expression was increased in stressed bacteria, *nifH* transcription was diminished, suggesting an alteration in the NifA activation process. The induction of the *nif* gene transcription by root exudates was investigated, and the results suggest that they could be modulating certain bacterial processes, such as nitrogen fixation. However, stressed bacteria did not respond to the exudate's action. This could be related to the modified membrane composition resulting from changes in proteins, glucans, and capsular, exo- and lipopolysaccharides. We conclude that saline stress alters the *Azospirillum brasilense* Cd – maize interaction, the normal colonization, and the nitrogen fixation process.

**Key words:** *Azospirillum brasilense*, saline stress, *Azospirillum*–root interaction, exudates, *nif* genes.

**Résumé :** Des études faites dans notre laboratoire ont déjà démontré que l'adhérence d'*Azospirillum brasilense* Cd aux racines du maïs et du blé se trouvait modifiée lorsque les bactéries étaient cultivées dans des conditions salines stressantes. Le but de la présente étude était d'évaluer cette interaction lorsque la plante ou les deux composés étaient soumis à des conditions salines. Dans ce modèle plante–bactérie, nous avons démontré que ce stress par le sel altérait les premiers stades du développement entraînant ainsi une colonisation inadéquate. Nous avons aussi étudié l'impact d'un stress salin sur l'expression des gènes promoteurs de la fixation de N<sub>2</sub> chez *A. brasilense*. Même si l'expression du *nifA* augmentait chez les bactéries stressées, la transcription du *nifH* diminuait probablement à cause d'un changement dans le processus d'activation du NifA. Nous avons investigué l'induction de la transcription du gène *nif* par des exudats racinaires et ils se sont révélés capables de moduler certains processus bactériens comme la fixation de l'azote. Par contre des bactéries stressées ne répondaient pas à cette stimulation par un exudat et nous croyons que cela pourrait être relié à des modifications de la composition de la membrane reliées à des changements au niveau des protéines, des glucanes et des exo- et lipopolysaccharides capsulaires. Nous en concluons qu'un stress salin altère l'interaction *Azospirillum brasilense* Cd – maïs, la colonisation normale et le processus de fixation de l'azote.

**Mots clés :** *Azospirillum brasilense*, stress salin, interaction *Azospirillum*–racines, exudats, gènes *nif*.

[Traduit par la Rédaction]

## Introduction

Bacteria of the genus *Azospirillum* exert beneficial effects on plant growth, increasing the yield of many important crops (Okon and Labandera-González 1994). *Azospirillum* spp. fix nitrogen under microaerobic conditions in the absence of ammonia (Elmerich et al. 1997), but positive effects of bacterial inoculation are mainly attributed to

improved root development and the subsequent increase in the rate of water and mineral uptake (Okon and Kapulnik 1986). Available evidence indicates that excretion of plant growth-promoting substances by bacteria is at least partly responsible for these effects (Bothe et al. 1992; Fallik et al. 1994; Vande Broek and Vanderleyden 1995; Burdman et al. 1997).

Salinity is one of the most important problems in agriculture. There are saline soils in both humid and arid climates (Reggiani et al. 1994). In Latin America, salt-stressed agricultural land ranges from 400 to 950 million ha (Graham 1991). Previous studies in our laboratory demonstrated that the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize and wheat roots was altered when the bacteria were grown under saline stress (300 mM NaCl) (Jofré et al. 1998). The mechanism of the alteration in the adsorption phase of attachment appeared to be related to the disappearance of a 100-kDa external membrane protein of the bacteria, while the diminished efficiency in the anchoring phase of attachment appeared to be related to a modification in their polysaccharide composition (Jofré et al. 1998). In those

Received February 18, 1998. Revision received June 26, 1998.  
Accepted June 29, 1998.

E. Jofré, V. Rivarola, H. Balegno, and G. Mori.<sup>1</sup> Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, 5800. Río Cuarto, Córdoba, Argentina.

<sup>1</sup> Author to whom all correspondence should be sent at the following address: Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales, Universidad Nacional de Río Cuarto, Agencia Postal N° 3, 5800. Río Cuarto, Córdoba, Argentina. (e-mail: gmori@exa.unrc.edu.ar).

studies, plants were grown in control medium and the attachment steps were studied by labelling the bacteria with methyl [<sup>3</sup>H]thymidine and measuring the remaining radioactivity on the root after 2 and 12 h.

The objective of the present research was to analyze the *Azospirillum*-maize association when either the plant or both components were exposed to saline stress. The colonization and the attachment were studied by utilizing the fusion of the reporter gene *lacZ* ( $\beta$ -galactosidase) with the  $N_2$ -fixation gene promoter *nifA* (Liang et al. 1991; Arsène et al. 1994; Katupitiya et al. 1995).

We also tested the effect of saline stress on the expression of the *A. brasilense*  $N_2$ -fixation gene promoters *nifH* and *nifA*. For this purpose, the model system developed by Arsène et al. (1994) was utilized since it provides an efficient tool to determine which steps are limiting in the expression of nitrogen-fixation genes. In addition, it has been demonstrated that *Azospirillum* spp. produce changes in root exudation (Volpin et al. 1996) and vice versa, that exudates can influence the gene expression in *Azospirillum* spp. (Van Bastelaere et al. 1993). Therefore, it was considered of interest to study the effect of saline stress on the induction of the transcription of *nifH* and *nifA* by root exudates.

## Materials and methods

### Bacterial strains and growth conditions

*Azospirillum brasilense* Cd (ATCC 29710) used in this study was kindly supplied by Dr. Johanna Döbereiner, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa, Brazil). Cells were maintained and restreaked every 3 weeks on fresh plates of Luria-Bertani medium, supplemented with 2.5 mM CaCl<sub>2</sub> and 2.5 mM MgSO<sub>4</sub> or on minimal lactate medium (MML) (Dreyfus et al. 1983).

Treated bacteria were grown in 300 mM NaCl because, at that saline concentration, there was a 66% decrease in the observed growth at 24 h of culture (logarithmic phase), although treated bacteria reached the control bacterium's maximum growth value at 48 h (stationary phase) (Jofré et al. 1998).

*Escherichia coli* S17.1, carrying the plasmids pAB576 (*nifA-lacZ*) and pAB358 (*nifH-lacZ*), was kindly supplied by Dr. Ivan Kennedy (University of Sydney, Sydney, Australia). *Escherichia coli* strains were grown in Luria-Bertani broth supplemented with tetracycline (5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>).

### Conjugation of reporter genes to *Azospirillum*

Conjugation was performed between *E. coli* S17.1 containing the plasmids and *A. brasilense* Cd (ATCC 29710) as described by Vanstockem et al. (1987). Transconjugants were selected on MML supplemented with tetracycline (5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>).

### $\beta$ -Galactosidase activity

The expression of the *lacZ* gene in transconjugants was measured as the hydrolysis of *o*-nitrophenyl- $\beta$ -galactosidase (Miller 1972; Katupitiya et al. 1995). The protein content of the samples was determined as described by Bradford (1976).

### Cultivation of maize seedlings and preparation of roots and root exudates

Seeds of *Zea mays* cv. "Funk's Tronador G422T" were surface sterilized and germinated as previously described (Jofré et al. 1996; Jofré et al. 1998). Individual seedlings growing from sterile seeds were aseptically transferred to cotton-plugged 200  $\times$  22 mm

glass tubes containing 30 mL of Marin-Prével-Charpentier-Lavigne (MPCL) medium (Lavigne 1987) alone (control plants) and supplemented with different concentrations of NaCl (100, 200, 250, and 300 mM). MPCL medium contains the following per litre: 1.64 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, 202 mg KNO<sub>3</sub>, 348 mg K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 480 mg MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 480 mg NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, 296 mg KCl, 408 mg KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.07 mg NaFe(III)EDTA, 34.4 mg H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 6.5 mg MnSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 8.5 mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 3.6 mg CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, and 1.8 mg Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. The tubes were placed in a growth chamber with a light intensity of 200 microeinsteins·m<sup>-2</sup>·sec<sup>-1</sup>, 16 h light : 8 h dark cycle, at a constant temperature of 23°C and a relative humidity of 80%. Once we determined the effect of the different NaCl concentrations on plant growth, we decided to carry out the subsequent analysis with 200 and 250 mM NaCl (treated plants). The growth medium was collected after 2 weeks, freeze dried, resuspended in distilled water at a 10-fold concentration, dialyzed, sterilized by filtration, and used as root exudates.

### Colonization of maize roots

Seeds were surface sterilized and germinated as above. Sterile seedlings were transferred to MPCL medium without nitrogen and supplemented with 0.1% fructose (control plants) and 200 or 250 mM NaCl (treated plants). After 1 week of growth, the hydroponic solution was inoculated with 1 mL of control or treated bacterial culture at OD<sub>600</sub> = 1 (approximately 5.9  $\times$  10<sup>6</sup> and 5.4  $\times$  10<sup>6</sup> cfu·mL<sup>-1</sup>, respectively) containing the *nifA-lacZ* fusion and grown in MML. Inoculum density was 6  $\times$  10<sup>6</sup> cfu per plant and 2  $\times$  10<sup>5</sup> cfu·mL<sup>-1</sup> of hydroponic solution.

Three weeks after inoculation, roots were taken from seedlings and stained using a modification of the protocol of Boivin et al. (1990) as described by Arsène et al. (1994). Roots were fixed in 1% glutaraldehyde solution and the  $\beta$ -galactosidase activity was revealed by staining with X-gal solution. After staining, specimens were washed twice in Z buffer (Miller 1972), followed by water, and examined. Uninoculated plant tubes were routinely included as controls.

Analyses were carried out with four plants per group, and any differences in the colonization patterns among the plants of each group were noted.

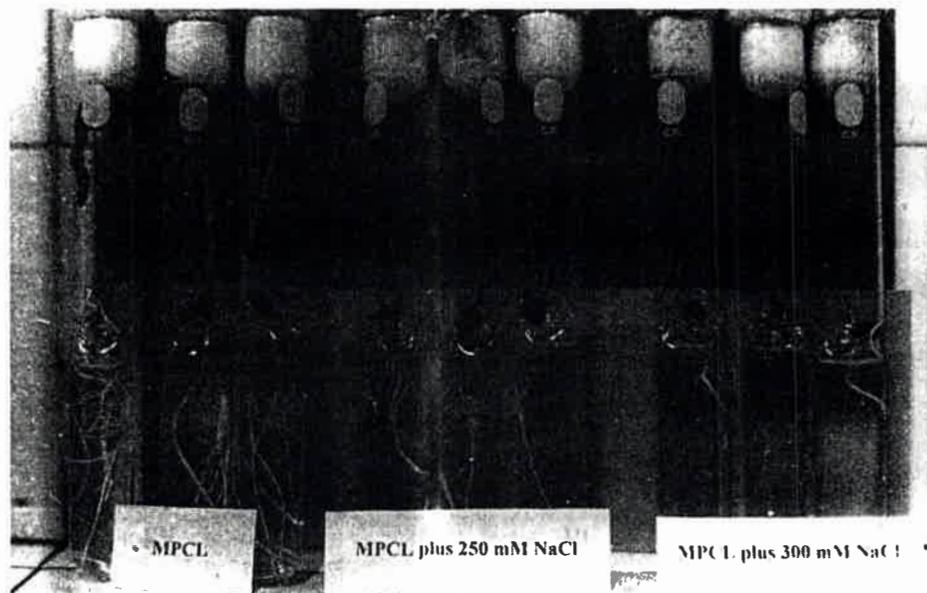
### Adsorption of bacteria to maize roots

A single colony of the transconjugants carrying *nifA-lacZ* from a fresh stock plate was inoculated into 10 mL MML supplemented with 5  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup> tetracycline (control bacteria) and 300 mM NaCl (treated bacteria). Cultures were grown aerobically in a rotatory shaker to an OD<sub>600</sub> of 1.0.

The entire root system from 15-day-old maize control plants and plants grown in 200 mM NaCl was cut and placed individually in sterile test tubes containing 9 mL of MPCL control medium or medium supplemented with 200 mM NaCl. An aliquot of 1 mL of the control or treated bacterial culture was added to the tubes containing a maize root (pH 7). The following three treatments were carried out: (i) control seedling, control bacteria, and control adsorption medium; (ii) treated seedling (200 mM NaCl), control bacteria, and control medium; (iii) treated seedling (200 mM NaCl), treated bacteria (300 mM NaCl), and treated medium (200 mM NaCl).

After a 2-h incubation in a rotatory shaker at 30°C and 50 rpm, the bacterial suspensions were decanted. Roots were ground in 2 mL of Z buffer devoid of  $\beta$ -mercaptoethanol, and the procedure described by Arsène et al. (1994) was followed to determine the  $\beta$ -galactosidase activity remaining on the roots. The total number of experiments was four, and each experiment was carried out with three or four roots per treatment.

Fig. 1. Six-day-old *Zea mays* seedlings growing in different concentrations of NaCl (0, 250, and 300 mM). Seedlings grown in 200 mM NaCl were similar to those grown in 250 mM NaCl.



#### Induction of the transcription of *nifH* and *nifA* in *A. brasilense* by maize root exudates

A single colony of the transconjugants carrying *nifA-lacZ* or *nifH-lacZ* from a fresh stock plate was inoculated into 10 mL MML supplemented with  $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  tetracycline (control bacteria) and 300 mM NaCl (treated bacteria). Cultures were grown aerobically in a rotatory shaker to an  $\text{OD}_{600}$  of 1.0, centrifuged and suspended as follows, for a total of six experimental groups: (i) control bacteria plus N-free MML; (ii) control bacteria plus control root exudate; (iii) control bacteria plus treated root exudate; (iv) treated bacteria plus N-free MML; (v) treated bacteria plus control root exudate; (vi) treated bacteria plus treated root exudate. After 4 h of incubation at  $30^\circ\text{C}$  and 150 rpm, the suspensions were centrifuged, Z buffer was added, and the activity of  $\beta$ -galactosidase was measured as above.

#### Statistical analysis

Each experiment was repeated at least four times. Results were analyzed using one-way ANOVA, with the means evaluated for significance using the least significant difference test at  $p \leq 0.01$  and  $p \leq 0.05$ .

## Results and discussion

#### Effect of saline stress on growth of *Zea mays* and root colonization

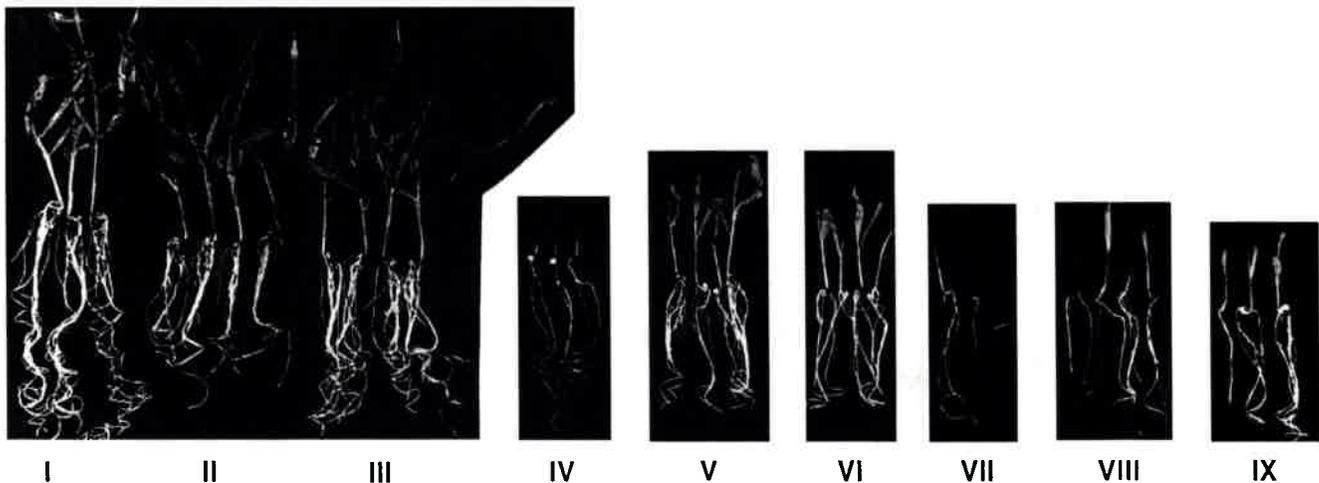
The main purpose of this experiment was to evaluate the effects of different concentrations of NaCl on the dynamics of *Zea* root growth, which is a controversial topic in the literature. For example, a review paper on whole plant response to salinity by Munns and Termaat (1986) stated that root growth is less affected than shoot growth by increasing salinity. In contrast, Shalhevet et al. (1995) concluded that soybean and maize-root elongation is more sensitive to salinity than shoot elongation. However, it is difficult to compare these conflicting results because of the different units utilized to define salinity; some researchers measure the os-

motric potential of the growth medium, others, the electrical conductivity. In our study, maize could tolerate up to 250 mM NaCl (osmolarity,  $-1.085 \text{ MPa}$ ). Figure 1 shows the development of six-day-old plants in MPCL medium. At 300 mM NaCl (osmolarity,  $-1.277 \text{ MPa}$ ), seedlings displayed very deficient shoot and root development without lateral roots and hence, a reduced possibility of interaction with bacteria. At 250 mM NaCl, although there was an evident difference in the growth with respect to control plants, the root expansion was already present, enhancing the possibility of bacterial colonization. Similar results were obtained with 200 mM NaCl, with even greater root expansion (Fig. 2-IV). In light of this finding, we decided to carry out the subsequent analysis with 200 and 250 mM NaCl concentrations in the plant medium.

Figure 2 shows the results of the inoculation of control and stressed plants with control and stressed bacteria. Uninoculated control seedlings presented normal root development but, when inoculated with either control bacteria (Fig. 2-II) or treated bacteria (Fig. 2-III), they exhibited a higher number of lateral roots, with an increase in the density and length of root hairs. As expected, inoculated treated plants grown either in 200 or 250 mM NaCl presented a better radical expansion than the uninoculated treated plants (Fig. 2-IV and VII). However, the difference is evident between the seedlings grown in 200 mM NaCl and those grown in 250 mM NaCl inoculated with control bacteria (Fig. 2-V and VIII) and also between this group (Fig. 2-V) and the one inoculated with treated *A. brasilense* (Fig. 2-VI), in the sense that there is a greater radical expansion in the group inoculated with control bacteria (Fig. 2-V). Fibrillar material stuck to the roots, mainly to the lateral ones, in all the inoculated samples.

It is worth mention that the number of *A. brasilense* Cd (ATCC 29710) grown in Luria-Bertani medium at an  $\text{OD}_{600}$  of 1.0 was  $1.4 \times 10^8$  bacteria $\cdot\text{mL}^{-1}$ , as determined by plating

**Fig. 2.** Maize seedlings grown in MPCL without nitrogen and supplemented with 0.1% fructose (I, II, and III) and 200 mM NaCl (IV, V, VI) or 250 mM NaCl (VII, VIII, IX). Uninoculated (I, IV, VII); 21 days after inoculation with control *Azospirillum brasilense* Cd (II, V, VIII); after inoculation with *Azospirillum brasilense* Cd grown in 300 mM NaCl (III, VI, IX). For details see Materials and methods.



(Jofré et al. 1998). In this study, the bacteria contained the *nifA-lacZ* fusion and were grown in MML. This may have caused the lower density of  $5.9 \times 10^6$  cfu·mL<sup>-1</sup>. However, the inoculation level used was  $10^5$  cfu·mL<sup>-1</sup>, which is the optimal bacterial level for influencing plant roots (Bashan, 1986).

Colonization was examined on the 21st day postinoculation. After staining, root-colonizing bacteria were detected as blue zones on the root surface (Fig. 3). Uninoculated roots remained white. In the control seedlings inoculated with either control or treated bacteria (Fig. 3-II and III), the colonization patterns were similar, with bacteria localized mainly in the upper parts of the root system. The staining was less intense and scattered in the 200-mM-treated seedlings inoculated with control bacteria (Fig. 3-V) and almost absent in the group inoculated with treated bacteria (Fig. 3-VI). The results with plants grown in 250 mM were similar.

Root colonization by *Azospirillum* spp. is perhaps the best described and well-known part of this plant-microbe interaction (Patriquin et al. 1983; Bashan and Levanony 1988; Bashan and Levanony 1989a; Bashan and Levanony 1989b; Levanony and Bashan 1989; Bashan et al. 1991). In this study, the rationale for the in situ detection of bacteria associated with corn roots under saline conditions was to have preliminary qualitative results; these are, later in this paper, related to a quantitative assay of  $\beta$ -galactosidase activity. Staining with X-gal, which becomes a blue colour when hydrolyzed by the enzyme  $\beta$ -galactosidase, readily enabled visualization of *Azospirillum* cells bearing the *lacZ* plasmid in the root system (Katupitiya et al. 1995). This technique provides a simple means of recognition of bacteria in situ. Nevertheless, owing to the limitation of the *lacZ* gene technology and the selected plant model, further colonization studies could be done using, for example, immunotechniques (Schloter et al. 1992) and salt-tolerant plants, like cowpea, sorghum, or a salt-tolerant corn cultivar.

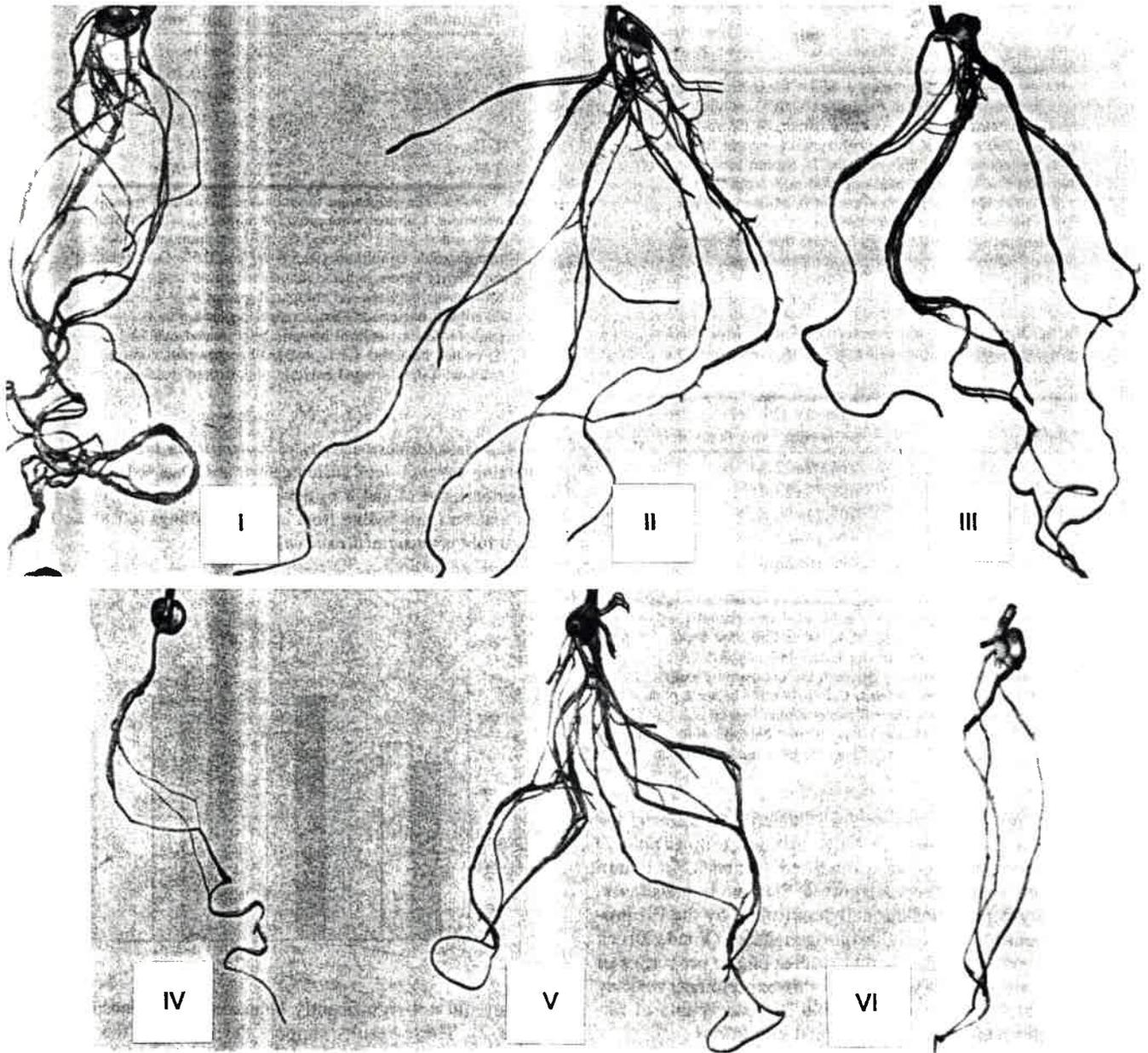
#### Adsorption and anchoring of *A. brasilense* Cd to maize roots of plants grown under saline stress

The extent of attachment of *A. brasilense* Cd to maize roots was estimated by the assay of  $\beta$ -galactosidase activity, which is correlated to the number of bacteria associated with the root system (Pereg et al. 1996). Table 1 shows that the bacterial adsorption was significantly diminished with respect to the control group (described in Materials and methods). We have previously demonstrated that bacteria grown under saline stress conditions failed to interact properly with control plant roots (Jofré et al. 1998). The present results demonstrated that saline stress not only altered the bacteria, but also affected the early stages of plant development, leading to an inadequate colonization. Even when the studies of adsorption were carried out with control bacteria in a control medium, the interaction was impaired; the same occurred when the stressed bacteria interacted with a control root in control medium (Jofré et al. 1998), demonstrating that the interaction of bacterium and plant was damaged by saline stress from the initial stages of growth. On the other hand, the assay of  $\beta$ -galactosidase activity proved to be a very adequate method for studying the attachment to the root. Although the visual detection of bacterial cells already showed a failure in the colonization of stressed plants, the enzymatic assay allowed us to specifically quantify the presence of the bacteria adhered to the root.

#### Effect of the saline stress on the expression of *nifA* and *nifH* in *A. brasilense* and its induction by maize root exudates

Nitrogenase is a complex enzyme consisting of two components, a reductase, or Fe-protein, and a nitrogenase, or Fe-Mo-protein. Biological nitrogen fixation is a demanding high-energy process and is therefore subjected to elaborate control in all diazotrophs. In this sense, *Azospirillum* has complicated systems to control nitrogen fixation in response to environmental conditions (Zhang et al. 1997; Elmerich et

**Fig. 3.** In situ detection of  $\beta$ -galactosidase activity on maize roots. I, uninoculated control; II, control roots 21 days after inoculation with control bacteria (*nifA-lacZ*); III, control roots inoculated with stressed bacteria (*nifA-lacZ*); IV, uninoculated roots from a seedling grown in 200 mM NaCl; V, roots from a seedling grown in 200 mM NaCl inoculated with control bacteria (*nifA-lacZ*); VI, roots from a plant grown in 200 mM NaCl inoculated with stressed bacteria (*nifA-lacZ*).



al. 1997); and it is exerted both at the level of nitrogenase synthesis and activity (Vande Broek and Vanderleyden 1995).

Table 2 shows the  $\beta$ -galactosidase activity as an expression of the *nifA-lacZ* fusion of *A. brasilense* in the presence of air. Under saline stress, bacteria exhibited a higher expression than the control group. However, under a microaerobic atmosphere, the expression of the *nifH-lacZ* fusion was significantly diminished in stressed bacteria (Table 3). Liang et al. (1991, 1992) demonstrated that a *nifA-lacZ* fusion was expressed from its own promoter, not

only under conditions favorable for nitrogen fixation, but also in the presence of ammonia and (or) air. Since the presence of oxygen and ammonia is not compatible with nitrogen fixation or with the expression of the *nifH-lacZ* fusion, it has been proposed that the *nifA* product is synthesized in an inactive form under these conditions (Liang et al. 1991). Thus, in the results shown in Table 2, NifA was inactive. In Table 3, the control group showed a normal expression of *nifH-lacZ* fusion; in this experiment, NifA (the regulatory protein necessary for the expression of *nifH*) was active. These results suggest that there is an alteration in the activa-

**Table 1.** Attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize roots under saline stress.

Treatment	Adsorption <sup>a</sup>
CCC	7.71±0.94 <sup>b</sup>
TCC	2.52±1.01 <sup>c</sup>
TTT	4.53±0.22 <sup>c</sup>

Notes: Values are the means ± SE of 5 experiments (3–4 roots per treatment in each experiment). CCC, control seedling, control bacteria, control medium; TCC, treated seedling (200 mM NaCl), control bacteria, control medium; TTT, treated seedling (200 mM NaCl), treated bacteria (200 mM NaCl), treated medium (200 mM NaCl).

<sup>a</sup>β-Galactosidase activity expressed in Miller units per minute per milligram of plant protein.

<sup>b,c</sup>Identical superscript letters indicate that there are no statistical differences between the compared groups at  $p < 0.05$ .

**Table 2.** β-Galactosidase activity of *nifA-lacZ* fusion of *Azospirillum brasilense* Cd and the induction by *Zea mays* exudates.

Treatment	Activity (Miller units·min <sup>-1</sup> ·mg protein <sup>-1</sup> )
C	514.09±22.23 <sup>a</sup>
C-Ex <sub>C</sub>	657.73±83.45 <sup>b</sup>
C-Ex <sub>T</sub>	707.21±56.88 <sup>bc</sup>
T	696.74±63.89 <sup>bc</sup>
T-Ex <sub>C</sub>	798.10±58.85 <sup>c</sup>
T-Ex <sub>T</sub>	772.41±13.96 <sup>c</sup>

Notes: Values are the means ± SE of 4 experiments. Cultures were grown at OD<sub>600</sub> = 1. Incubation time under air was 4 h. Identical superscript letters indicate that there are no statistical differences between the compared groups at  $p < 0.05$ . C, control bacteria; C-Ex<sub>C</sub>, control bacteria plus control exudate; C-Ex<sub>T</sub>, control bacteria plus treated exudate; T, treated bacteria; T-Ex<sub>C</sub>, treated bacteria plus control exudate; T-Ex<sub>T</sub>, treated bacteria plus treated exudate.

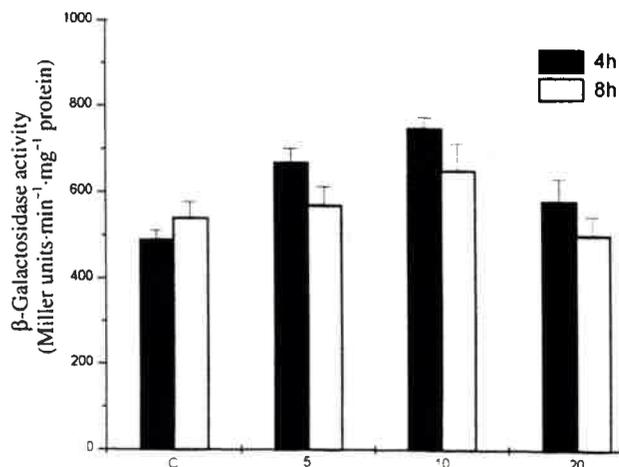
tion of this protein in the stressed bacteria. Moreover, the higher production of inactive NifA in this group (Table 2) could be a compensation of a modified feedback. In regard to this point, it has been suggested that in *A. brasilense*, NifA activity is posttranslationally controlled by the PII protein in response to the cellular nitrogen status (Vande Broek and Vanderleyden 1995). Further studies on the properties of this protein are necessary but, from this experiment, we may conclude that *A. brasilense* Cd would be less capable of fixing nitrogen under these experimental conditions.

On the other hand, Van Bastelaere et al. (1993) demonstrated that gene expression in *Azospirillum* is influenced by the presence of plant root exudates. Taking this into account, we decided to study the induction of the transcription of N<sub>2</sub>-fixation gene promoters by measuring the β-galactosidase activity in bacteria incubated in the presence or absence of control and treated exudates. Previously, different exudate concentrations and incubation times were tested to standardize the experimental conditions. Figure 4 shows that the optimal exudate concentration was 10-fold and the optimal incubation time, 4 h. This study was done with all of the treatments. Either control or treated exudates induced a higher expression of the *nifA-lacZ* fusion in control bacteria,

**Table 3.** β-Galactosidase activity of *nifH-lacZ* fusion of *Azospirillum brasilense* Cd and the induction by *Zea mays* exudates.

Treatment	Activity (Miller units·min <sup>-1</sup> ·mg protein <sup>-1</sup> )
C	756.89±114.07 <sup>a</sup>
C-Ex <sub>C</sub>	876.28±70.35 <sup>a</sup>
C-Ex <sub>T</sub>	970.84±97.30 <sup>a</sup>
T	179.43±30.50 <sup>b</sup>
T-Ex <sub>C</sub>	216.52±29.32 <sup>b</sup>
T-Ex <sub>T</sub>	239.86±79.90 <sup>b</sup>

Notes: The values are the means ± SD of 3–4 roots per treatment. Cultures were grown at an OD<sub>600</sub> = 1. Incubation time was 4 h in MML medium without ammonia under microaerobic conditions (99.5% Ar and 0.5% O<sub>2</sub>). Identical superscript letters indicate that there are no statistical differences between the compared groups at  $p < 0.05$ . C, control bacteria; C-Ex<sub>C</sub>, control bacteria plus control exudate; C-Ex<sub>T</sub>, control bacteria plus treated exudate; T, treated bacteria; T-Ex<sub>C</sub>, treated bacteria plus control exudate; T-Ex<sub>T</sub>, treated bacteria plus treated exudate.

**Fig. 4.** β-Galactosidase activity of *Azospirillum brasilense* Cd containing the *nifA-lacZ* fusion grown at OD<sub>600</sub> = 1 at different incubation times (4 and 8 h) demonstrating the effect of *Zea mays* exudates proceeding from control seedlings (C) to 5-, 10-, and 20-fold concentrated exudates.

but they did not significantly enhance it in stressed bacteria (Table 2). These results support the idea that the exudates might be involved in the modulation of certain bacterial processes, such as nitrogen fixation. Thus, in control bacteria, they induced the expression of *nifA*, leading to a higher production of NifA that, once activated, promoted the expression of *nifH*. When the bacteria carried the *nifH-lacZ* fusion, under microaerobic conditions, root exudates did not induce further activity in either the control or stressed group (Table 3).

The absence of response to exudates in treated bacteria could be correlated with the alterations observed in the external membrane protein pattern and in capsular, exo-, and lipopolysaccharides (Jofré et al. 1998). In relation to this, Schloter et al. (1994) and Michiels et al. (1990), among others,

have demonstrated the importance of surface polysaccharides (exo- and lipopolysaccharides), major components of the external membrane of *Azospirillum* spp., for membrane stability, cell permeability, and for the interaction with other organisms and the environment. On the other hand, Dufrene and Rouxhet (1996) investigated the surface composition of *A. brasilense* during growth in rich medium in relation with physicochemical properties and cell adhesiveness. The modifications produced by the saline stress on *Azospirillum*'s chemical composition may have hindered the response to the external signal produced by the exudates.

It has been demonstrated that root exudates are involved in plant-bacterial interactions. They not only affect nitrogen fixation but also attachment (Gafni et al. 1986; Bashan and Levanony 1989), and further studies are in progress to investigate their influence on *Azospirillum* spp. gene expression under saline conditions.

In conclusion, saline stress altered the *Azospirillum brasilense* Cd - *Zea mays* interaction not only through bacterial chemical modifications (Jofré et al. 1998), but also through affecting plant development, with impairment in the adsorption attachment stage. The expression of the *nif* gene was also modified, so that bacteria were less capable of fixing atmospheric nitrogen under these experimental conditions. The stressed bacteria were unable to respond to the plant exudate induction as they do under normal conditions, possibly owing to the severe alterations described.

## Acknowledgements

We are grateful to Donna Balegno for her help in preparing the English manuscript. This work was supported by the Consejo de Investigaciones Científicas y Técnicas de Córdoba (CONICOR) and the Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto. E.J. is a recipient of a scholarship from CONICOR.

## References

- Arsène, F., Katupitiya, S., Kennedy, I., and Elmerich, C. 1994. Use of *lacZ* fusions to study the expression of *nif* genes of *Azospirillum brasilense* in association with plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* **7**: 748-757.
- Bashan, Y. 1986. Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 297-301.
- Bashan, Y., and Levanony, H. 1988. Migration, colonization and adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to wheat roots. In *Lectins: Biology, biochemistry and clinical biochemistry*. Edited by T.C. Bog-Hansen and D.L.J. Freed. Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. **6**: 69-84.
- Bashan, Y., and Levanony, H. 1989a. Wheat root tips as a vector for passive vertical transfer of *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2899-2908.
- Bashan, Y., and Levanony, H. 1989b. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* Cd to root hair as compared with root surface of wheat. *Can. J. Microbiol.* **35**: 936-944.
- Bashan, Y., and Levanony, H. 1989c. Factors affecting adsorption of *Azospirillum brasilense* and *Pseudomonas fluorescens* towards wheat roots in the soil. *J. Gen. Microbiol.* **132**: 3407-3414.
- Bashan, Y., Levanony, H., and Whitmoyer, R.E. 1991. Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 187-196.
- Boivin, C., Camut, S., Malpica, C., Truchet, G., and Rosenberg, C. 1990. *Rhizobium meliloti* genes encoding catabolism of trigonelline are induced under symbiotic conditions. *Plant Cell.* **2**: 1157-1170.
- Bothe, H., Körsgen, H., Lehmacher, T., and Hundeshagen, B. 1992. Differential effects of *Azospirillum*, auxin and combined nitrogen on the growth of the roots of wheat. *Symbiosis.* **13**: 167-179.
- Bradford, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Burdman, S., Kigel, J., and Okon, Y. 1997. Effects of *Azospirillum brasilense* on nodulation and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Soil Biol. Chem.* **29**: 923-929.
- Dreyfus, B.L., Elmerich, C., and Dommergues, Y. 1983. Free-living *Rhizobium* strain able to grow on N<sub>2</sub> as the sole nitrogen source. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 711-713.
- Dufrene, Y.F., and Rouxhet, P.G. 1996. Surface composition, surface properties, and adhesiveness of *Azospirillum brasilense*-variation during growth. *Can. J. Microbiol.* **42**: 548-556.
- Elmerich, C., De Zamaroczy, M., Arsène, F., Pereg, L., Paquelin, A., and Kaminski, A. 1997. Regulation of *nif* gene expression and nitrogen metabolism in *Azospirillum*. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 847-852.
- Fallik, E., Sarig, S., and Okon, Y. 1994. In *Morphology and physiology of plant roots associated with Azospirillum. Azospirillum/plant associations*. Edited by Y. Okon. CRC Press, Boca Raton, Fla.
- Gafni, R., Okon, Y., and Kapulnik, Y. 1986. Adsorption of *Azospirillum brasilense* to corn roots. *Soil Biol. Biochem.* **18**: 69-75.
- Graham, P. 1991. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475-484.
- Jofré, E., Mori, G., Castro, S., Fabra, A., Rivarola, V., and Balegno, H. 1996. 2,4-Dichlorophenoxyacetic affects the attachment of *Azospirillum brasilense* Cd to maize roots. *Toxicology.* **107**: 9-15.
- Jofré, E., Fischer, S., Rivarola, V., Balegno, H., and Mori, G. 1998. Saline stress affects the attachment of *A. brasilense* Cd to maize and wheat roots. *Can. J. Microbiol.* **44**: 416-422.
- Katupitiya, S., New, P., Elmerich, C., and Kennedy, I. 1995. Improved N<sub>2</sub> fixation in 2,4-D treated wheat roots associated with *Azospirillum lipoferum*: studies of colonization using reporter genes. *Soil Biol. Biochem.* **27**: 447-452.
- Levanony, H., and Bashan, Y. 1989. Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* **67**: 2213-2216.
- Lavigne, C. 1987. Contribution à l'étude du système racinaire du bananier. Mise au point de rhizotrons et premiers résultats. *Fruits.* **42**: 265-271.
- Liang, Y.Y., Kaminski, P.A., and Elmerich, C. 1991. Identification of *nifA*-like regulatory gene of *Azospirillum brasilense* Sp7 expressed under conditions of nitrogen fixation and in the presence of air and ammonia. *Mol. Microbiol.* **5**: 2735-2744.
- Liang, Y., de Zamaroczy, M., Arsène, F., Paquelin, A., and Elmerich, C. 1992. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense* Sp7: involvement of *nifA*, *glnA* and *glnB* gene products. *FEMS Microbiol. Lett.* **100**: 13-120.
- Michiels, K., Verreth, C., and Vanderleyden, J. 1990. *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense* surface polysaccharide

- mutants that are affected in flocculation. *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 705-711.
- Miller, J.H. 1972. Assay of  $\beta$ -galactosidase. *In* Experiments of molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 352-255.
- Munns, R., and Termaat, A. 1986. Whole plant response to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* **13**: 143-160.
- Okon, Y., and Kapulnik, Y. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant Soil*, **90**: 3-16.
- Okon, Y., and Labandera-González, C.A. 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 1591-1601.
- Patriquin, D.G., Döbereiner, J., and Jain, D.K. 1983. Sites and processes of association between diazotrophs and grasses. *Can. J. Microbiol.* **29**: 900-915.
- Pereg, L.L., Kennedy, I.R., and Elmerich, C. 1996. Genetic factors controlling colonisation of wheat roots by *Azospirillum brasilense* Sp7. Abstracts of the Eleventh Australian Nitrogen Fixation Conference, September 22-27, Perth, Australia. The University of Western Australia, Nedlands, Western Australia. pp. 122-123.
- Reggiani, R., Bozo, S., and Bertani, A. 1994. The effect of salinity on early seedling growth of seeds of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Can. J. Plant Sci.* **75**: 175-177.
- Schlöter, M., Bode, W., Hatmann, A., and Beese, F. 1992. Sensitive chemoluminescence-based immunological quantification of bacteria in soil extracts with monoclonal antibodies. *Soil Biol. Biochem.* **24**: 399-403.
- Schlöter, M., Moens, S., Croes, C., Reidel, G., Esquenet, M., De Mot, R., Hartmann, A., and Michiels, K. 1994. Characterization of cell surface components of *Azospirillum brasilense* Sp7 as antigenic determinants for strain-specific monoclonal antibodies. *Microbiology (Reading, U.K.)*, **140**: 823-828.
- Shalhevet, J., Huck, M., and Schröder, C. 1995. Root and shoot growth responses to salinity in maize and soybean. *Agron. J.* **87**: 512-516.
- Van Bastelaere, E., De Mot, R., Michiels, K., and Vanderleyden, J. 1993. Differential gene expression in *Azospirillum* spp. by plant-root exudates: Analysis of protein profiles by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *FEMS Microbiol. Lett.* **112**: 335-342.
- Vande Broek, A., and Vanderleyden, J. 1995. Review: Genetics of the *Azospirillum* plant root association. *Crit. Rev. Plant Sci.* **14**: 445-466.
- Vanstockem, M., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Van Gool, A. 1987. Transposon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: Physical analysis of Tn5 and Tn5-Mob insertion mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 410-415.
- Volpin, H., Burdman, S., Castro-Sowinski, S., Kapulnik, Y., and Okon, Y. 1996. Inoculation with *Azospirillum* increased exudation of Rhizobial *nod*-gene inducers by alfalfa roots. *Mol. Plant Microbe Interact.* **9**: 388-394.
- Zhang, Y., Burris, R., Ludden, P., and Roberts, G. 1997. Regulation of nitrogen fixation in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**: 195-204.



53020