

PAGLIERO, FABIOLA
Produccion de señale

2012 71209

71209

MFN:
Clasif:
T-771



El presente trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas fue realizado en el Departamento de Ciencias Naturales de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto y en el Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de La Pampa bajo la dirección de la Dra. Adriana Fabra y la codirección de la Dra. Graciela Lorda

Tribunal de Tesis



Dra. Ana Dalcerro



Dra. Guillermina Abdala



Dr. Augusto García



Dra. Adriana Fabra
Directora



Dra. Graciela Lorda
Codirectora



MSc. Fabiola Pagliero
Doctorando

Mi agradecimiento

A la UNRC, por haberme dado la posibilidad de llevar a cabo mi formación de postgrado.

A la UNLPam, por haberme brindado el apoyo institucional para realizar esta Tesis doctoral, en el marco de mi perfeccionamiento como docente de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

A la Dra. Adriana Fabra, quien aceptó dirigirme en este trabajo y me acompañó durante todo el desarrollo del mismo, por su presencia incondicional, sus apreciados y relevantes aportes, críticas, comentarios y sugerencias durante el desarrollo de esta investigación, y sobre todo por su paciencia, responsabilidad y dedicación.

A la Dra. Graciela Lorda, mi codirectora de Tesis, por su acompañamiento, su comprensión y su presencia en todas las etapas de este trabajo durante el cual compartió generosamente su tiempo conmigo, brindándome sus conocimientos y su amistad.

Al Dr. Jorge Angelini, quien fue mi referencia en Río Cuarto durante la parte experimental que desarrollé en la UNRC y más adelante; siempre dispuesto a ayudarme en todo tipo de inconvenientes, experimentales, bibliográficos, de escritura. Le agradezco también el haber compartido conmigo la calidez de su casa y de su familia en muchas oportunidades.

A los miembros de la Comisión Asesora de Tesis, Dra. Ana Dalcero, Dra. Guillermina Abdala y Dr. Augusto García. Por sus sugerencias y críticas constructivas a lo largo del seguimiento del desarrollo de este trabajo, por la dedicación para cada uno de los informes, por compartir sus puntos de vista y conocimientos en las reuniones que tuvimos. Todos sus valiosos aportes, contribuyeron a mejorar en forma significativa a este trabajo.

A los Dres. Manuel Megías Guijo y Javier Ollero Márquez, por darme la posibilidad de realizar parte de este trabajo en la Universidad de Sevilla, poniendo a mi disposición sus laboratorios y conocimientos. Gracias a quienes trabajaron conmigo en esa Universidad e hicieron muy llevaderas esas largas jornadas: Paco, Irene, Saida, Charo, Inma, Isabel, Francisco.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, de la UNLPam. Por compartir gran parte de sus vidas conmigo y estar dispuestos siempre a colaborar en mi trabajo. Gracias especialmente a los permanentes: Carola, Mary, Marcelo y también a los alumnos que han pasado durante estos años y me han ayudado en parte de mi trabajo: Valeria, Andrea, Carla, Francisco, Gabriela, Sofía, Emilio, Emiliano, Ángeles. A Soraya, quien estos dos últimos años comparte mi oficina y ha tenido que lidiar con la mi estado de ánimo en la escritura de la tesis.

A la gente del Laboratorio 21 quienes han estado siempre dispuestos a facilitar mi trabajo, con técnicas experimentales, cediéndome su material, brindándome espacio en un lugar donde es un bien muy preciado. Cada uno de ellos ha contribuido además en alguna instancia de este trabajo

de Tesis. Gracias por el grupo humano. Gracias Estela, por preguntar siempre y por tus recomendaciones culturales. Gracias Tania, Lucio, y de nuevo Jorge, por aceptarme como una más en la "oficina laboratorio". Gracias Fernando, Laura, Eliana, Ana, Soledad, con quienes he compartido mesada, seminarios, recomendaciones de escritura. También a todos los demás con quienes he coincidido menos tiempo. Un agradecimiento especial a Sonia, del Laboratorio22 que siempre se ha interesado en el estado de avance de mis trabajos y con la cual tuve oportunidad de compartir momentos hermosos en Granada y Córdoba.

A mi prima, Cecilia. A su familia, Gaby, Agustina, Sara y Victoria. Gracias por todo, nada más justo en este momento que la palabra todo. Por darme una familia, un hogar, tanto para mí como para Lao, que ha podido viajar y permanecer conmigo en Río Cuarto por la generosidad de ustedes, por incorporarme en su grupos de amigos, tener mi propio lugar en su casa, y por supuesto mucho más, tanto que es inabarcable. También a mis primas Verónica y Raquel, que me miman cuando hago mis incursiones a Ucacha.

A mi mamá que ha viajado tantas veces a hacer de abuela, durante mis ausencias, por tener siempre una valija a mano para emprender viaje a Santa Rosa. A Olga, por ser tan amiga de ella que la ha acompañado, logrando que Lao tenga otra abuela más. A Mirta, quien siempre está pendiente y dispuesta a ayudarme.

A mis hermanos. Los quiero mucho, gracias por todo Sofía, Ita, Carolina, Leandro y Guillermina.

A todas mis amigas por preguntar, alentarme, retarme, obligarme a escribir, por acompañarme en este tránsito por la vida. Mariana, Ana, Andrea, Jana, Nora y Patricia. Lorena y Mavi. Carla y Valeria. Carolina.

A Martín, por compartir las charlas, los silencios, los sueños y el futuro; por cobijarme en tus brazos y no soltarme, por estar siempre, aún cuando los kilómetros entre los dos son muchos.

A Lao, mi hijo, por alegrar cada día de mi vida. Gracias por acostumbrarte a que tenga que viajar y a que los horarios sean adaptables, por esperar para más adelante para viajar, para usar la compu, para estar juntos sin hacer nada, por crecer tanto y sorprenderme, por hacerme sentir una mamá orgullosa.

Gracias a todos nuevamente.

Resumen

El sistema simbiótico rizobio-leguminosa es uno de los más estudiados debido a su importancia en la producción agrícola. La simbiosis se inicia con el intercambio de señales entre los rizobios y las raíces de las leguminosas lo que posibilita el reconocimiento mutuo. Los genes de nodulación se expresan en respuesta a los flavonoides producidos por la planta y su expresión conduce a la síntesis de los factores Nod, inductores de las etapas iniciales de la interacción. Otras moléculas bacterianas tales como polisacáridos celulares también son requeridas para la formación de nódulos simbióticamente efectivos. Además, la disponibilidad de nutrientes y otras condiciones ambientales afectan esta interacción. Los mecanismos de regulación basados en *quorum sensing* se han descrito en bacterias involucradas en asociaciones tanto simbióticas como patogénicas con sus plantas huéspedes. Está demostrado que ciertos fenómenos de la interacción rizobio-leguminosa están regulados por *quorum sensing*. La propuesta de este trabajo de tesis fue estudiar la influencia del fenómeno de *quorum sensing* sobre algunos aspectos implicados en la interacción rizobio-leguminosa. Se trabajó con los microorganismos *S. meliloti* B399, *B. japonicum* E109, *B. elkanii* U1302, *R. tropici* CIAT 899 y *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144. Se comprobó que todos los rizobios estudiados producen moléculas señal *quorum*, del tipo AHL (acil-homoserina lactona), de cadena corta y de cadena larga. Por otra parte, se determinó que la regulación de la expresión de los genes *nod* por *quorum sensing* varía con la especie rizobiana, y que en algunos casos es dependiente del estado metabólico del microorganismo. Otro aspecto abordado en esta tesis, fue la evaluación de la influencia de las AHLs sobre la producción de componentes de la superficie rizobiana. Se encontró que estas moléculas regularon la producción de EPS (exopolisacáridos) y/o CPS (polisacáridos capsulares) dependiendo del rizobio estudiado, mientras que no incidieron en la síntesis de LPS (lipopolisacáridos) en ninguno de ellos. Por otra parte se comprobó que las condiciones ambientales, tales como contenido de nitrógeno, de hierro, el pH y la salinidad inciden en la producción de AHLs en los microorganismos ensayados. Dado que la densidad celular está asociada a la producción de AHLs, se estudió su efecto sobre el comportamiento simbiótico de los rizobios. Se comprobó su incidencia sobre la infectividad, solamente en los rizobios de crecimiento lento. Al mismo tiempo se demostró que este efecto se refleja en la efectividad simbiótica en *B. elkanii* y *Bradyrhizobium* sp. Asumiendo la capacidad de los microorganismos para sensor AHLs heterólogos, se mostró que la presencia de poblaciones establecidas en el suelo afectó la infectividad o la nodulación dependiendo del sistema simbiótico que se analice. Los estudios realizados en este trabajo de tesis han permitido demostrar que el fenómeno de *quorum* está involucrado en la regulación de diferentes aspectos de la simbiosis rizobios-leguminosas, y constituyen un aporte al conocimiento básico y aplicado sobre este tipo de asociaciones.

Abstract

The rhizobia-legume symbiotic system is one of the most studied because of its importance in agricultural production. The symbiosis is initiated by the exchange of signals between rhizobia and legume roots which enables mutual recognition. Nodulation genes are expressed in response to flavonoids produced by the plant and its expression leads to the synthesis of Nod factors that are inducers of the initial stages of the interaction. Other bacterial molecules such as cellular polysaccharides are also required for the formation of symbiotically effective nodules. Furthermore, the availability of nutrients and other environmental conditions affect this interaction. Regulatory mechanisms based on quorum sensing have been described in bacteria involved in both symbiotic and pathogenic associations with their host plants. It has been demonstrated that certain phenomena of rhizobia-legume interaction is regulated by quorum sensing. The aim of this thesis was to study the influence of quorum sensing phenomenon on some aspects involved in the rhizobia-legume interaction. Bacteria used in this study were *S. meliloti* B399, *B. japonicum* E109, *B. elkanii* U1302, *R. tropici* CIAT 899 and *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144. It was found that all rhizobia studied produced *quorum* signal molecules of the type of AHL (acyl-homoserine lactone), of short and long chains. Moreover, it was determined that the regulation of expression of the nod genes by quorum sensing varies with rhizobial species, and in some cases it is dependent on the metabolic state of the microorganism. Another issue studied in this thesis was the evaluation of the influence of AHLs on the production of rhizobial surface components. It was found that these molecules regulated the production of EPS (exopolysaccharides) and/or CPS (capsular polysaccharides) depending on the rhizobia studied, while no influence on the synthesis of LPS (lipopolysaccharide) were observed in any of them. Moreover, it was found that the environmental conditions, such as nitrogen and iron content, pH and salinity affect the production of AHLs in the microorganisms analyzed. Given that cell density is associated with the production of AHLs, its effect was studied on the symbiotic behavior of the rhizobia. Its influence on the infectivity was only observed in slow-growing rhizobia. At the same time it was demonstrated that this effect was also reflected in the symbiotic effectiveness of *B. elkanii* and *Bradyrhizobium* sp. Assuming the ability of microorganisms to sense heterologous AHLs, it was showed that the presence of established populations in the soil affect the infectivity or symbiotic nodulation depending on the system being analyzed. Results obtained in this study have demonstrated that the phenomenon of *quorum* is involved in the regulation of different aspects of the rhizobia-legume symbiosis and constitutes a contribution to basic and applied knowledge on this type of association.

ABREVIATURAS

AHLs: acil homoserina lactonas.
AI: autoinductores.
AI-2: autoinductor 2.
CDF: *Cell Density Factor*.
CPRG: rojo clorofenol galactopiranosido.
CPRG: rojo clorofenol-galactopiranosido.
CPS: polisacáridos capsulares.
DFS: factor difusible.
DO: densidad óptica.
EPS: exopolisacáridos.
FBN: Fijación biológica de Nitrógeno.
GalA: ácido D-galacturónico.
GCP: Glucanos cíclicos periplásmicos.
GluA: ácido D-glucurónico.
KDO: ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico.
LB: medio Luria Bertani.
LPS: lipopolisacáridos.
MM: medio mínimo.
MPB: membrana peribacteroidal
MSM: medio salino mínimo.
ONPG: orto fenil tiogalactósido.
PAME: hidroxil-ácido palmítico metil éster.
PBS: buffer fosfato salino.
PQS: señal *Pseudomonas* quinolona.
QS: *quorum sensing*.
Spc: cloruro de espectinomicina.
Str: estreptomina.
Tc: tetraciclina.
tg: tiempo de generación.
UFC: unidades formadoras de colonias.
YEM: Yeast manitol medio.
YEMA: Yeast manitol agar.
 μ_{max} : velocidad específica de crecimiento máximo.

ÍNDICE

CAPITULO 1	13
Introducción.....	13
Simbiosis rizobio-leguminosa.....	14
Componentes de superficie de la bacteria requeridos para una simbiosis efectiva	19
a) Exopolisacáridos (EPS).....	19
b) Polisacáridos Capsulares (CPS).....	21
c) Lipopolisacáridos (LPS)	21
d) Glucanos Cíclicos Periplásmicos (GCP).....	23
<i>Quorum sensing</i> en microorganismos.....	23
Comunicación interespecífica entre microorganismos.....	26
<i>Quorum sensing</i> en la interacción <i>Rhizobium</i> -leguminosas	27
<i>Quorum sensing</i> en <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> A34.....	27
<i>Quorum sensing</i> en <i>R. etli</i> CNPAF512	28
<i>Quorum sensing</i> en <i>S. meliloti</i> Rm1021	29
<i>Quorum sensing</i> en el género <i>Bradyrhizobium</i>	30
<i>Quorum sensing</i> y polisacáridos rizobianos	32
Hipótesis y Objetivos.....	34
Hipótesis.....	35
Objetivos	35
CAPITULO 2	37
Materiales y Métodos	37
Microorganismos y medios de cultivo	38
Cepas bacterianas y plásmidos	38
Medios de cultivo y evaluación de crecimiento microbiano	39
Conservación de microorganismos.....	40

Obtención de rizobios transconjugantes	41
Aislamiento de mutantes espontáneos de resistencia a antibióticos	41
Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	41
Transformación de células competentes de <i>E. coli</i>	41
Transformación de rizobios mediante conjugación biparental	42
Análisis genómico de cepas parentales, de mutantes espontáneas resistentes a antibióticos y de transconjugantes	42
a) Extracción de ADN a partir de colonias bacterianas	42
b) Obtención de perfiles de fingerprints de ADN.....	43
Determinación del efecto de moléculas <i>quorum</i> sobre la expresión de genes de nodulación.....	44
a) Evaluación de producción de β -galactosidasa	44
b) Determinación de actividad β -galactosidasa.....	44
Evaluación de la expresión del gen <i>nodA</i> por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) .	46
a) Extracción de ARN.....	46
b) RT-PCR.....	46
Extracción de autoinductores de sobrenadantes de cultivos bacterianos	47
Detección de autoinductores.....	47
Bioensayo con <i>C. violaceum</i> CV026	47
Bioensayo con <i>A. tumefaciens</i> NT1-pZLR4.....	48
Determinación de polisacáridos extracelulares (EPS) y capsulares (CPS).....	48
Determinación del contenido de hexosas.....	49
Análisis de LPS.....	49
Determinación de proteínas celulares totales.....	49
Ensayos en plantas.....	50
a) Esterilización de semillas.....	50
b) Pregerminación.....	50

c) Cultivo de plantas de alfalfa en tubos	50
d) Cultivo de plantas de soja, poroto y maní en macetas	51
e) Determinación del contenido de nitrógeno	51
Determinación de la influencia de la población rizobiana presente en el suelo sobre la nodulación.....	51
Análisis estadístico	52
CAPITULO 3	53
Regulación de la expresión de genes <i>nod</i> mediada por AHLs.....	53
Caracterización del crecimiento de las especies estudiadas	54
<i>Selección de medios de cultivo</i>	54
<i>Evaluación del crecimiento</i>	55
Producción de autoinductores en las cepas rizobianas	56
Caracterización genotípica y fenotípica de rizobios transconjugantes portadores de una fusión <i>nod::lacZ</i>	58
Evaluación de la expresión de genes <i>nod</i> por acción de AHLs.....	60
Efecto de moléculas de <i>quorum sensing</i> heterólogas sobre la expresión de genes <i>nod</i>	65
CAPITULO 4	69
Efecto de AHLs sobre moléculas de la superficie rizobiana involucradas en la interacción... 69	
Efecto de AHLs sobre el contenido de CPS y EPS	70
Efecto de AHLs sobre la composición de LPS	71
CAPITULO 5	74
Efecto de la disponibilidad de nutrientes y condiciones de estrés sobre la producción de AHLs.....	74
Influencia del hierro y el nitrógeno sobre la producción de AHLs	75
Influencia del estrés salino y ácido sobre la producción de la molécula señal	84
CAPITULO 6	91
Efecto de las AHLs sobre el comportamiento simbiótico	91

Influencia de la densidad celular y el estado metabólico de rizobios sobre el comportamiento simbiótico.....	92
Soja.....	92
Alfalfa	102
Maní	104
Poroto.....	107
Efecto de la población rizobiana presente en el suelo sobre el comportamiento simbiótico de rizobios inoculados.....	109
Interacción soja- <i>B. japonicum</i>	111
Interacción soja- <i>B. elkanii</i>	112
Interacción soja- <i>S. fredii</i>	113
Interacción alfalfa- <i>S. meliloti</i>	114
Interacción maní- <i>Bradyrhizobium sp.</i>	115
Interacción poroto- <i>R. tropici</i>	116
CAPITULO 7	118
Conclusiones y perspectivas futuras.....	118
CAPITULO 8	122
Bibliografía	122

Índice de Tablas y Figuras

Figura 1.1: Diálogo molecular entre rizobios y leguminosa.....	15
Figura 1.2. Estructura de flavonoides.....	16
Figura 1.3: Estructura básica de los factores Nod y sus radicales más comunes.....	17
Figura 1.4: Estructura de nódulos determinados e indeterminados.....	18
Figura 1.5: Estructuras de algunas moléculas señal autoinductoras.....	25
Tabla 1.1: Caracteres regulados por QS en diversas especies de rizobios.....	27
Figura 1.6: Sistemas de QS en <i>S. meliloti</i> Rm1021.....	29
Figura 1.7: Regulación de la nodulación en <i>B. japonicum</i>	30
Figura 1.3: Estructura de la bradióxetina.....	31
Tabla 2.1: Microorganismos y plásmidos	38
Tabla 2.2: Antibióticos	40
Tabla 2.3: Relación específica flavonoide-rizobio	44
Tabla 3.1: Crecimiento de los microorganismos en diferentes medios de cultivo.....	55
Tabla 3.2: Medios mínimos y fuente de carbono seleccionados para cada microorganismo	55
Tabla 3.3: Parámetros de crecimiento de microorganismos estudiados.....	56
Figura 3.1: Producción de AHLs	57
Figura 3.2: Perfiles de ERIC-PCR de transconjugantes y parentales.....	58
Figura 3.3: Producción de β galactosidasa en transconjugantes.....	59
Tabla 3.4: Actividad β -galactosidasa en transconjugantes.....	59
Tabla 3.5: Parámetros de crecimiento en microorganismos transconjugantes.....	59
Figura 3.4: Raíces de leguminosas inoculadas con rizobios transconjugantes.....	60
Tabla 3.6: Expresión de genes de nodulación de transconjugantes en fases de crecimiento exponencial, estacionaria	61
Tabla 3.7: Expresión de genes de nodulación de transconjugantes en fases de crecimiento exponencial, estacionaria y estacionaria diluida.....	62
Tabla 3.8: Expresión de genes de nodulación de rizobios transconjugantes en fase de crecimiento exponencial y en presencia de AHLs.....	63
Tabla 3.9: Expresión de gen <i>nodA</i> de <i>S. fredii</i> HH103 en distintas fases de crecimiento y en presencia de AHLs.....	64
Tabla 3.10. Expresión de genes de nodulación en cepas de rizobios, en presencia de AHLs heterólogas.....	66
Tabla 4: Contenido de EPS y CPS en cultivos de microorganismos suplementados con AHLs.....	69
Figura 4.1: Perfil de LPS de <i>S. fredii</i> HH103 (a) <i>B. japonicum</i> E 109 (b), <i>S. meliloti</i> B399 (c).....	70
Figura 4.2: Perfil de LPS de <i>Bradyrhizobium</i> sp (a) <i>B. elkanii</i> U1302 (b), <i>R. tropici</i> CIAT 899 (c).....	70
Tabla 5.1 Tratamientos de variación de hierro y nitrógeno en cultivos rizobianos.....	73
Figura 5.1: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de <i>S. fredii</i>	74

Figura 5.2: Efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la producción de AHLs de <i>S. fredii</i>	75
Figura 5.3: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de <i>S. fredii</i>	75
Figura 5.4: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de <i>B. japonicum</i>	76
Figura 5.5: Efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la producción de AHLs de <i>B. japonicum</i>	76
Figura 5.6: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de <i>B. japonicum</i>	77
Figura 5.7: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de <i>B. elkanii</i>	77
Figura 5.8: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de <i>B. elkanii</i>	78
Figura 5.9: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de <i>S. meliloti</i>	78
Figura 5.10: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de <i>S. meliloti</i>	79
Figura 5.11: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de <i>R. tropici</i>	79
Figura 5.12: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de <i>R. tropici</i>	80
Figura 5.13: Efecto del contenido de hierro sobre la producción de AHLs en <i>Bradyrhizobium sp</i> SEMIA 6144.....	80
Figura 5.14: Efecto del contenido de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs en <i>Bradyrhizobium sp</i> SEMIA 6144.....	81
Tabla 5.2: Tratamientos de variación de NaCl y pH en cultivos rizobianos.....	82
Figura 5.15: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de <i>S. fredii</i>	83
Figura 5.16: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de <i>R. tropici</i>	84
Figura 5.17: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de <i>Bradyrhizobium sp.</i>	84
Figura 5.18: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de <i>S. meliloti</i>	85
Figura 5.19: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de <i>S. meliloti</i>	86
Figura 5.20: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de <i>B. elkanii</i>	87
Tabla 6.1: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de soja (UFC/ml).....	91
Figura 6.1: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas inoculadas con <i>B. japonicum</i> E109.....	91
Figura 6.2: Peso seco de parte aérea de plantas inoculadas con <i>B. japonicum</i> E109.....	92
Figura 6.3: Contenido de nitrógeno en parte aérea de plantas de soja inoculadas con <i>B</i>	92

<i>japonicum</i> E109.....	
Figura 6.4: Número de nódulos en el cuello de raíz de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>B japonicum</i>	93
Figura 6.5: Número de nódulos totales en raíz de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>B.elkanii</i>	95
Figura 6.6: Peso seco de parte aérea de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>B. elkanii</i>	95
Figura 6.7: Contenido de nitrógeno en parte aérea de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>B. elkanii</i>	96
Figura 6.8: Número de nódulos en cuello de raíz de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>B. elkanii</i>	97
Figura 6.9: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con <i>S. fredii</i> HH 103.....	97
Figura 6.10: Peso seco de parte aérea para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con <i>S. fredii</i> HH 103.....	98
Figura 6.11: Contenido de nitrógeno para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con <i>S. fredii</i> HH103.....	98
Figura 6.12: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con <i>S. fredii</i> HH 103.....	99
Tabla 6.2: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de alfalfa.....	100
Figura 6.12: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas de alfalfa.....	100
Figura 6.13: Número de nódulos en raíz principal para distintos tratamientos de inoculación en plantas de alfalfa.....	101
Figura 6.14: Peso seco de parte aérea de plantas de alfalfa inoculadas con diferentes tratamientos.....	101
Figura 6.15.: Contenido de nitrógeno de parte aérea para distintos tratamientos de inoculación en plantas de alfalfa.....	102
Tabla 6.3: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de maní.....	103
Figura 6.16: Número de nódulos por planta en raíz de plantas de maní, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>Bradyrhizobium sp</i>	103
Figura 6.17: Peso seco en parte aérea de plantas de maní, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>Bradyrhizobium sp</i>	104
Figura 6.18: Contenido de nitrógeno en parte aérea de plantas de maní, para diferentes tratamientos de inoculación con <i>Bradyrhizobium sp</i>	104
Tabla 6.4: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de poroto.....	105
Figura 6.19: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas de poroto con el microorganismo <i>R tropici</i> CIAT 899.....	106
Figura 6.20: Peso seco de parte aérea para distintos tratamientos de inoculación en plantas de poroto con el microorganismo <i>R tropici</i> CIAT 899.....	106
Figura 6.21: Contenido de nitrógeno para distintos tratamientos de inoculación en plantas de poroto con el microorganismo <i>R tropici</i> CIAT 899.....	107

Tabla 6.5: Tratamientos realizados en ensayos de infectividad en plantas con diferentes poblaciones establecidas.....	108
Figura 6.22 : Número de nódulos en plantas de soja inoculadas con <i>B. japonicum</i> E109 y con diferentes poblaciones de rizobios establecidas en el suelo.....	109
Figura 6.23 : Número de nódulos en plantas de soja inoculadas con <i>B. elkanii</i> U1302 y con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo.....	111
Figura 6.24 : Número de nódulos en plantas de soja inoculadas con <i>S. fredii</i> HH103 y con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo.....	112
Figura 6.25: Número de nódulos en plantas de alfalfa inoculadas con <i>S. meliloti</i> B399 y con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo.....	113
Figura 6.26 : Número de nódulos en plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium sp</i> SEMIA 6144 y con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo.....	113
Figura 6.27 : Número de nódulos en plantas de poroto inoculadas con <i>R. tropici</i> CIAT 899 y con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo.....	114

CAPITULO 1

Introducción

Simbiosis rizobio-leguminosa

El sistema simbiótico rizobio-leguminosa es uno de los más estudiados debido a su importancia en la producción agrícola. La soja, la alfalfa, el maní, el poroto y el trébol son algunas de las leguminosas de importancia económica que establecen relaciones simbióticas con rizobios del suelo (Sessitsch y col., 2002). En esta simbiosis, la planta huésped obtiene nutrientes nitrogenados de la bacteria y ofrece a ésta una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno. Este proceso contribuye con una parte considerable del nitrógeno fijado en la tierra y permite a las plantas leguminosas crecer sin la adición de fertilizantes nitrogenados (Postgate, 1982; Peoples y col., 1995).

Una simbiosis efectiva entre la bacteria y la planta es el resultado de la acción de una cepa de rizobio con a) capacidad de colonización y supervivencia, b) competitividad en la rizósfera y c) capacidad para infectar y fijar el nitrógeno atmosférico.

La simbiosis es un fenómeno biológico que involucra cambios dinámicos en el genoma, en el metabolismo y en la red de señalización entre los organismos intervinientes, por lo que la comprensión de estas interacciones es requerida en el estudio de organismos simbióticos (Kawaguchi y Minamisawa, 2010).

El proceso de Fijación Biológica del Nitrógeno (FBN) que se desarrolla en las simbiosis efectivas es clave en la biosfera. Mediante dicho proceso los microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno biológicamente utilizable. El grupo de bacterias conocido colectivamente como rizobios, inducen en las raíces de las leguminosas la formación de estructuras especializadas denominadas nódulos. En el interior de estos órganos los rizobios modifican su morfología y fisiología transformándose en bacteroides, que son las células especializadas en la conversión del nitrógeno atmosférico en amonio. Parte del amonio obtenido es transferido a la planta, que de este modo cubre en gran medida su demanda de nitrógeno.

La simbiosis se inicia con el intercambio de señales entre los rizobios y las raíces de las leguminosas lo que posibilita el reconocimiento mutuo,

ya que esta relación es muy específica (Figura 1.1) (Cooper, 2007; Broughton y Perret, 1999). Para cada especie de leguminosas existe un conjunto de rizobios que pueden establecer simbiosis exitosas (Sawada y col., 2003).

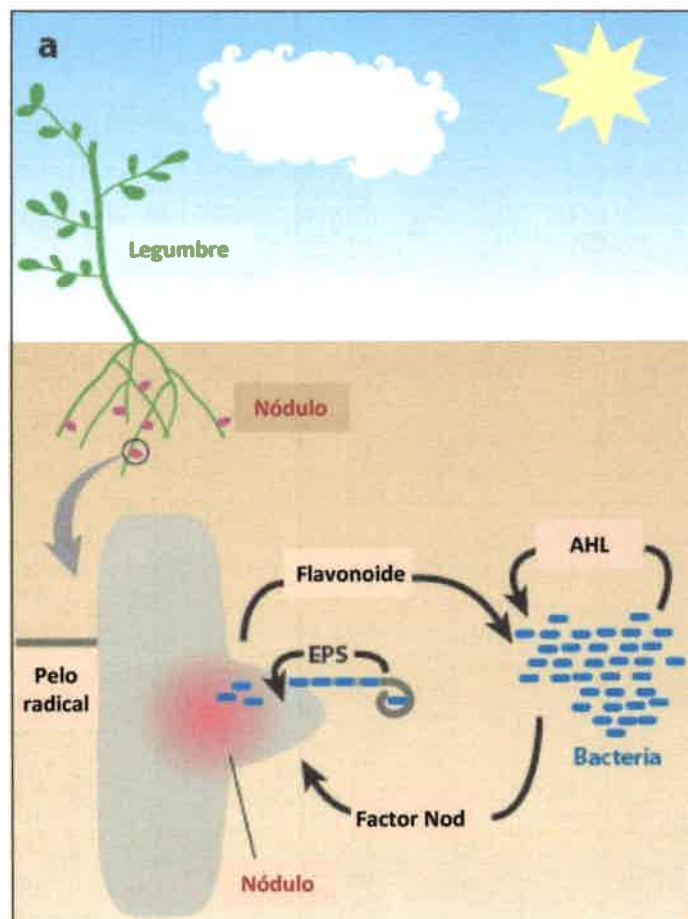


Figura 1.1: Diálogo molecular entre rizobios y leguminosa (Straight y Kolter, 2009).

La invasión bacteriana puede seguir tres modos de entrada a las raíces, los que están determinados por el huésped: a) a través de los pelos de la raíz, b) a través de heridas, particularmente cuando ocurren en raíces adventicias o laterales (denominado "crack entry") y c) entrada entre células epidérmicas intactas en el punto de emergencia de raíces laterales (Fabra y col., 2010). El más conocido de estos mecanismos de infección es el a). El proceso completo que incluye esta vía de entrada, comprende las siguientes etapas (Stacey y col., 1995):

- Reconocimiento de la combinación adecuada de organismos, tanto por parte de la planta como de la bacteria, y adherencia de la bacteria a los pelos radicales.

- Invasión del pelo radical y formación de un canal (o hilo) de infección.
- Desplazamiento de las bacterias hacia la raíz principal a través del canal de infección.
- Diferenciación de las bacterias en un nuevo tipo celular (denominado bacteroide) dentro de las células de la corteza radical de la planta, y desarrollo del estado de fijación de nitrógeno.
- División de las células bacterianas y vegetales y formación del nódulo radical maduro.

Los eventos moleculares involucrados en este proceso se inician cuando las plantas leguminosas secretan compuestos específicos que atraen a los rizobios (Figura 1.2). Entre estos compuestos se encuentran flavonoides e isoflavonoides y, en respuesta a ellos, los rizobios activan una serie de genes implicados en la nodulación (Dixon y Kahn, 2004). El primer paso en la formación de los nódulos es la adherencia de la bacteria a la raíz. En el proceso de adhesión están implicadas proteínas rizobianas específicas como ricadhesina y Bj38, así como lectinas vegetales (De Hoff y col., 2009; Hirsch, 1999).

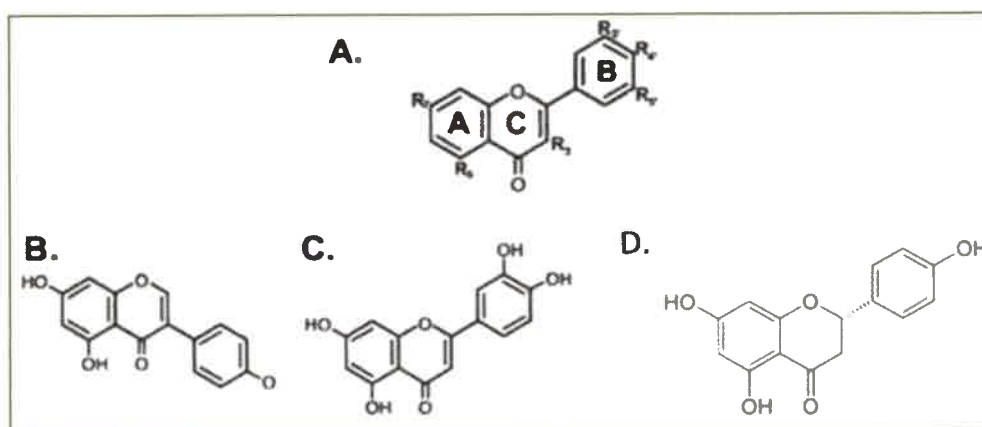


Figura 1.2. Estructura de flavonoides. A: Estructura general de flavonoides. B, C y D: flavonoides que inducen genes *nod*: B, genisteína; C, luteolina y D, naringenina.

Los genes bacterianos de la nodulación, *nod*, *nodI* y *nodE*, son esenciales para la formación de nódulos en la mayoría de las plantas leguminosas. Se expresan en respuesta a los flavonoides producidos por la planta y su inducción está regulada, en parte, por NodD, una proteína reguladora

de la familia LysR común en todos los rizobios (Gottfert y col., 1992). Estos genes codifican enzimas que catalizan la síntesis de lipoquitooligosacáridos difusibles, denominados factores Nod, que actúan como una molécula señal de nodulación (Figura 1.3). Los factores Nod se comportan como una fitohormona e inducen cambios en la morfología de la raíz de la planta (Spaink, 2000; Blandergroen y Spaink, 1998).

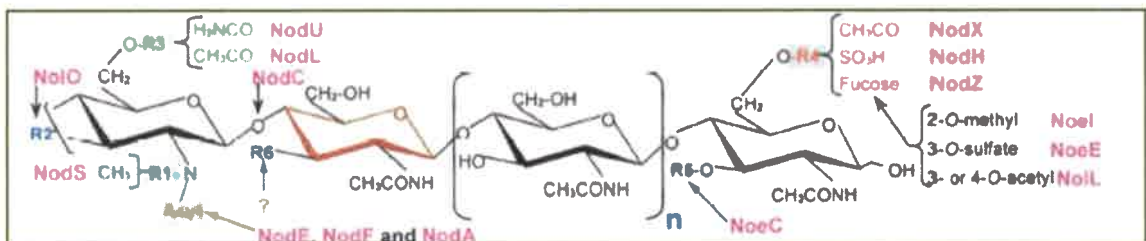


Figura 1.3: Estructura básica de los factores Nod y sus radicales más comunes. Las siglas R1, 2, 3, 4, 5 y 6 indican las posiciones de unión de los radicales. Las enzimas que sintetizan o acoplan cada uno de estos sustituyentes están indicadas en color rosa y a la derecha de cada radical en cuestión (Perret y col., 2000).

Por acción de los factores Nod algunos pelos radicales se curvan hasta 360°. Las bacterias atrapadas entonces en el pelo radical inducen la formación, por parte de la planta, de un tubo de composición similar a la pared celular, conocido como canal o hilo de infección, que avanza por el pelo radical. A continuación, la infección alcanza a las células de la corteza radical, y los factores Nod estimulan su división, produciendo finalmente el nódulo (Gage y Margolin, 2000). Las bacterias son liberadas desde el canal de infección al citoplasma de las células vegetales por un mecanismo similar al de endocitosis. Los rizobios quedan separados del citoplasma por una membrana derivada de la planta hospedadora denominada membrana peribacteroidal (MPB) y se dividen sincrónicamente. La fijación de nitrógeno no se inicia hasta que las bacterias no se han diferenciado en bacteroides. El sistema vascular de la planta se extiende dentro del nódulo y transporta nutrientes hacia y desde el nódulo.

Según su estructura los nódulos se han clasificado en indeterminados y determinados (Figura 1.4). El tipo de nódulo que se desarrolla está determinado por la planta hospedadora. Los nódulos indeterminados

son alargados y cilíndricos y se desarrollan mediante crecimiento distal desde el meristema apical persistente, mientras que los nódulos determinados son globosos y se desarrollan a partir de un meristema hemisférico no persistente. Algunos ejemplos de leguminosas que forman nódulos indeterminados son el trébol, la alfalfa, la arveja y el guisante. Por otro lado, los nódulos determinados son esféricos y la división celular cesa en el inicio de su desarrollo por lo que su forma final resulta del agrandamiento y no de la división de las células. Entre las plantas que forman nódulos determinados se encuentran la soja, el poroto y el maní.

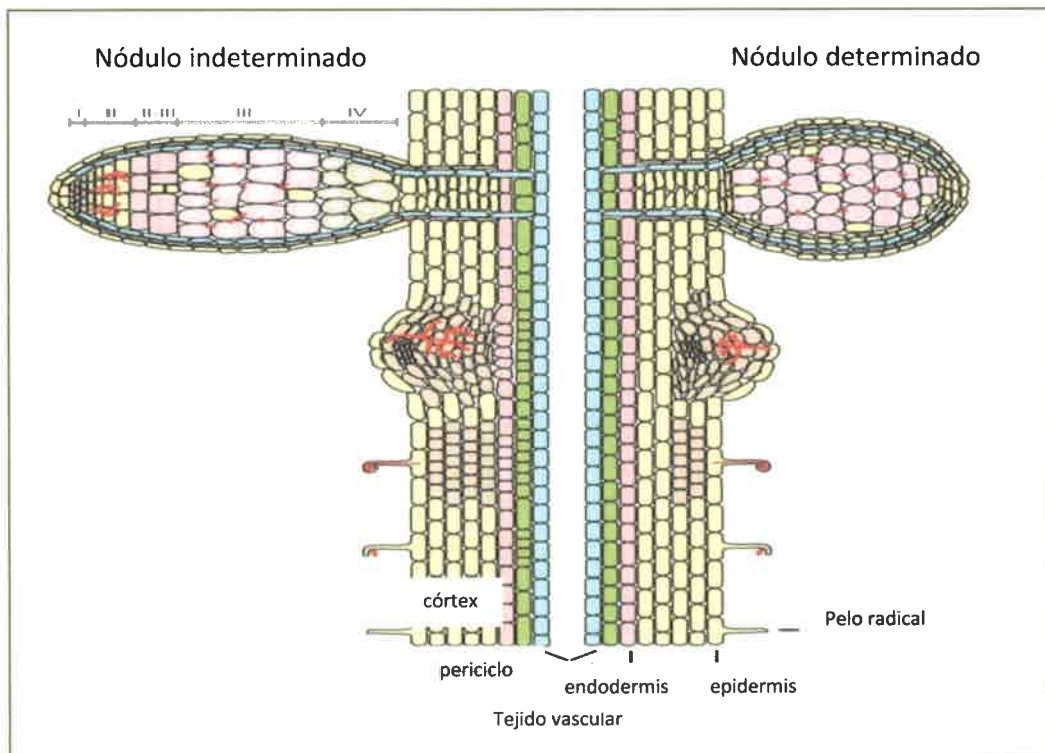


Figura 1.4: Estructura de nódulos determinados e indeterminados: Indeterminado: Meristema persistente (en corteza intena) (I: Meristema; II: Zona de infección; II-III: Interzona; III: Zona de fijación, IV: Zona de senescencia). Determinado: Meristema (en corteza externa) cuya actividad mitótica cesa en nódulos maduros.

La capacidad para formar nódulos efectivos varía entre los rizobios. Algunas cepas inducen la formación de nódulos (son infectivas), pero fijan poco o nada de nitrógeno (son inefectivas). En este caso no se establece la simbiosis, ya que la bacteria no aporta compuestos

nitrogenados a la planta, y en cambio obtiene de ésta sustratos carbonados.

Componentes de superficie de la bacteria requeridos para una simbiosis efectiva

Los factores Nod son, sin duda, inductores de las etapas iniciales de nodulación y la organogénesis de los nódulos (Kouchi y col., 2010; Downie, 2010). Sin embargo, existen otros requerimientos bacterianos para la formación de nódulos simbióticamente efectivos tales como la secreción de polisacáridos (Skorupska y col., 2006), la regulación de la biosíntesis de etileno en su planta huésped (Okazaki y col., 2004; Gresshoff y col., 2009), y los sistemas de secreción de proteínas (Deakin y Broughton, 2009). De hecho, los estados más tardíos del proceso de infección tales como la formación y elongación del canal de infección, así como la liberación de bacterias en el citoplasma de las células infectadas, requieren constituyentes de superficie de los rizobios. Se han aislado numerosas mutantes alteradas en sus polisacáridos de superficie que resultan defectivas en alguna de las etapas del proceso simbiótico (Reuber y col., 1991; González y col., 1996; Wang y col., 1999; Stougaard, 2000). Existe una gran cantidad de estudios relacionados con las estructuras de estas moléculas, los genes implicados en su biosíntesis, así como los fenotipos simbióticos de los diferentes mutantes y sus posibles funciones (Spaink, 2000 ; Gage, 2004). Dentro de los polisacáridos a los que se les ha atribuido importancia simbiótica se encuentran los exopolisacáridos (EPS), lipopolisacáridos (LPS) (principal componente de la membrana externa de todas las bacterias Gram negativas), los polisacáridos capsulares (CPS), y los glucanos $\beta(1-2)$ cíclicos periplásmicos (Frayse y col., 2003; Lepek y D'Antuono, 2005).

a) Exopolisacáridos (EPS)

Los EPS de los rizobios, al igual que los de otras Proteobacterias, consisten en heteropolímeros formados por unidades repetitivas. Las cepas silvestres de rizobios suelen producir grandes cantidades de EPS y forman colonias muy mucosas en los medios de cultivo. Se han elucidado las estructuras de los EPS producidos por diferentes cepas

rizobianas. Los componentes sacarídicos encontrados mayoritariamente son D-glucosa, D-galactosa, D-manosa, L-ramnosa, ácido D-glucurónico (GluA) y ácido D-galacturónico (GalA). Adicionalmente, el heteropolímero está modificado con residuos acetato, piruvato, y succinato, entre otros (Becker y Pühler, 1998; Skorupska y col., 2006). Debido a que los EPS son polímeros extracelulares altamente ionizados y abundantes en la superficie celular, se postula que funcionarían protegiendo a la bacteria en vida libre de factores abióticos y favoreciendo la unión a superficies. Se ha sugerido además, que los EPS actuarían como una molécula señal durante el proceso simbiótico. Esta hipótesis se basa en resultados obtenidos por numerosos autores, quienes mostraron que durante la interacción entre mutantes de *S. meliloti* Rm1021 Exo⁻ y alfalfa (*M. truncatula*), los nódulos desarrollados son pequeños, carentes de un meristema persistente, y con muy pocos bacteroides, incapaces de fijar nitrógeno (Fix⁻) (Finan y col., 1985; Leigh y col., 1985). Dado que el fenotipo Fix⁻ de las mutantes Exo⁻ se revierte por el agregado de muy bajas concentraciones de EPS de bajo peso molecular, se especula que estas moléculas serían reconocidas específicamente por la planta hospedadora, y por lo tanto actuarían como señales durante el proceso simbiótico (González y col., 1996; Wang y col., 1999). Se ha descrito que el succinoglicano estaría involucrado en la organización del citoesqueleto del pelo radical favoreciendo el crecimiento polar del hilo de infección en extensión (Cheng y Walker, 1998; Pellock y col., 2000). También se ha sugerido que los EPS podrían enmascarar estructuras de la bacteria que de otro modo dispararían reacciones de defensa de la planta, incompatibles con la simbiosis (Niehaus y col., 1997; van Workum y col., 1998, Morgante y col., 2007). Una de las observaciones más interesantes realizadas en este campo, está relacionada a la diferente función de estos polisacáridos, según la ontogenia del nódulo. A pesar de algunas excepciones, se encuentra ampliamente demostrado que los EPS son requeridos para el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno sólo en plantas que son infectadas vía hilos de infección y que forman nódulos indeterminados (Cheng y Walker, 1998; van Workum y col., 1998; Pellock y col., 2000). En plantas de maní, cuya infección ocurre por

“crack-entry” se ha demostrado que la formación de nódulos determinados requiere de la presencia de EPS (Morgante y col., 2005), los que serían requeridos para proteger a la bacteria de las reacciones de defensa de la planta (Morgante y col., 2007).

b) Polisacáridos Capsulares (CPS)

La cápsula de los rizobios, así como la de enterobacterias, se encuentran formando una matriz hidratada que protege a las bacterias contra diferentes factores abióticos. Se ha propuesto que este polisacárido, junto con los LPS, constituye uno de los componentes importantes para la adaptación al medio que las rodea, así como para la interacción con otras células. En este último aspecto, tanto a los CPS como a los LPS se les ha adjudicado el rol de proteger a las bacterias patógenas de los mecanismos de defensa de sus hospedadores. Reuhs y col. (1993) describieron por primera vez que *Sinorhizobium fredii* USDA205 y *Sinorhizobium meliloti* AK631 producen un tipo de polisacárido estructuralmente relacionado a los antígenos del grupo II K de *E. coli*. La porción polisacarídica de estos CPS está comúnmente unida a fosfolípidos de membrana, y posee un alto contenido de ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosónico (KDO).

A partir de los trabajos realizados por Reuhs y col. (1993; 1995) y Pellock y col. (2000), entre otros, se pudo concluir que: 1) los CPS de los rizobios son antígenos específicos de cepa, a diferencia de lo observado para los EPS, 2) los antígenos capsulares pueden sustituir a los EPS pero para su funcionalidad requerirían de ciertas características estructurales, y 3) debido a que esta matriz se encuentra rodeando la bacteria, y no es secretada al medio, su función sería requerida en pasos posteriores al contacto de la bacteria con la planta hospedadora, como por ejemplo para la iniciación y extensión de los hilos de infección (Frayse y col., 2003).

c) Lipopolisacáridos (LPS)

Como en muchas otras bacterias Gram negativas, el LPS es un importante componente de la membrana externa y está compuesto por tres dominios: el lípido A, el *core* de oligosacárido y el antígeno O. El lípido A es un ancla hidrofóbica que une la molécula de LPS a la capa

más superficial de la membrana externa bacteriana. En general consiste en un disacárido de 2,3 diamino glucosa o glucosamina, el cual se encuentra unido al core por una molécula de KDO mediante una unión O-6. El antígeno O es una cadena polisacáridica de alto peso molecular, que es altamente variable entre cepas y le confiere propiedades antigénicas. Hasta el momento se han caracterizado completamente el lípido A de *R. etli*, *R. leguminosarum* y *Rhizobium* spp. NGR234 (Kanipes y col., 2003; Sharypova y col., 2003; Ferguson y col., 2005).

Una característica que comparten distintas especies de rizobios es que el lípido A contiene ácidos grasos de cadena larga. La estructura del core fue determinada para numerosos géneros de la familia *Rhizobiaceae*. Todos ellos presentan ciertas características que les son comunes, y que los diferencia de las estructuras descritas para enterobacterias. Entre estas características se puede mencionar la ausencia de heptosas y fosfatos, la abundancia de GalA, y la particular unión al antígeno O por medio de KDO. La composición del antígeno O puede ser muy variable, incluso entre cepas pertenecientes a una misma especie de rizobio. Las unidades del antígeno O pueden contener ácidos urónicos, heptosas y KDO, pero generalmente se encuentran enriquecidos en residuos de deoxi- y/o metildeoxiazúcares (Choma y col., 2000; Forsberg y col., 2000). Existen antecedentes que indican que mutantes de rizobio que carecen de antígeno O, son defectivos en el proceso de infección (Mathis y col., 2005; Noel y col., 2000, 2004). Se postulan diversas funciones para este polisacárido, y cada uno de sus componentes sería importante para llevarlas a cabo. En contraste con el requerimiento de EPS para la formación de nódulos indeterminados, el LPS de los rizobios parece ser necesario para el establecimiento de simbiosis fijadoras de nitrógeno tanto en plantas que desarrollan nódulos determinados como en aquellas que desarrollan nódulos indeterminados, aún cuando dicho requerimiento pareciera ser más estricto para las primeras (Lerouge y Vanderleyden, 2002; Noel y col., 2000). Dado que todas las mutantes en el LPS son capaces de infectar la planta huésped, se ha sugerido que este polisacárido sería requerido en etapas posteriores de la simbiosis tales como la liberación

desde el hilo de infección y la invasión de las células corticales, modulando la respuesta de defensa de la planta hospedadora (Albus y col., 2001). Por otra parte, se postuló que el LPS sería necesario para el correcto establecimiento y desarrollo del simbiosoma. En este sentido se describió un cambio en las propiedades fisico-químicas del LPS en condiciones endosimbióticas (Kannenberg y Carlson, 2001).

d) Glucanos Cíclicos Periplásmicos (GCP)

Estos polisacáridos de bajo peso molecular se ubican en el espacio periplásmico de Proteobacterias. Si bien existen diferencias entre los GCP provenientes de diferentes especies bacterianas, todos poseen D-glucosa (variables, entre 5 y 24 en la mayoría de los casos) unidas por enlaces β (Breedveld y Miller, 1994).

Se ha postulado que los glucanos $\beta(1-2)$ cíclicos tendrían un rol relevante en la adaptación de los rizobios a condiciones de baja osmolaridad del medio circundante. Estudios realizados en diferentes cepas de *Rhizobium*, *Sinorhizobium* y *Bradyrhizobium* muestran una importante acumulación de GC dentro del espacio periplásmico como una respuesta adaptativa al crecimiento en medios hiposmóticos (Cangelosi y col., 1990; Dylan y col., 1990). Otros autores propusieron que el esqueleto carbonado de estas moléculas podría actuar como una señal positiva para la simbiosis durante el proceso de infección. Esta especulación se basa en que el número de nódulos y la velocidad de la nodulación se incrementan cuando los rizobios se cultivan en medios suplementados con glucanos $\beta(1-2)$. Finalmente, se ha propuesto que los GCP cumplirían la importante función de regular ciertas respuestas de la planta frente a la invasión de los rizobios (Frayse y col., 2003; Lepek y D'Antuono, 2005).

Quorum sensing en microorganismos

Durante muchos años se ha considerado que las bacterias se comportan como organismos aislados incapaces de relacionarse entre ellos.

Recientemente se ha demostrado su habilidad para percibir las condiciones ambientales que los rodean y comunicarse mediante

compuestos químicos, o autoinductores (AI), difusibles a través de la membrana celular, que se liberan al medio.

Conforme aumenta la densidad celular de la población, el autoinductor se acumula hasta que, al alcanzar una concentración determinada, se incorpora nuevamente al interior de la célula donde interacciona con proteínas activadoras de la transcripción que, a su vez, inducen la expresión de los genes específicos que regulan. Este mecanismo les permite a los microorganismos coordinar su comportamiento ya que, frente a los cambios continuos que se producen en el medio, deben reaccionar de manera rápida para adaptarse y sobrevivir. El sistema de comunicación célula-célula que emplea AI producidos en respuesta a la densidad celular de la población de microorganismos, se ha denominado "*quorum sensing*" (QS).

Se han identificado en diversos microorganismos sistemas de regulación que funcionan como mecanismo de comunicación intercelular dependiente de QS. En todos los casos controlan funciones de comportamiento o fisiológicas muy diversas, entre ellas, bioluminiscencia, transferencia de plásmidos por conjugación, producción de antibióticos y bacteriocinas, expresión de factores de virulencia, formación de biopelículas, motilidad, expresión de genes de la rizosfera, producción de polisacáridos, etc. Todas estas funciones tienen en común que sólo se ejecutan si el número de células de la población del microorganismo es lo suficientemente alto como para asegurar el éxito del proceso (Fuqua y col., 1994).

Los fenómenos de autoinducción se describieron por primera vez en la bacteria simbiótica marina *Vibrio (Photobacterium) fischeri* para explicar la generación de bioluminiscencia en el interior de los órganos especializados que poseen algunas especies de peces y calamares con los que se asocia. En *V. fischeri*, la emisión de luz está controlada por las proteínas LuxR y LuxI. Esta última es una lactona sintasa que interviene en la producción de N-(3-oxohexanoil)-L-homoserina lactona que, al alcanzar concentración adecuada, se une a la proteína reguladora LuxR que, a su vez, activa la transcripción de los genes del operón *luxCDABE* dando lugar al fenómeno de bioluminiscencia. La

emisión de luz en el interior del calamar protege a *V. fischeri* del ataque de sus depredadores naturales (Visick y McFall-Ngai, 2000). Además de LuxR/I, se han descrito otros mecanismos de QS, tales como los sistemas LuxM/AI-1 y LuxS/AI-2, típicos de bacterias Gram negativas. Las moléculas autoinductoras de estas bacterias pertenecen principalmente al grupo de acil homoserina lactonas (AHLs), compuestas por un anillo conservado de homoserina lactona y una cadena acilo de longitud variable. Según la longitud del sustituyente, se han clasificado en AHLs de cadena corta, que contienen de 4 a 8 carbonos, y AHLs de cadena larga cuya longitud varía entre 10 y 18 carbonos. La longitud y el grado de saturación de los acilos, así como la presencia o ausencia de sustituyentes oxo o hidroxilo en la posición 3 de la misma, le otorgan variabilidad y especificidad a la molécula (Figura 1.5) (González y Keshavan, 2006; Teplitski y col., 2003).

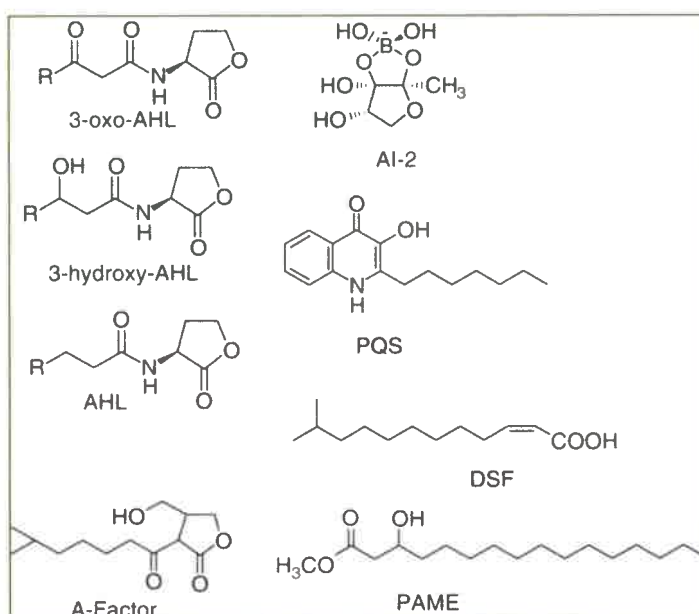


Figura 1.5: Estructuras de algunas moléculas señal autoinductoras: 3-oxo-AHL, *N*-(3-oxoacil)homoserina lactona; 3-hydroxy-AHL, *N*-(3-hidoxiacil)homoserina lactona; AHL, *N*-acilhomoserina lactona, el grupo R acilo puede tener longitud desde 1 a 18 carbonos y contener insaturaciones; A-factor, 2-isocaprilolil-3-hidroxi-metil-γ-butirolactona; AI-2, autoinductor-2, furanosil borato forma éster; PQS, *Pseudomonas* quinolona señal; 2-heptil-3-hidroxi-4(1*H*)-quinolona; DSF, 'factor difusible', ácido metil dodecenoico acid; PAME, hidroxil-ácido palmítico metil éster.

En las bacterias Gram positivas, los sistemas de QS se caracterizan porque los AIs son péptidos modificados. Por otra parte, AI-2 es una molécula señal global presente tanto en bacterias Gram positivas como negativas (González y Keshavan, 2006). Se han encontrado, aunque con menor frecuencia, otras moléculas que pueden actuar como autoinductores, tales como 4-quinolonas, dicetopiperazinas, ácido metildodecanoico, furanosil borato, tiolactona cíclica, ácido farnesoico, ácido palmítico, bradyoxetina, etc. (Shiner y col., 2005; Zhang y Dong, 2004; Loh, 2002a).

Comunicación interespecífica entre microorganismos

Aún cuando muchos estudios se han centrado en desentrañar la red de QS que opera en bacterias de la misma especie, este enfoque resulta limitado ya que en el hábitat de la mayoría de ellas se encuentran múltiples especies bacterianas y otros organismos superiores (Pacheco y Sperandio, 2009). En estas comunidades multi-especies/multi-reinos, cada grupo representativo puede interactuar de distinta manera, mediante las redes de señalización de QS que se establecen. Si bien algunas de las interacciones entre las especies pueden ser cooperativas, también es posible la existencia de conflictos (Keller y Surette, 2006). Así, por ejemplo, los organismos de un grupo pueden interceptar las señales generadas por otro. Independientemente de cómo se procesan las señales, la respuesta será un cambio en el comportamiento colectivo de la comunidad en su conjunto o de alguna de las especies que la constituyen (Ryan y Down, 2008). De hecho, los estudios realizados con biosensores de AHLs, tales como *Chromobacterium violaceum* y *Agrobacterium tumefaciens* demostraron que la señal generada por una especie puede ser detectada por otra especie que no sintetiza la misma molécula señal (Ahmer, 2004; Diggle y col., 2007a). Por otra parte, se han descrito para distintas especies bacterianas la inducción o modificación de respuestas por acción de AHLs producidas por otro microorganismo (Atkinsons y Williams, 2009; An y col., 2006; Choudhary y Schmidt-Dannert, 2010).

Quorum sensing en la interacción *Rhizobium*-leguminosas

La comunicación intercelular planta-bacteria mediada por señales químicas es un hecho bien conocido. Los mecanismos de regulación basados en QS también se han descrito en bacterias que interactúan con plantas para establecer asociaciones tanto simbióticas como patogénicas. La percepción e interpretación de las señales producidas por cada uno de los organismos que interviene en la interacción da lugar a un diálogo molecular que resulta en el establecimiento de dichas asociaciones.

Un ejemplo bien conocido de comunicación intercelular mediada por señales químicas es el que ocurre en la asociación simbiótica *Rhizobium*-leguminosa. Está demostrado que ciertos fenómenos de la interacción *Rhizobium*-leguminosa como la eficiencia de la nodulación, el desarrollo del simbiosoma, la producción de exopolisacáridos y la fijación de nitrógeno están regulados por QS (González y Marketon, 2003) (Tabla 1.1).

Tabla 1.1: Moléculas involucradas y fenómenos regulados por QS en diversas especies de rizobios.

Organismo	Acil homoserina lactonas (AHLs) presentes	Sistema de regulación	Fenómeno regulado por quorum sensing
<i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	C ₆ -HL	<i>rhlR/rhlI</i>	Eficiencia de nodulación
<i>R. etli</i> CNPAF512	Cadena larga hidroxilada de HL	<i>cinR/cinI</i>	Fijación de nitrógeno, desarrollo de simbiosoma, inhibición del crecimiento
	HLs de cadena corta	<i>raiR/raiI</i>	Fijación de nitrógeno, inhibición del crecimiento
<i>R. etli</i> CFN42	3-Oxo-C ₈ -HL	<i>traR/tral</i>	Transferencia de plásmido
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	3-Oxo-C ₈ -HL	<i>traR/tral</i>	Transferencia de plásmido, inhibición del crecimiento
<i>S. meliloti</i> Rm1021	C ₁₂ -AHL	<i>sinR/sinI</i>	Producción de EPS
	3-Oxo-C ₁₄ -HSL		
	C _{16.1} -HSL C ₁₈ -HSL		
	3-Oxo-C _{16.1} -HSL		
<i>Bradyrhizobium</i> sp	Bradioxetina (no es AHL)		Activación de genes <i>nod</i>

Quorum sensing en *R. leguminosarum* bv. *viciae* A34

En *R. leguminosarum* bv. *viciae* A34, el microsimbionte del guisante (*Pisum sativum*), lenteja (*Lens*), vicia (*Vicia*) y arveja (*Lathyrus*), se han

detectado tres sistemas de QS del tipo LuxR/I, denominados CinR/I, RhiR/I, y TraR/I-BisR, que intervienen en la inhibición del crecimiento de otros rizobios (Lithgow y col., 2000), en la nodulación (Cubo y col., 1992), y en la transferencia del plásmido simbiótico (Wilkinson y col., 2002), respectivamente. Se ha descrito un cuarto sistema, denominado RaiR/I (Wisniewski-Dye y Downie, 2002), cuya función se desconoce. Estos sistemas se interrelacionan y constituyen un complejo sistema de autorregulación.

El sistema RhiR/I, cuya síntesis está codificada por los genes *rhiRI* del plásmido simbiótico pRL1J1, está compuesto por el regulador transcripcional RhiR y la homoserina lactona sintasa Rhil. La expresión de RhiR, que a su vez controla la expresión de *rhil* y del operón *rhiABC*, depende de la ausencia de flavonoides en el medio. Rhil interviene en la síntesis de las AHLs C6-HL, C7-HL y C8-HL (Rodelas y col., 1999). El operón *rhiABC*, que se expresa en la rizosfera, parece intervenir en la eficiencia de nodulación de leguminosas durante fases tempranas del proceso simbiótico (Cubo y col., 1992; Frederix y col., 2011).

Quorum sensing en *R. etli* CNPAF512

R. etli CNPAF512 es una bacteria simbiote de poroto (*Phaseolus vulgaris*), en la que se han descrito dos sistemas de autoinducción del tipo LuxR/I: RaiR/I y CinR/I. Los genes que codifican dichos sistemas se localizan en el cromosoma de la bacteria e intervienen en la síntesis de siete AHLs diferentes de las que sólo se han purificado e identificado uno de los productos de *cinI*, el autoinductor 3-hidroxi-acil-homoserina lactona, (3OH-(slc)-HL) (Daniels y col., 2002; Lithgow y col., 2000). El sistema CinR/I sintetiza el AI 3-hidroxi-(slc)-HL, similar a la 3-hidroxi-C14-HL, inhibidora del crecimiento de otros rizobios y también implicada en los procesos de fijación de nitrógeno y desarrollo del simbiosoma (Daniels y col., 2002; Tun-Garrido y col., 2003). De las restantes moléculas autoinductoras, aunque no están identificadas, se conoce que son AHLs de cadena corta, hidroxiladas de cadena larga (González y Marketon, 2003). El sistema RaiR/I está implicado en la síntesis de AHLs de tamaño medio, cuya función se desconoce aunque parece estar relacionada con el proceso de simbiosis (Rosemeyer y col., 1998). La

expresión del regulador transcripcional RaiR, depende positivamente de las AHLs de cadena larga sintetizadas por CinI.

Quorum sensing en *S. meliloti* Rm1021

En *S. meliloti* Rm1021, simbiote de alfalfa (*Medicago sativa*), se han descrito los sistemas de regulación por QS SinR/I y Mel, ambos localizados en el cromosoma bacteriano. El primero es un sistema del tipo LuxR/I, mientras que en el segundo, que no está completamente descrito, la sintasa parece presentar homología con la proteína HdtS de *Pseudomonas fluorescens* y se desconoce su función (Figura 1.6).

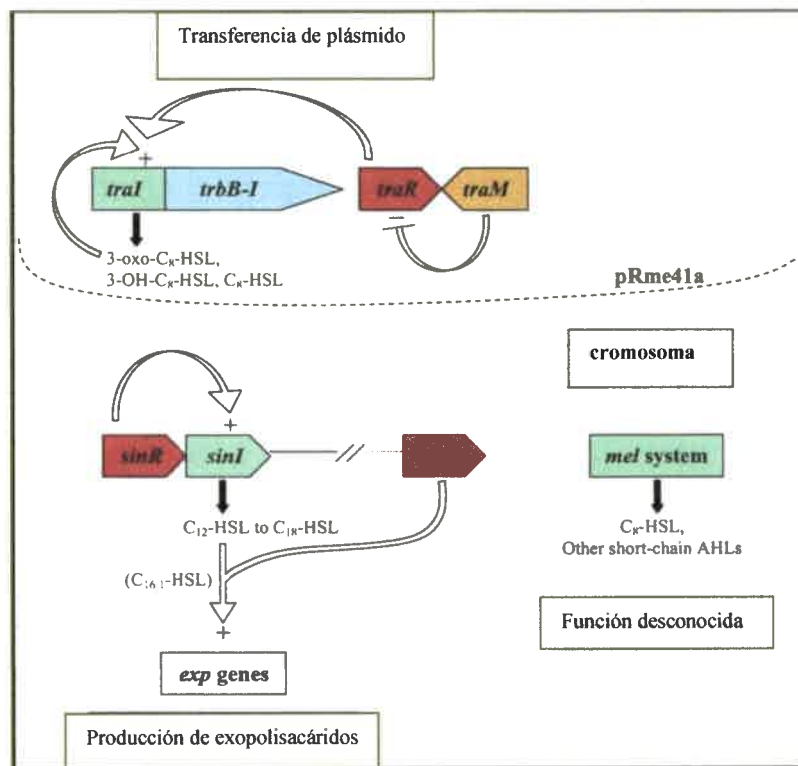


Figura 1.6: Sistemas de QS en *S. meliloti* Rm1021. El esquema muestra los sistemas regulados por QS en la cepa Rm1021 de los que se conoce que SinR/I intervienen en la fijación de nitrógeno y en la producción de exopolisacáridos (González y Marketon, 2003).

El sistema SinR/I interviene en la producción de AHLs de cadena larga implicadas en la fijación de nitrógeno. SinR/I también se relaciona con la síntesis de exopolisacáridos del tipo EPSII cuyo papel es esencial en la fase de colonización de la raíz por la bacteria y en la formación de nódulos fijadores (Marketon y col., 2002b). La producción del exopolisacárido depende de la unión del regulador ExpR al autoinductor

C16-HL, sintetizado exclusivamente por *SinI*. Por lo tanto, una cepa mutante en *sinI* es incapaz de colonizar la raíz de la planta y de formar nódulos fijadores (Gurich y González, 2009).

Quorum sensing en el género *Bradyrhizobium*

En *B. japonicum*, el microsimbionte de la soja (*Glycine max*), las proteínas NodVW y NwsB (Gottfert y col., 1990; Sanjuan y col., 1994, Loh y col., 2002b), al igual que la NodD1, activan los genes de la nodulación en presencia del isoflavonoide genisteína. Otras dos proteínas, NoIA (Sadowsky y col., 1991) y NodD2 (Göttfert y col., 1992) intervienen en el mecanismo de regulación que reprime la expresión de los genes de la nodulación en respuesta a los niveles de la señal de *quorum sensig* (Loh y col., 2001) (Figura 1.7).

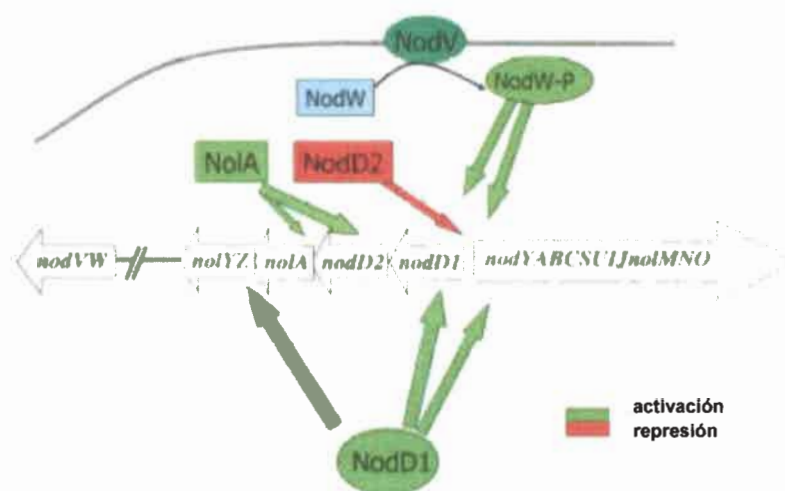


Figura 1.7: Regulación de la nodulación en *B. japonicum*. En respuesta a la genisteína, NodD1 y NodVW activan los genes *nod* responsables de la síntesis de factores Nod. NoIA y NodD2 reprimen la expresión de genes *nod* (Loh y Stacey, 2003).

También se demostró que NoIA y NodD2 modulan la expresión de los genes *nod* de una manera dependiente de la densidad celular. De este modo, la inducción de los genes *nod* es máxima en cultivos con baja densidad celular y disminuye drásticamente en cultivos más densos. Esta dependencia de la densidad celular está ausente en una mutante *noIA*, ya que los genes *nodYABC* están desreprimidos, incluso a elevadas densidades celulares (Loh y col., 2001). Dado que la expresión de las fusiones *noIA-lacZ* y *nodD2-lacZ* no se expresan en

una mutante *nsw*, el control por QS de los genes *nod* requiere de la proteína NwsB sintetizada por dicho gen.

Loh y col. (2001 y 2002a), también han demostrado en *B. japonicum* USDA110 la existencia de una molécula que se acumula en el medio de cultivo conforme aumenta la densidad celular de la población, la que se ha denominado CDF (Cell Density Factor). La purificación de CDF ha revelado que la molécula está constituida por dos anillos aromáticos unidos por un grupo imino, y que cada anillo presenta un grupo aminooxetano en posición *p*. A dicha molécula se le ha denominado bradioxetina y su estructura molecular propuesta es 2-{4-[[4-(3-aminooxetano-2-il)fenil]-(imino)metil]fenil}oxetano3-ilamina (Figura 1.8).

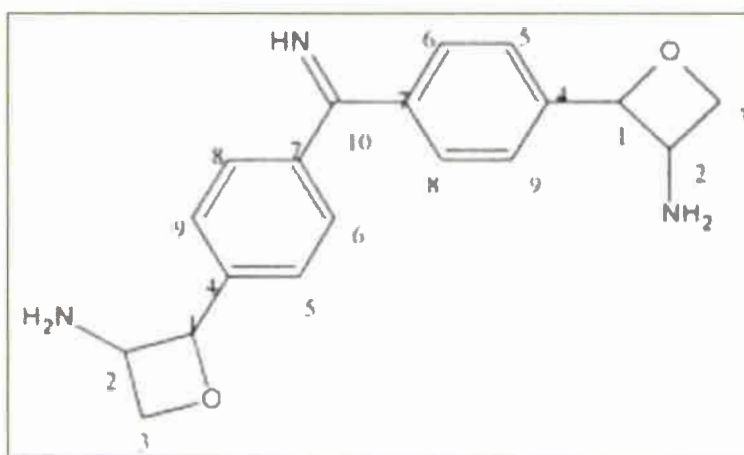


Figura 1.8: Estructura de la bradioxetina

Los mismos autores han demostrado que la expresión de *nolA* se inhibe en presencia de concentraciones elevadas de Fe³⁺ y que la síntesis de bradioxetina depende del contenido en Fe³⁺ del medio de cultivo. En base a estos resultados propusieron que, además de poseer actividad autoinductora, la bradioxetina podría funcionar como un sideróforo (Loh y col., 2002a). De hecho, la estructura molecular de la bradioxetina es similar a la de los sideróforos (Drechsel y Jung, 1998). No obstante, se ha comprobado que, en vida libre, la bradioxetina no actúa como un sideróforo de alta afinidad, por lo que se ha sugerido que podría tratarse de un sideróforo específico de nódulos, cuya actividad se pondría de manifiesto en condiciones limitantes de Fe³⁺ en el

simbiosoma (Loh y col., 2002a). Que el hierro esté implicado en la regulación de la nodulación no es sorprendente, puesto que es un elemento clave tanto para el desarrollo del nódulo como para el funcionamiento de la nitrogenasa, de la oxidasa terminal *cbb3* y de otros citocromos (Johnston y col., 2001). La presencia de dos anillos oxetano en la bradióxetina podría conferirle capacidad antibiótica, dado que su estructura es similar a la del antibiótico oxetina producido por el actinomiceto *Streptomyces* sp. OM2317 (Omura y col., 1984). La oxetina inhibe el crecimiento de *Bacillus subtilis* y *Pyricularia oryzae*, y es un potente herbicida que afecta a plantas de alfalfa (Omura y col., 1984). Además se ha demostrado que proteínas de la familia MerR, como lo es Nola se activan en presencia de compuestos tóxicos, aportando a la bacteria protección frente a situaciones de estrés y una importante ventaja competitiva frente a otros rizobios en el proceso de nodulación (Thorne y Williams, 1999).

De 142 cepas de *Bradyrhizobium* analizadas para comprobar la producción de AIs, sólo el 22% produjo AHLs. Todas las cepas con actividad autoinductora fueron de las especies *B. japonicum* y *B. elkanii*, y la producción de AHLs varió con el tipo de medio de cultivo y el tiempo de incubación (Pongsilp y col., 2005). Al menos una de las cepas estudiadas, *B. japonicum* USDA 290 produjo dos AI, cuya estructura podría ser de tipo AHL.

Quorum sensing y polisacáridos rizobianos

Como se describió con anterioridad, los polisacáridos bacterianos son esenciales en diferentes etapas de la simbiosis efectiva entre los rizobios y el huésped específico. El hecho de que los sistemas de *quorum sensing* bacterianos afecten el proceso simbiótico, permite plantear la posibilidad de que regulen la producción de polisacáridos.

Con respecto a los EPS, Pellok y col. (2002) demostraron que la síntesis de EPSII en la especie *S. meliloti*, requiere de una copia funcional del gen *expR*, cuyo producto proteico tiene homología con reguladores de QS del tipo lux R, lo que sugiere que la síntesis de EPS de alto peso molecular está regulada por señales de *quorum*. Por otra parte, Marketon y col. (2003) demostraron que una mutante *sinI* de

esta especie de rizobio, afectada en el sistema de *quorum* sinRI, era incapaz de producir EPSII y de inducir nodulación efectiva. Este fenotipo fue revertido agregando AHLs sintéticas al medio o AHLs extraídas del sobrenadante de cultivo de una cepa *wild type*. Estos hallazgos enfatizan el rol del sistema de sensado de *quorum* en la simbiosis. En otras interacciones bacteria-huésped, como la patogenia, se ha encontrado que los sistemas de *quorum* regulan la síntesis y transporte de EPS y también la producción de varias proteínas de membrana (Uzureau y col., 2007; Koutsoudis y col., 2006).

En cuanto a los LPS, en el patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, se ha encontrado que el gen, *migA* codifica para una glicosiltransferasa involucrada en la biogénesis de LPSs, es inducible por el mucus de pacientes con fibrosis quística y también responde a un sistema de *quorum sensing* bacteriano, modificando los LPSs de bajo peso molecular (Yang y col., 2000).

Estos estudios apoyan la hipótesis de que los autoinductores bacterianos podrían modificar la síntesis y nivel de expresión de polisacáridos intervinientes en la simbiosis rizobio-leguminosa. Específicamente en la interacción soja-*B. japonicum*, la información hasta ahora disponible, permitiría proponer que la escasa capacidad competitiva de las cepas contenidas en los inoculantes aplicados a campo se relaciona con las altas densidades de bradirizobios en su formulación. Se desconoce hasta el momento si idénticos efectos son producidos en otras especies rizobianas como consecuencia de señales que se disparan por la acción del sistema de percepción del *quorum*.

Hipótesis y Objetivos

En nuestro país, el cultivo de diferentes leguminosas es de suma importancia económica. En los últimos años se ha incrementado marcadamente el área de siembra de soja en distintas regiones geográficas. Además, con respecto a la leguminosa maní, Argentina es uno de los principales exportadores a nivel mundial. En muchos casos, la producción de leguminosas está asociada a la aplicación de inoculantes comerciales los cuales son producidos e introducidos en el suelo en altas densidades celulares.

Este trabajo de tesis se desarrolló con el fin de establecer la relación entre el fenómeno de QS y diferentes aspectos que hacen al comportamiento simbiótico de los microorganismos; utilizando como modelos, diferentes pares simbióticos de importancia agronómica regional.

Hipótesis

El comportamiento simbiótico de diferentes especies rizobianas frente a una especie vegetal, está influenciado por la densidad celular del cultivo bacteriano, según el fenómeno de QS, que regula la expresión de los genes *nod*, tal como ha sido descrito sólo para algunos rizobios.

Objetivos

- a) Analizar la producción de moléculas *quorum* y su efecto sobre la expresión de genes de nodulación, en especies rizobianas que se asocian simbióticamente a las leguminosas soja, maní, poroto y alfalfa.
- b) Evaluar si la molécula *quorum* afecta la infectividad y la capacidad de nodular de los rizobios.
- c) Determinar el efecto de la molécula *quorum* sobre la producción de otros componentes de la superficie rizobiana de importancia para el

establecimiento de la simbiosis tales como polisacáridos capsulares (CPS), exopolisacáridos (EPS) o lipopolisacáridos (LPS).

- d)** Analizar la influencia de la disponibilidad de nitrógeno y/o hierro así como de distintos estreses ambientales sobre la producción de dicha molécula señal.
- e)** Evaluar el efecto de la molécula señal producida por una especie rizobiana sobre la expresión de genes de nodulación de otras especies.
- f)** Establecer relaciones entre la influencia de la densidad de la población rizobiana presente en el suelo sobre la infectividad de las cepas inoculadas y la producción de moléculas *quorum*.

CAPITULO 2

Materiales y Métodos

Microorganismos y medios de cultivo

Cepas bacterianas y plásmidos

Las estirpes bacterianas y los plásmidos que se utilizaron durante el desarrollo de este trabajo de Tesis, se listan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Microorganismos y plásmidos

Microorganismo	Características relevantes	Referencia
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	Recomendada para inoculantes de poroto	Martínez Romero y col., 1991
<i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA 6144	Recomendada para inoculantes de mani	(MIRCEN, Brasil)
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	Recomendada para inoculantes de soja en Argentina	Cedidas por Ing. Alejandro Peticari - IMIZA- INTA Castelar
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	Recomendada para inoculantes de alfalfa	
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	Simbionte de soja, de crecimiento rápido	Madinabeitia y col., 2002. Cedida por Dra. Marta Dardanelli, UNRC
<i>Bradyrhizobium elkanii</i> U1302	Recomendada para inoculantes de soja en Uruguay	Cedida por Ing. Carlos Labandera, Uruguay
<i>Escherichia coli</i> S17-1		Simon y col., 1983
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> NT1-pZLR4	<i>A. tumefaciens</i> curada del plásmido pTiC58; <i>traG::lacZ</i> , <i>traR</i> ; GmR	Cha y col., 1998
<i>Chromobacterium violaceum</i> CV026	<i>C. violaceum</i> <i>cvil::mini-Tn5</i>	McLean y col., 1997
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> Bj110-573	fusión cromosomal <i>nodC::lacZ</i>	Dockendorff y col., 1994 Cedida por Dr. Gary Stacey Missouri, USA).
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT899-Y1	Portadora de plásmido TCD900, <i>nodY::lacZ</i> , Tc ^R	Este trabajo
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B399-Y4	Portadora de plásmido TCD900, <i>nodY::lacZ</i> , Tc ^R	Este trabajo
<i>Sinorhizobium fredii</i> HH103-A1	Portadora de plásmido pMP 154, <i>nodA::lacZ</i> , Tc ^R	Este trabajo
Plásmidos		
pRm M57	<i>nodC::lacZ</i> , Tc ^R	Cedido por Dr. Jorge Angellini, FCEFQyN, UNRC
TCD 900	<i>nodY::lacZ</i> , Tc ^R	Cedido por Dr. Gary Stacey (Missouri, USA)
pMP 154	<i>nodA::lacZ</i> , Tc ^R	Spaink, (1987) Cedido por Dra. Marta Dardanelli, FCEFQyN, UNRC

Medios de cultivo y evaluación de crecimiento microbiano

Para el cultivo de las cepas rizobianas se emplearon los siguientes medios:

YEM (Vincent, 1970): Manitol, 5 g; NaCl, 0,1g; extracto de levadura, 1 g; K_2HPO_4 , 0,5 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,2 g; agua deionizada, 1 L; pH $7,0 \pm 0,2$. Para preparar medio sólido (YEMA) se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L. Se esterilizó en autoclave a $120^\circ C$ durante 20 min.

20E (Werner y col., 1975): KH_2PO_4 , 86 mg; K_2HPO_4 , 87 mg; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 370 mg; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 73,5 mg; KNO_3 , 506 mg; $FeSO_4 \cdot H_2O$, 6,95 mg; EDTA, 9,3 mg; $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 4,84 mg; glicerol, 4,6 mL; manitol, 1,82 g; extracto de levadura, 2 g; agua deionizada, 1 l; pH $7,0 \pm 0,2$. Se esterilizó en autoclave a $120^\circ C$ durante 20 min.

MSM (Brown y Dilworth, 1975): Solución de sales ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 5g/L, NaCl 4 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,4 g/L, K_2HPO_4 1g/L), 50 mL; Fe-EDTA 15 g/L, 0,5 mL; Vitaminas y minerales ($NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 0,23 g/L, H_3BO_3 0,25 g/L, $MnSO_4 \cdot 2H_2O$ 0,14 g/L, $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,001 g/L, timina-HCl 1,0 g/L, pantotenato de Ca 2,0 g/L, biotina 0,001 g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0,02 g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,16 g/L), 0,5 mL; NH_4Cl 5M, 2 mL; buffer HEPES, 4,766g; fuente de carbono 0,5 M, 20 mL, agua deionizada hasta 1000 mL. Todos los componentes se esterilizaron en autoclave a $120^\circ C$ durante 20 min, excepto las vitaminas y la fuente de carbono y de nitrógeno, que fueron esterilizadas por filtración y agregadas al medio estéril.

M9 (Sambrook y col., 1989): Se prepararon por separado las soluciones stock, se esterilizaron y se preparó el medio con la siguiente composición: 200 mL sales 5X, 2 mL de $MgSO_4$ 1M, 20 mL de solución de fuente de carbono al 20% p/v y 0,1 mL de $CaCl_2$ 1M, se agregó agua deionizada estéril hasta 1000 mL. Para preparar medio sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L.

La cepa de *E. coli* se cultivó de forma rutinaria a $37^\circ C$ en medio LB (Luria-Bertani glucosado):

LB (Miller, 1972): NaCl, 5 g; triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; glucosa 1 g, agua deionizada, 1 l; pH $7,0 \pm 0,2$. Para preparar medio

sólido se adicionó agar bacteriológico a una concentración de 15 g/L. Se esterilizó en autoclave a 120°C durante 20 min.

Las cepas *C. violaceum* y *A. tumefaciens* fueron cultivados en medio LB y YEM respectivamente.

El número de microorganismos viables se estimó por recuento en placa y el crecimiento mediante la determinación de la absorbancia a 550 nm, la velocidad específica de crecimiento (μ) y el tiempo de generación (tg).

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas en agua deionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 μ m de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina se empleó una mezcla hidroalcohólica para disolver el antibiótico. La concentración final de los distintos antibióticos fue la que se indica en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Antibióticos

ANTIBIÓTICO	CONCENTRACIÓN (μ g/mL)		
	Rizobios	<i>E. coli</i>	Otros
Cloruro de espectinomicina x 2H₂O (Spc)	100	-	-
Sulfato de estreptomicina (Str)	200	-	-
Cloruro de tetraciclina x H₂O (Tc) La solución concentrada de Tc se preparó en etanol:agua (1:1).	100	10	-
Gentamicina	-	-	10
Kanamicina	-	-	5

Conservación de microorganismos

Para la conservación de las distintas cepas se utilizaron criotubos conteniendo alícuotas de cultivos adicionados de glicerol estéril a una concentración final del 30% p/v. Se almacenaron en freezer a -20°C.

Obtención de rizobios transconjugantes

Aislamiento de mutantes espontáneos de resistencia a antibióticos

Se aislaron mutantes espontáneos para estreptomina (str) y para espectinomicina (spc) en *S. meliloti*, *S. fredii*, y *R. tropici*, usando el protocolo descrito por Somasegaran y Hoben (1994).

Se sembraron 0,1 mL de cada cultivo en placas conteniendo: YEMA y str (100 µg/mL), YEMA y spc (250 µg/mL) y YEMA sin antibióticos. Se incubaron las placas a 25-30°C durante 5-9 días. Las colonias resistentes obtenidas se plaquearon en medio YEMA con Rojo Congo.

Preparación de células competentes de *E. coli*

Células de *E. coli* S17.1 fueron cultivadas durante 12-15 h en medio LB y se inoculó 1 mL en 20 mL de LB. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una DO₅₅₀ de 0,4-0,6 (fase logarítmica). Se detuvo el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 15 min. Se sedimentaron las células mediante centrifugación (6.000 rpm, 6 min, 4°C) y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 10 mL de Cl₂Mg 100 mM, estéril y enfriado a 4°C. Se incubó en hielo durante 15 min. Luego se centrifugó a 6.000 rpm durante 6 min y el pellet se resuspendió en 10 mL de solución de CaCl₂ 100 mM, estéril y preenfriada a 4°C y se incubó durante 30 min. Se centrifugó a 6.000 rpm durante 6 min y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 1,7 mL de CaCl₂ 100 mM y 0,3 mL de glicerol 20% p/v. Finalmente, se repartió la suspensión en alícuotas de 100 µL en tubos Eppendorf enfriados a 4°C que fueron conservados a -20°C.

Transformación de células competentes de *E. coli*

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico (pRm M57: *nodC::lacZ*, *Tcr*, TCD 900: *nodY::lacZ*, *Tcr* o pMP54 *nodA::lacZ*, *Tcr*), se siguió la técnica descrita por Mulligan y Long (1985) modificada como se indica a continuación:

Se descongelaron las alícuotas de 100 µL de células competentes manteniéndolas en hielo durante 15-20 min, se adicionaron 1, 3 y 5 µL del ADN plasmídico que se empleó para transformar. Luego se calentó a

42 °C durante 90 seg. Se dejó en hielo 2 min y se adicionó medio LB hasta un volumen final de 1 mL. Se incubó a 37°C durante 1 h, agitando suavemente cada 20 min. Se centrifugó y resuspendió en 200 µL de LB. Finalmente, para seleccionar las transconjugantes, las células transformadas se sembraron en placas de Petri con medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos. Se incubaron a 37°C durante una noche y las colonias obtenidas se utilizaron como dadoras para la conjugación posterior.

Transformación de rizobios mediante conjugación biparental

La transferencia de ADN plasmídico a *B. japonicum* se realizó mediante conjugación biparental y se utilizó como cepa donadora *E. coli* S17.1 transformada con el plásmido a transferir (pRm M57: *nodC::lacZ*, *Tcr* o TCD 900: *nodY::lacZ*, *Tcr*, pMP54 *nodA::lacZ*, *Tcr*).

Se centrifugó 1 mL de cultivos de la cepa donadora en fase logarítmica de crecimiento y de la cepa receptora en fase exponencial tardía. Ambos pellets fueron resuspendidos en 100µL de medio 20E.

Se agregaron 100µL del cultivo de *E. coli* al tubo que contenía los rizobios, se centrifugó y resuspendió el sedimento en 20 µL de 20E.

La mezcla resultante se depositó en un filtro estéril de nitrocelulosa, previamente colocado sobre placas de Petri que contenían medio 20E agarizado. Tras la incubación durante 48-72 h a 30°C (dependiendo de la velocidad de crecimiento del rizobio), las mezclas de conjugación se resuspendieron en 1 mL de medio 20E con 30% p/v de glicerol. Se sembraron en placas con medio 20E suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes.

Análisis genómico de cepas parentales, de mutantes espontáneas resistentes a antibióticos y de transconjugantes

a) Extracción de ADN a partir de colonias bacterianas

Se utilizó la técnica descrita por Walsh y col. (1991). Entre 3-5 colonias del cultivo se resuspendieron en 300 µL de NaCl 1M. Se homogeneizó con vortex durante 1-2 min y se centrifugó durante 3 min a 21.000 rpm. Se lavó el pellet en 300 µL de agua bidestilada estéril y se

centrifugó en las condiciones descriptas anteriormente. Se agregaron 150 µL de suspensión acuosa (6% p/v) de resina (Chelex 100, BIO-RAD) en agitación. Se incubó durante 20 min a 56°C y posteriormente, 8 min a 99°C. El ADN se conservó a -20°C hasta su utilización.

b) Obtención de perfiles de fingerprints de ADN

El protocolo de rep-PCR utilizado fue el descrito por Versalovic y col. (1994), con algunas modificaciones surgidas de ensayos de optimización.

Se utilizaron los *primers* ERIC sintetizados por Fagos/Ruralex, Argentina cuyas secuencias se muestran a continuación:

ERIC 1R: 5'-ATgTAAgCTCCTggggATTAC-3'

ERIC 2: 5'-AAgTAAgTgACTggggTgAgCg-3'

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 10 µL conteniendo: 1,5 µM de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 2,5µL de ADN, buffer de polimerasa 10mM Tris-HCl pH9, 3 mM MgCl₂, 0,55 U de *Taq* DNA polimerasa. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático (MJ Research PTC-100) con un ciclo de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización (94°C, 1 min), *annealing* (52°C, 1 min), y polimerización (65°C, 8min) y una extensión final a 65°C por 16 min. Los microtubos con los productos de reacción se almacenaron a -20°C hasta su posterior análisis.

Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 % p/v en *buffer* TBE 1x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 20 mM, pH 8,3) y se corrieron a 5 V/cm (constante).

Las bandas se revelaron sumergiendo los geles en una solución acuosa de bromuro de etidio (0,6 µg/mL) por 30 min y luego se lavaron con agua destilada por otros 30 min.

Los geles teñidos se observaron con un transiluminador de luz UV y se registraron usando un analizador de imágenes.

Los *fingerprints* obtenidos por ERIC-PCR se analizaron mediante inspección visual y utilizando el *software* Gel Compar.

Determinación del efecto de moléculas *quorum* sobre la expresión de genes de nodulación

a) Evaluación de producción de β -galactosidasa

Para evaluar la presencia del plásmido con la fusión *nod::lacZ* en los rizobios transconjugantes obtenidas, se sembraron placas de medio YEM que contenían 3.7 μ M del flavonoide específico, 100 μ g/mL de antibiótico Tc y 40 μ g/mL de X-gal. Se incubaron las placas 4-8 días, según la cepa y se evaluó la presencia de colonias azules. En la tabla 2.3 se muestran los flavonoides específicos para cada cepa estudiada.

Tabla 2.3: Relación específica flavonoide-rizobio

Microorganismo	Flavonoide
<i>S. meliloti</i> B-399	Luteolina
<i>R. tropici</i> CIAT 899	Naringenina
<i>S. fredii</i> HH103	Genisteína

b) Determinación de actividad β -galactosidasa

La inducción de genes *nod* se realizó en cepas transconjugantes de *R. tropici* y *S. meliloti* portadores de la fusión *nodY::lacZ* y *S. fredii* con la fusión *nodA::lacZ*, obtenidos en este trabajo de tesis. Dichas fusiones permiten cuantificar la inducción de genes *nod* indirectamente, por la expresión del gen *lacZ*, mediante la determinación de actividad β -galactosidasa.

Para ello, se siguió el protocolo descrito por Banfalvi y col. (1988). Se partió de suspensiones en MM de las cepas estudiadas, en la fase de crecimiento requerida para cada tratamiento. Alícuotas de dichas suspensiones se incubaron con una solución de flavonoides (concentración final 3.7 μ M), durante 18 h a 28°C. Luego, se tomaron 400 μ l de cada suspensión, se transfirieron a tubos Eppendorf y se les adicionaron 400 μ l de buffer Z (Na₂HPO₄·7H₂O, 16,2 g/L; NaH₂PO₄·H₂O, 5,5 g/L; KCL, 0,75 g/L; MgSO₄·7H₂O, 0,246 g/L, β mercaptoetanol 2,7 mL/l; pH=7), 50 μ l de cloroformo y 100 μ l de SDS 0.1% p/v estéril. Se agitaron durante 1 min y se agregó 150 μ l de ortofenil tio-galactósido

(ONPG) o rojo clorofenol-galactopiranosido (CPRG) como sustrato enzimático (4 mg/mL). Se incubaron a 37°C hasta la aparición de color rojo y se detuvo la reacción adicionando 400 µL de NaCO₃ 1M. Se centrifugaron las muestras a 14.000 rpm y se midió la absorbancia a 420 o 574 nm, según el sustrato utilizado.

La actividad β-galactosidasa se expresó en unidades Miller. Estas se obtuvieron por el siguiente cálculo (Miller, 1992):

$$\text{UNIDADES MILLER: } \frac{\text{DO}_{574} * 1000}{t \text{ VOL DO}_{600}}$$

$$\text{UNIDADES } \beta\text{-galactosidasa: } \frac{1000 (\text{DO}_{574} - 1.75 \text{ DO}_{550})}{t \text{ VOL DO}_{600}}$$

donde DO₅₇₄: Densidad óptica a 574 nm.

DO₅₅₀: Densidad óptica a 550 nm.

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm.

VOL: Volumen de cultivo en mL.

t: Tiempo de incubación en min.

En todos los casos se realizaron cinco réplicas.

Para cada caso se incluyeron los siguientes controles: a) sin el agregado de flavonoides, b) con el agregado del mismo volumen de metanol (solvente de la solución de flavonoides) que se adicionó a los tratamientos, y c) sin el agregado de los microorganismos.

Para evaluar el efecto de la adición de extractos de AHLs o de sobrenadantes de medios de cultivos de alta densidad celular, sobre la expresión de genes de nodulación se realizaron los siguientes tratamientos:

Tratamientos

A) Cultivo en Fase exponencial (DO: 0,05)

B) Cultivo en Fase exponencial resuspendido en el sobrenadante de cultivo en Fase estacionaria (DO: 2)

C) Cultivo en Fase estacionaria (DO: 2)

Procedimiento

- Se cultivaron microorganismos hasta fase exponencial del crecimiento (DO: 0.05) y fase estacionaria (DO: 2).
- Para el tratamiento B) se centrifugaron los cultivos en fase exponencial y el pellet celular se resuspendió en idéntico volumen de un sobrenadante de cultivo en fase estacionaria (el cual contiene las AHL). A todos los tratamientos se les agregó flavonoides específicos (hasta una concentración de 3,5 μM) con el objeto de inducir la expresión de genes de nodulación rizobianos. El tiempo de inducción fue de 5 h.

Evaluación de la expresión del gen *nodA* por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR)

a) Extracción de ARN

El ARN de estos cultivos fue extraído empleando un kit de extracción de ARN total Qiagen y *RNA protect bacteria reagent*, Qiagen.

Se resuspendieron los cultivos en dos volúmenes de *RNA protect bacteria reagent*, se centrifugaron durante 15 min a 5.000 rpm, se agregaron las soluciones buffer del kit y se separó el ARN en una columna *Rneasy mini spin*. Posteriormente se trataron con ADNasa y finalmente, se eluyó el ARN de la columna.

El contenido de ARN fue determinado en un fluorómetro Qubit, mediante el agregado de la solución *Quant-it working solution*. Para la retrotranscripción del ARN se utilizó el kit *Quantitect reverse transcription* (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADNc obtenido se amplificó por qPCR, en termociclador BioRad, con Sybr green como fluorómetro.

b) RT-PCR

Se determinó el nivel de expresión del gen *nodA*, y se utilizó como gen normalizador el gen *ADNr 16S*.

Las secuencias de los primers utilizados para amplificar el gen *ADNr 16S* de *S. fredii* HH103 fueron 5'GATACCCTGGTAGTCCAC3' y

R5'TAAACCACATGCTCCACC3' y para *nodA* de la misma cepa se utilizaron F5'CGTTCCGTTTCGCATTTGG3' y R5'AGACATCTGAAAGGGTGG3' (TIB Molbiol, Berlín, Alemania). Los datos se analizaron mediante el programa Opticon Monitor3.

Extracción de autoinductores de sobrenadantes de cultivos bacterianos

Cada uno de los microorganismos estudiados se cultivó en 2 L de medio MM₁ en las condiciones descritas, hasta llegar a la fase estacionaria de crecimiento. Se centrifugaron y se descartaron las células. Los sobrenadantes se extrajeron dos veces con acetato de etilo (1:1) y se separaron las fases orgánicas. Estos extractos fueron tratados con Na₂SO₄ anhidro para eliminar los restos de agua y concentrado en un rotavapor a 40°C, hasta reducir el volumen 200 veces con respecto al original del cultivo. Las muestras se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización.

Detección de autoinductores

La detección de autoinductores se llevó a cabo mediante los bioensayos que utilizan *C. violaceum* CV026 (Mc Lean y col., 1997) y *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 (Cha y col., 1998) como biosensores.

Bioensayo con *C. violaceum* CV026

C. violaceum CV026 es una cepa mutada en el gen *cvil*, mediante inserción del Tn5, incapaz de producir la sintetasa Cvil que interviene en la producción de 3-hexanoil homoserina lactona (C₆-HSL). Este compuesto, a su vez, induce la producción del pigmento violaceína, cuya producción se restaura mediante incubación con homoserina lactona exógena.

El protocolo de trabajo utilizado se detalla a continuación: Se cultivó *C. violaceum* CV026 en 5 mL de LB líquido durante 18 h. Sobre placas de Petri conteniendo medio LB se adicionaron 5 mL de medio LB semisólido (0.8% p/v de agar) suplementado con 5 µg/mL de kanamicina, e inoculado con 150 µL de una suspensión del cultivo de *C. violaceum* CV026. Luego de solidificado el medio, se realizaron pocillos en el agar, donde se sembró la muestra del extracto orgánico de

autoinductores, los controles respectivos y los sobrenadantes de cultivos de diferentes tratamientos. Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 h.

Bioensayo con *A. tumefaciens* NT1-pZLR4

A. tumefaciens NT1-pZLR4 es una cepa que carece del plásmido Ti y contiene el plásmido pZLR4 en el que se ha clonado el gen *traR* y una fusión *traG::lacZ*. Esta cepa es incapaz de producir su propio autoinductor, y la fusión *lacZ* sólo se expresa en presencia de moléculas autoinductoras exógenas.

El protocolo de trabajo utilizado se detalla a continuación: Se cultivó *A. tumefaciens* NT1-pZLR4 en 5 mL de YEM líquido durante 48 h y se prepararon placas de medio YEM suplementadas con 30 µg/mL de gentamicina. Sobre la placa de Petri se adicionaron 5 mL de medio YEM semisólido (0.7% p/v de agar) suplementado con 40 µg/mL de Xgal (5-bromo- 4 - cloro - 3 - indolil - β - D - galactopiranosido; 20 mg/mL en dimetilformamida), e inoculado con 500 µL de una suspensión del cultivo de *A. tumefaciens* NT1-pZLR4. Luego de solidificado el medio, se realizaron pocillos en el agar, donde se sembró la muestra del extracto orgánico de autoinductores, los controles respectivos y los sobrenadantes de cultivo correspondientes a diferentes tratamientos. Las placas se incubaron a 28°C durante 24-48 h.

Determinación de polisacáridos extracelulares (EPS) y capsulares (CPS)

La extracción y determinación de EPS se realizó de acuerdo a la técnica descrita por Skorupska y col. (1985). Los cultivos celulares se centrifugaron a 10000 rpm por 30 min a 4°C. El sobrenadante se precipitó toda la noche con tres volúmenes de etanol frío a -20°C para obtener EPS. Los pellets se resuspendieron en NaCl 0,5M, se agitaron en vortex durante 60 seg y luego se centrifugaron 15 min a 12.000 rpm. Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar CPS, los que también se precipitaron con tres volúmenes de etanol frío durante toda la noche a -20°C. Los polisacáridos precipitados se centrifugaron a 12.000 rpm por 25 min a 4°C, y se resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS).

Determinación del contenido de hexosas

Tanto los EPS como los CPS se cuantificaron con el reactivo de antrona (0.2% p/v en H₂SO₄) midiendo la absorbancia a 620 nm (Dische, 1962). Las concentraciones de azúcares reductores resultantes se calcularon por referencia a una curva de calibración construida con galactosa (1mg/mL) como estándar.

Análisis de LPS

Se tomó una alícuota del precipitado de los cultivos bacterianos y se procedió al tratamiento alcalino en ebullición según la técnica descrita por Hitchcock y Brown (1983). Posteriormente se separaron en geles de poliacrilamida al 20% p/v (SDS-PAGE) siguiendo la metodología descrita por Laemli (1970). Los geles se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata (Tsai y Frash, 1982). Se dejó el gel en solución fijadora (etanol 40%v/v, ácido acético glacial 5% v/v) durante toda la noche, se lavó con agua dos veces durante 10 min y se adicionó solución oxidante (ácido peryódico 0.7% v/v en agua) por 5 min. Luego de tres lavados con agua mili Q durante 15 min, se colocó la solución de teñido (100 mL: agua, 70 mL; NaOH 1N, 1.4 mL; NH₄OH 25% p/v, 1 mL; AgNO₃ 20% p/v, 2.5 mL) durante 10 min (en oscuridad). Posteriormente se lavó con agua tres veces durante 10 min, se agregó solución reveladora (agua, 100 mL; formaldehído 37% p/v, 50 µL; ácido cítrico 100 mg/mL, 50 µL) hasta la aparición de bandas (30 seg-2 min), se detuvo la reacción con el agregado de ácido acético al 0.5% v/v durante 30 seg y se lavó con agua durante 1-2 min.

Determinación de proteínas celulares totales

Las suspensiones bacterianas se centrifugaron a 12.000 rpm y los pellets celulares se resuspendieron en 1 mL de NaCl (0.85% p/v). Las soluciones se centrifugaron 10 min, se resuspendieron en 0.5 mL de tampón de extracción (1,21 g de Tris en 100 mL de agua pH: 7.2, 0.101 g de MgCl₂.6H₂O, 15 g de glicerol, 100 µL de β-mercaptoetanol). Se centrifugaron nuevamente durante 10 min y los pellets se resuspendieron finalmente en 0,5 mL de tampón de sonicación (Tris –

HCl 0.1M, 15 % glicerol, pH: 8.8). Se procedió a la sonicación (6 vueltas de 10 seg cada uno) y posteriormente se centrifugaron durante 15 min (Laemli, 1970). En los sobrenadantes se determinó la concentración de proteínas por el método de Bradford (1976), utilizando como patrón seroalbúmina bovina (1 mg/mL).

Ensayos en plantas

a) Esterilización de semillas

Las semillas se colocaron en un vaso estéril y se lavaron en alcohol 95 % v/v durante 10 seg. Luego de descartar el alcohol, se adicionó hipoclorito de sodio comercial al 2,5% p/v en cantidad suficiente para cubrir las semillas, se agitaron suavemente durante 3 a 5 min y se descartó el hipoclorito de sodio. Seguidamente se lavaron al menos 6 veces con cantidad suficiente de agua estéril.

b) Pregerminación

Las semillas estériles se colocaron en un pliego de papel secante previamente esterilizado por autoclavado a 121°C y 1 atm de sobrepresión durante 20 min. El papel fue previamente humedecido con agua estéril. Una vez dispersas las semillas, el papel se enrolló formando un tubo que se introdujo en un recipiente apto, estéril, para impedir la rápida deshidratación. Se colocaron en cuarto estufa a 29°C durante 1-2 días, de acuerdo a la variedad vegetal en cuestión, tiempo suficiente para obtener una raicilla con una longitud de aproximadamente 1,5 cm.

c) Cultivo de plantas de alfalfa en tubos

Se utilizaron como soporte, tubos de vidrio conteniendo medio Jensen (Somasegaran y Hoben, 1994) agarizado estéril. Se eligieron plántulas de tamaño uniforme, bien germinadas, de similar longitud radical (1-1,5 cm). Se colocaron 3 semillas pregerminadas dentro del agar y se llevaron a la cámara de cultivo climatizada a una temperatura de 30°C aproximadamente y una humedad entre 50-60% con un fotoperíodo de 12/12 h luz/oscuridad. A las 24 h se adicionó 1 mL de inoculante y a

los 5 días se raleó una planta por tubo. Se regaron periódicamente con solución de riego Fahraeus (Somasegaran y Hoben, 1994) libre de nitrógeno estéril. La aparición de nódulos se evidenció después de 2 semanas de inoculadas las semillas y luego de 6 semanas se realizó la evaluación final. Para ello, se efectuaron los recuentos de nódulos y se determinaron los pesos secos de la parte aérea y el contenido de nitrógeno por el micrométodo de Kjeldahl.

d) Cultivo de plantas de soja, poroto y maní en macetas

Se utilizaron macetas plásticas desinfectadas con alcohol en las cuales se colocó vermiculita previamente esterilizada mediante tres ciclos consecutivos de 1 h en autoclave a 121°C y 1 atm de sobrepresión.

Posteriormente se colocaron las semillas pregerminadas y se regaron con agua destilada estéril. A las 24 h se adicionaron con 1 mL de inoculante y a los 5 días se raleó una planta por maceta. El ensayo se llevó a cabo en invernadero. Se regaron periódicamente con solución de riego Fahraeus estéril, libre de nitrógeno y a los 45 días post-inoculación, se colectaron las plantas para evaluar la presencia de nódulos, peso seco y contenido de nitrógeno en los diferentes tratamientos.

En todos los experimentos se incluyeron testigos no inoculados, fertilizados con nitrógeno (0,57 g de nitrato de amonio por litro de medio) y sin inocular ni fertilizar.

e) Determinación del contenido de nitrógeno

La parte aérea de las plantas fue secada en estufa a 100°C durante 2 días y, luego de molida se realizó la determinación de nitrógeno por micro Kjeldhal; utilizando un equipo de digestión DIGESTIÓN SYSTEM 12 marca TECATOR y un analizador KJETEC AUTO marca Tecator.

Determinación de la influencia de la población rizobiana presente en el suelo sobre la nodulación

Se utilizaron macetas plásticas desinfectadas con alcohol en las cuales se colocó 300 g de una mezcla de vermiculita:tierra en proporción 3:1.

Las mezclas se esterilizaron previamente durante tres ciclos consecutivos de 1 h en autoclave a 121°C y 1 atm de presión.

Posteriormente, las semillas pregerminadas se colocaron en las macetas y éstas se regaron con agua destilada estéril.

Dicho soporte estéril se inoculó con cultivos de las cepas *B. japonicum* E109, *B. elkani* U1302, *Bradyrhizobium sp* SEMIA 6144 o *S. meliloti* B399. Para ello, se suspendieron rizobios en solución Fahraeus estéril, calculando el volumen a agregar que permita obtener finalmente 10^2 o 10^5 microorganismos/g de suelo (vermiculita/tierra). Las macetas se cubrieron con un film adherente y se llevaron a invernáculo. A las 48 se implantaron las semillas pregerminadas y luego de 24 horas se inocularon con 1 mL de suspensión de microorganismos. Se regaron periódicamente con solución Fahraeus libre de nitrógeno estéril.

Las condiciones de cultivo fueron: temperatura de $25^{\circ}\text{C}\pm 3^{\circ}\text{C}$ y una humedad entre 50-60% con un fotoperíodo de 12/12 h luz/oscuridad. A los 45 días post-inoculación, se colectaron las plantas.

En todos los experimentos se incluyeron testigos no inoculados, y fertilizados con nitrógeno.

Análisis estadístico

Para comparar la diferencia entre las medias en los diferentes ensayos, se utilizó ANOVA de un factor.

El efecto de las de poblaciones preestablecidas de rizobios sobre la nodulación, en plantas con diferentes tratamientos de inoculación, fue analizado con ANOVA de dos factores.

Para determinar las diferencias entre las medias se utilizó el test de Bonferroni. Todos los análisis se realizaron a un nivel de confianza de 0,05. Se utilizó el paquete estadístico *InfoStat* versión 2008 (2008).

CAPITULO 3

Regulación de la expresión de genes *nod* mediada por AHLs

Es conocido que en *B. japonicum* USDA110 la elevada densidad celular promueve la liberación de moléculas señal *quorum* que reprimen la expresión de genes de nodulación. Este antecedente nos motivó a investigar si este fenómeno es común a otras especies rizobianas de importancia agronómica, tales como *S. meliloti* B399, *S. fredii* HH103, *B. japonicum* E109, *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, *R. tropici* CIAT 899 y *B. elkanii* U1302.

Por otro lado, considerando que en el microambiente de la rizosfera conviven generalmente diferentes especies y/o géneros rizobianos cuyas redes de señales de comunicación podrían estar interconectadas, se investigó si moléculas autoinductoras de una especie rizobiana afectan la expresión de genes *nod* de otras especies. Para ello, en primer lugar se evaluó el crecimiento y la producción de AHLs de las diferentes especies rizobianas en distintos medios de cultivos. Con el fin de analizar la expresión de genes *nod*, se obtuvieron cepas transconjugantes con genes reporteros, las que se caracterizaron fenotípica y genotípicamente.

Caracterización del crecimiento de las especies estudiadas

Selección de medios de cultivo

Para caracterizar el crecimiento de cada uno de los microorganismos a estudiar, se determinó el medio mínimo (MM) y las fuentes de carbono más efectivos para su desarrollo. Se ensayaron los medios MSM y M9, con el agregado de las fuentes de carbono glucosa, glicerol, sacarosa o manitol. El tiempo al cual cada microorganismo alcanzó una concentración celular de $5 \cdot 10^8$ UFC/mL se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Crecimiento de los microorganismos en diferentes medios de cultivo.

Microorganismo	Medio MSM				Medio M9			
	Fuente de carbono				Fuente de carbono			
	glucosa	glicerol	sacarosa	manitol	glucosa	glicerol	sacarosa	manitol
<i>R. tropici</i> CIAT 899	38	48	ND	36	40	52	ND	40
<i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA 6144	80	120	ND	96	100	ND	ND	128
<i>B. japonicum</i> E109	80	76	ND	72	80	76	ND	72
<i>S. meliloti</i> B399	48	ND	52	52	48	ND	56	52
<i>S. fredii</i> HH103	48	ND	ND	48	52	ND	ND	40
<i>B. elkanii</i> U1302	80	80	ND	72	80	80	ND	80

Se muestra el tiempo, en horas, al cual el cultivo alcanzó una concentración de $5 \cdot 10^8$ UFC/mL. Los valores corresponden a la media de 3 ensayos independientes. ND: No determinado

En función de los resultados obtenidos, se seleccionaron los medios en los que los microorganismos alcanzaron más rápidamente una densidad celular de $5 \cdot 10^8$ UFC/mL, los que se indican en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2: Medios mínimos y fuente de carbono seleccionados para cada microorganismo

Microorganismo	Medio-Fuente de Carbono
<i>R. tropici</i> CIAT 899	MSM-manitol
<i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA 6144	MSM-glucosa
<i>B. japonicum</i> E109	MSM-manitol
<i>S. meliloti</i> B399	MSM-glucosa
<i>S. fredii</i> HH103	M9-manitol
<i>B. elkanii</i> U1302	MSM-manitol

Evaluación del crecimiento

Dado que la expresión del fenómeno de QS está asociada a la densidad bacteriana, es necesario identificar los tiempos a los cuales se alcanzan las distintas fases de crecimiento para cada bacteria en particular. Para ello se cultivaron cada una de las especies rizobianas en el medio mínimo

seleccionado y, a diferentes intervalos de tiempo, se tomaron muestras para estimar el crecimiento mediante determinación de la absorbancia a 550nm así como mediante el recuento de células viables (UFC/mL).

En la Tabla 3.3 se muestran los valores de velocidad específica de crecimiento máximo (μ máx) y de tiempo de generación (tg) obtenidos para cada cepa, así como los tiempos a los cuales alcanzaron la fase exponencial temprana y la fase estacionaria en el medio seleccionado.

Tabla 3.3: Parámetros de crecimiento de microorganismos estudiados

Microorganismo	μ máx (h^{-1})	tg (h)	Tiempo al que alcanza la fase exponencial (h)	Tiempo al que alcanza la fase estacionaria (h)
<i>R. tropici</i> CIAT 899	0,155	4,48	12	36
<i>Bradyrhizobium sp.</i> SEMIA6144	0,036	18,96	40	80
<i>B. japonicum</i> E109	0,058	12,0	30	72
<i>S. meliloti</i> B399	0,153	4,52	14	46
<i>S. fredii</i> HH103	0,133	5,21	16	48
<i>B. elkanii</i> U1302	0,061	11,43	24	70

Los valores corresponden a la media de 6 ensayos independientes. μ máx: velocidad específica de crecimiento máximo y tg: tiempo de generación.

Producción de autoinductores en las cepas rizobianas

Con la finalidad de concentrar las AHLs producidas por las diferentes cepas, se obtuvieron extractos en acetato de etilo a partir de cultivos en fase estacionaria del crecimiento. La confirmación de la presencia de AHLs en los extractos se realizó utilizando los microorganismos biosensores *A. tumefaciens* y *C. violaceum*, el primero de los cuales sensa AHLs de cadena larga u oxo sustituidos, mientras que el segundo detecta AHLs de cadena corta. En la Figura 3.1, se muestran los halos producidos por los extractos de AHLs de las cepas en estudio en placas cultivadas con las cepas reporteras.

Se pudo comprobar la presencia de AHLs en todos los extractos analizados y con ambas cepas reporteras. Ello indica que, aún cuando la intensidad y tamaño de los halos formados por AHLs de cadena corta fue, en general, menor al obtenido para las de cadena larga, todas las cepas evaluadas producen ambos tipos de AHLs.

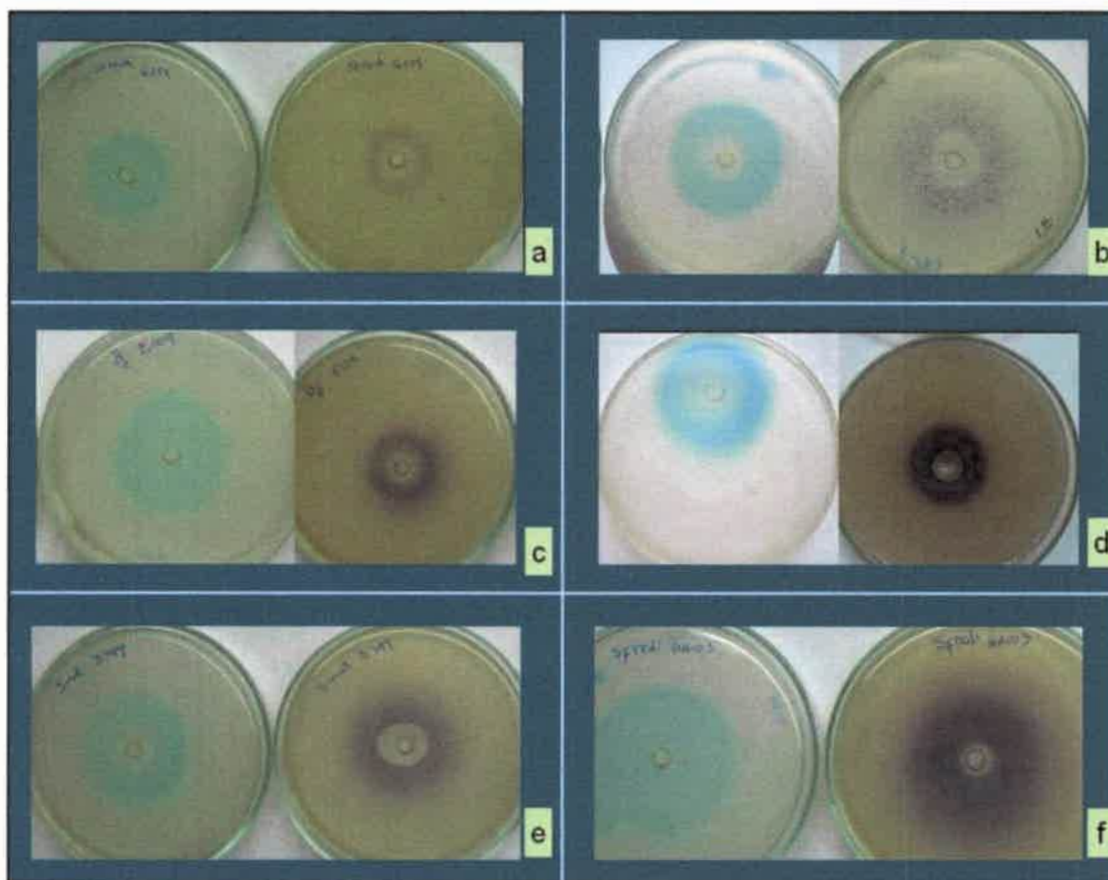


Figura 3.1. Producción de AHLs. a) *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144, b) *B. elkanii* U1302 c) *B. japonicum* E109 d) *R. tropici* CIAT899 e) *S. meliloti* B399 y f) *S. fredii* HH103. Los halos violáceos corresponden a AHLs de cadena corta y los azules a AHLs de cadena larga.

La producción de diferentes tipos de AHLs por un mismo microorganismo ha sido previamente informada para *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*, *Rhizobium etli*, *Sinorhizobium meliloti*, *Rhizobium sp.*, (Sánchez- Contreras y col., 2007). Sin embargo, ésta es la primera vez que se informa sobre la producción de AHLs en *Bradyrhizobium sp.* y *R. tropici*. Si bien en *B. japonicum* USDA110 ha sido comprobada la producción de bradióxetina, los informes sobre la síntesis de AHLs en esta especie rizobiana son controversiales: Loh y col. (2001, 2002 a y b) informaron la ausencia de esta molécula en dicha cepa, mientras que su presencia ha sido reportada en otras cepas de esta especie (Pongsilp y col., 2005). En este trabajo de tesis se detectaron AHLs tanto de cadena corta como de cadena larga en *B. japonicum* E109, al igual que en *B. elkanii* U1302.

Caracterización genotípica y fenotípica de rizobios transconjugantes portadores de una fusión *nod::lacZ*

Con el fin de evaluar la expresión de genes *nod*, se obtuvieron transconjugantes *nodY::lacZ* de *S. meliloti* B399 y *R. tropici* CIAT899, y transconjugantes *nodA::lacZ* de *S. fredii* HH103. Se evaluaron los genomas de las cepas transformadas analizando los perfiles ERIC-PCR obtenidos, los que fueron idénticos a los de las correspondientes cepas salvajes (Figura 3.2). Ello indica que la cepa transformada y la salvaje conservaron la identidad genética luego de la transformación.

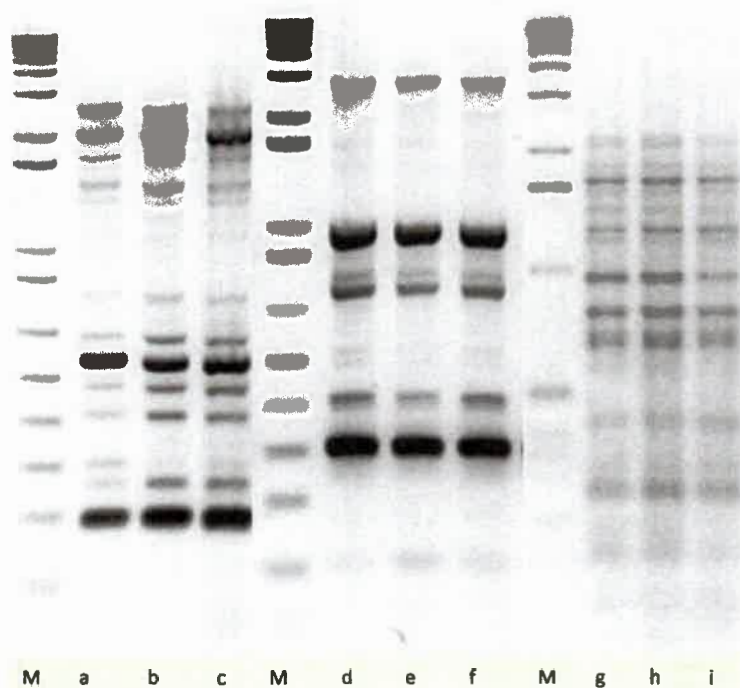


Figura 3.2: Perfiles de ERIC-PCR de transconjugantes y parentales. a) *R. tropici* CIAT 899 salvaje, b) *R. tropici* CIAT 899 *str^R*, c) *R. tropici* CIAT 899 Y-1; d) *S. fredii* HH103 salvaje, e) *S. fredii* HH103 *spc^R*, f) *S. fredii* HH103 A-1; g) *S. meliloti* B399 salvaje, h) *S. meliloti* B399 *spc^R* h) *S. meliloti* B399 Y-4; M: marcador de peso molecular.

La expresión de la fusión *nod::lacZ* se evaluó adicionando flavonoides específicos a placas conteniendo X-gal, en las cuales se estriaron los transconjugantes. Se obtuvieron colonias azules, que indican actividad β -galactosidasa inducida por flavonoides (Figura 3.3).

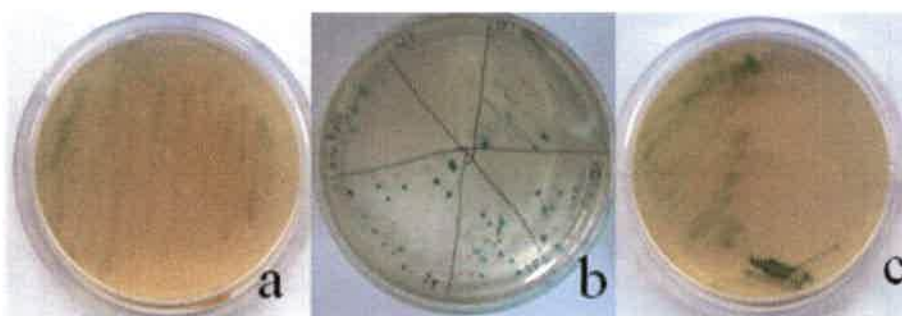


Figura 3.3: Producción de β galactosidasa en transconjugantes: Las placas contienen X-gal, Tc y flavonoides específicos. a) *R. tropici* CIAT 899-Y1, b) *S. meliloti* B399-Y4, c) *S. fredii* HH103-A1.

Con la finalidad de cuantificar la inducción de la expresión de genes *nod*, se evaluó la actividad β -galactosidasa en las cepas transconjugantes obtenidas, en presencia y ausencia de flavonoides específicos, utilizando como sustrato enzimático el rojo clorofenol galactopiranósido (CPRG). Para *R. tropici* se utilizó naringenina como flavonoide, para *S. meliloti*, luteolina y para *S. fredii*, genisteína. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 3.4 y confirman la inducción de la expresión de los genes *nod* por los flavonoides adicionados.

Tabla 3.4: Actividad β -galactosidasa en transconjugantes

Microorganismo	sin Flavonoide (Unidades Miller)	con Flavonoide (Unidades Miller)	Inducida/No inducida
<i>R. tropici</i> CIAT 899 -Y1	6,67 \pm 0,67	68,23 \pm 10,33	10.23
<i>S. meliloti</i> B-399 -Y4	7,52 \pm 0,68	62,90 \pm 6,15	8.36
<i>S. fredii</i> HH103 -A1	19,05 \pm 4,79	80,03 \pm 12,05	4.20

Los datos representan la media \pm E.S. de 5 determinaciones

Por otra parte, se comprobó que no se modificó la cinética de crecimiento de las cepas transconjugantes en relación a las salvajes (Tablas 3.5 y 3.3)

Tabla 3.5: Crecimiento de microorganismos transconjugantes.

Microorganismo	Tiempo al que alcanza la fase exponencial (h)	Tiempo al que alcanza la fase estacionaria (h)
<i>R. tropici</i> CIAT 899 -Y1	12	36
<i>S. meliloti</i> B399 -Y4	14	48
<i>S. fredii</i> HH103 -A1	18	50

Los valores corresponden a la media de 3 ensayos independientes.

Además, se demostró que las bacterias transformadas conservaron su capacidad infectiva frente al huésped específico (Figura 3.4), observándose la inducción de nódulos efectivos cuando se realizaron ensayos de inoculación en plantas.

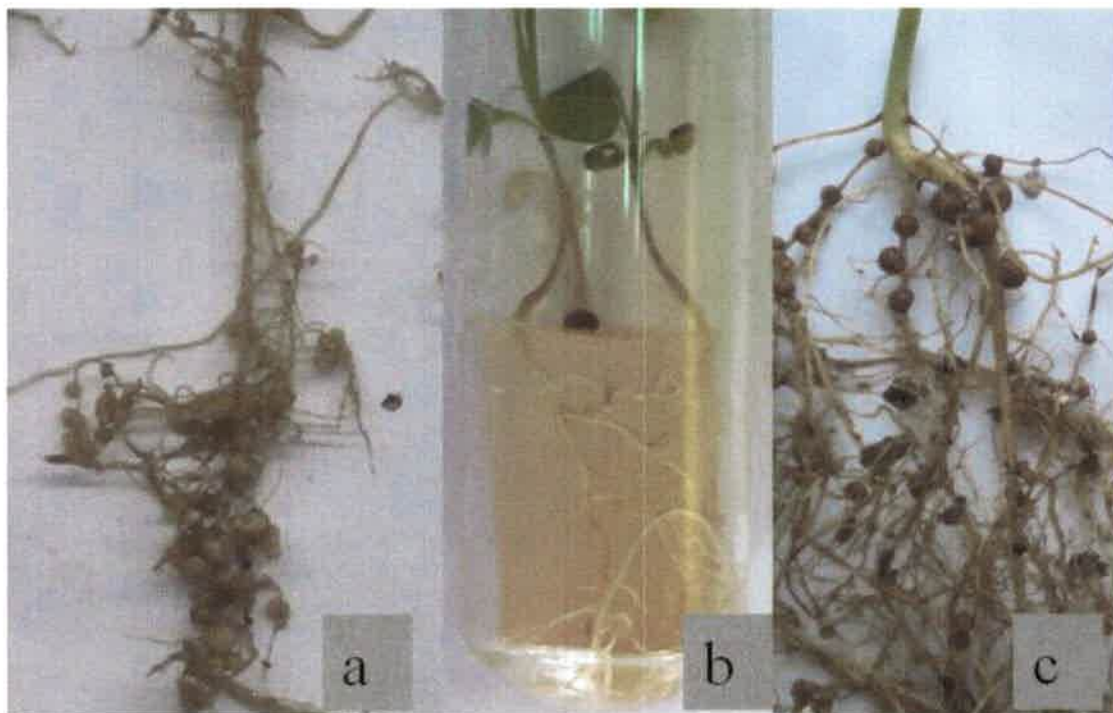


Figura 3.4: Raíces de leguminosas inoculadas con rizobios transconjugantes: a) raíz de poroto inoculada con *R. tropici* CIAT899-Y1, b) raíz de alfalfa inoculada con *S. meliloti* B399-Y4, c) raíz de soja inoculada con *S. fredii* HH103-A1.

Evaluación de la expresión de genes *nod* por acción de AHLs

Se conoce que un aumento en la densidad celular activa la expresión del gen *nolA* en *B. japonicum* USDA 110, cuyo producto luego reprime la expresión de los genes *nod*. Teniendo este antecedente en consideración, uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar si en las cepas estudiadas, la expresión de los genes *nod* presenta variaciones en función de la densidad celular. Para ello se midió la expresión de dichos genes en cultivos en fase estacionaria y se comparó con cultivos en fase logarítmica. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.6.

Tabla 3.6: Expresión de genes de nodulación de transconjugantes en fases de crecimiento exponencial y estacionaria

Tratamiento	Actividad β galactosidasa (Unidades Miller)
<i>R. tropici</i> CIAT899-Y1	
Fase exponencial	29,34 \pm 10,35 ^a
Fase estacionaria	62,86 \pm 7,89 ^b
<i>S. meliloti</i> B399-Y4	
Fase exponencial	62,35 \pm 9,66 ^a
Fase estacionaria	67,27 \pm 11,09 ^a
<i>S. fredii</i> HH103-A1	
Fase exponencial	342,00 \pm 49,66 ^a
Fase estacionaria	105,27 \pm 18,09 ^b

Los datos representan la media \pm E.S. de 5 determinaciones.
Letras distintas para tratamientos en la misma cepa, indican diferencia significativa $p < 0,05$

Los tres microorganismos estudiados se comportaron de forma diferente. En *S. meliloti* no hubo diferencia en la expresión de genes *nod*, entre ambas fases del crecimiento. En *S. fredii*, al igual que lo informado para *B. japonicum* USDA 110 (Loh y col., 2002b), se observó represión de la expresión de genes *nod* en cultivos de altas densidades celulares. Por el contrario, *R. tropici* mostró que en condiciones de alta densidad celular se activa la expresión de estos genes.

Con el fin de determinar si el efecto observado sobre la expresión de genes de nodulación era consecuencia de la alta densidad celular o del estado metabólico de las células cuando alcanzan la fase estacionaria de crecimiento, se determinó la expresión de genes de nodulación en cultivos en fase estacionaria, que se diluyeron hasta alcanzar una densidad equivalente a la de fase exponencial. Los resultados se muestran en la Tabla 3.7.

Tabla 3.7: Expresión de genes de nodulación de transconjugantes en fases de crecimiento exponencial, estacionaria y estacionaria diluida

Tratamiento	Actividad β galactosidasa (Unidades Miller)
<i>R. tropici</i> CIAT899-Y1	
Fase exponencial	29,34 \pm 10,35 ^a
Fase estacionaria	62,86 \pm 7,89 ^b
Fase estacionaria diluida	31,47 \pm 9,84 ^a
<i>S. meliloti</i> B399-Y4	
Fase exponencial	62,35 \pm 9,66 ^a
Fase estacionaria	67,27 \pm 11,09 ^a
Fase estacionaria diluida	65,46 \pm 11,29 ^a
<i>S. fredii</i> HH103-A1	
Fase exponencial	342,00 \pm 49,66 ^a
Fase estacionaria	105,27 \pm 18,09 ^b
Fase estacionaria diluida	91,43 \pm 23,31 ^b

Los datos representan la media \pm E.S. de 5 determinaciones.

Letras distintas para tratamientos en la misma cepa, indican diferencia significativa $p < 0,05$

Se observa que la activación de la expresión de los genes de nodulación de *R. tropici* se produce en cultivos de alta densidad celular. Asimismo, el incremento en la expresión es independiente del estado metabólico de las células, ya que células en fase estacionaria diluida mostraron el mismo nivel de expresión génica que células en fase exponencial. Por lo tanto, es posible sugerir que la activación de estos genes no se debe al estado metabólico de las células sino a la producción de autoinductores en cultivos de alta densidad celular.

Contrariamente, en *S. fredii*, se observa una represión en la expresión de dichos genes cuando las células se encuentran en fase estacionaria. Dado que dicha represión no difirió de la observada en cultivos en fase estacionaria diluida, es posible atribuir la represión de genes *nod* en cultivos en fase estacionaria al estado metabólico de las células y no a la densidad celular. Finalmente, en *S. meliloti* no se observaron alteraciones en los niveles de expresión entre los diferentes tratamientos.

Para confirmar que la modificación de la expresión de los genes de nodulación determinada en cultivos en fase estacionaria es consecuencia de la presencia de AHLs, se determinó la actividad de β galactosidasa en cultivos en fase exponencial a los que se adicionó extractos de AHLs o sobrenadantes de cultivos de alta densidad celular (Tabla 3.8).

Tabla 3.8: Expresión de genes de nodulación de rizobios transconjugantes en fase de crecimiento exponencial y en presencia de AHLs.

Tratamiento	Actividad β galactosidasa (Unidades Miller)
<i>R. tropici</i> CIAT899-Y1	
Fase exponencial	29,34 \pm 10,35 ^a
Fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria	65,28 \pm 12,45 ^b
Fase exponencial + extractos de AHLs	67,53 \pm 8,36 ^b
<i>S. meliloti</i> B399-Y4	
Fase exponencial	62,35 \pm 9,66 ^a
Fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria	63,88 \pm 8,47 ^a
Fase exponencial + extractos de AHLs	69,12 \pm 10,72 ^a
<i>S. fredii</i> HH103-A1	
Fase exponencial	342,00 \pm 49,66 ^a
Fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria	563,88 \pm 37,47 ^b
Fase exponencial + extractos de AHLs	497,54 \pm 34,05 ^b

Los datos representan la media \pm E.S. de 5 determinaciones.

Letras diferentes para tratamientos de la misma cepa indican diferencia significativa $p < 0,05$

Contrariamente a lo descrito para *B. japonicum* USDA110, en *R. tropici*, el agregado de AHLs o de sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria, indujo la expresión de genes *nod*, lo que indicaría que estas moléculas estarían regulando la expresión de dichos genes. No hay antecedentes en la bibliografía en lo que respecta a la relación entre QS y regulación de genes *nod* en *R. tropici*. Sin embargo, en otras especies del género *Rhizobium* (*R. leguminosarum* viobar *viciae*; Rodelas y col., 1999) así como del género *Mesorhizobium* (*M. tianshanense* y *M. loti*; Cao y col., 2009; Yang y col., 2009) también se ha informado inducción de la expresión de genes *nod* por acción de AHLs.

En *S. meliloti*, como era esperable considerando los resultados que se muestran en la Tabla 3.6., el agregado de AHLs no produjo cambios en los niveles de expresión de los genes *nod*. Ello indicaría que, en las condiciones en que se realizaron los ensayos, la expresión de los genes de nodulación no estaría modulada por AHLs. Contrariamente, Marketon

(2002b) encontró en *S. meliloti* R1021 inducción de la expresión de genes *nod* en respuesta al *quorum* del sistema SinrII.

Con respecto a *S. fredii*, la adición de sobrenadante de fase estacionaria a cultivos en fase exponencial, indujo la expresión de genes *nod*. En ensayos previos cuyos resultados se mostraron en la Tabla 3.7, se demostró que cuando *S. fredii* se encuentra en fase estacionaria de crecimiento, la expresión de sus genes *nod* está reprimida. Tomados en conjunto, los resultados indican que el efecto de las AHLs varía según el estado metabólico de *S. fredii*, activando su expresión en fase exponencial y reprimiéndola en fase estacionaria del crecimiento. Resultados similares han sido obtenidos en *Bacillus subtilis* (Lazzazera, 2000) los que fueron explicados por la acción de un sistema regulador que modula la actividad del sistema de QS. Es interesante ya que recientemente se demostró en *S. fredii* SMH12 que la producción de AHLs era inducida por los flavonoides secretados por su planta huésped, incrementando de este modo la complejidad de la red de señalización en la que participan estas moléculas (Pérez Montaña y col., 2011).

S. fredii, al igual que *B. japonicum* USDA 110, es un simbiote de soja, cuyo sistema *quorum* no ha sido aún muy estudiado. Por ello y con la finalidad de confirmar los resultados obtenidos en los niveles de expresión del gen *nodA*, se realizó un ensayo de PCR en tiempo real, cuyos resultados se muestran en la Tabla 3.9.

Tabla 3.9: Expresión de gen *nodA* de *S. fredii* HH103 en distintas fases de crecimiento y en presencia de AHLs.

Tratamiento	Expresión relativa del gen <i>nodA</i> (veces de activación)
Células en fase exponencial	877±79 ^a
Células en fase estacionaria	174±23 ^b
Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria	2251±299 ^c

Los datos representan la media ± E.S. de 3 determinaciones.

Letras diferentes indican diferencia significativa $p < 0,05$

La expresión del gen *nodA* está reprimida en cultivos en fase estacionaria con respecto a cultivos en fase exponencial, en concordancia con los datos mostrados en la Tabla 3.9. Por otra parte, la expresión de dicho gen

en células en fase exponencial se encuentra inducida en presencia de sobrenadantes de cultivos en fase estacionaria. Los datos obtenidos permitieron confirmar que la activación de los genes *nod* por AHLs, es dependiente del estado metabólico de este microorganismo, y solamente ocurre cuando las células alcanzan la fase exponencial.

El comportamiento de *S. fredii* HH103 descrito en los ensayos precedentes, difiere de los restantes rizobios estudiados (*S. meliloti*, *B. japonicum* y *R. tropici*) ya que en dicho microorganismo la presencia de AHLs activa o inhibe la expresión de genes *nod*, dependiendo si las células están en fase exponencial o estacionaria, respectivamente. Desde una perspectiva ecológica, y considerando que en el suelo habitan diferentes poblaciones rizobianas cuya densidad es variable, podría ser factible la estimulación de la expresión de genes *nod* en *S. fredii* en fase exponencial, mediada por AHLs heterólogas, y por lo tanto la generación de una respuesta inductora en las etapas tempranas de la nodulación.

Efecto de moléculas de *quorum sensing* heterólogas sobre la expresión de genes *nod*

El objetivo de los siguientes ensayos fue determinar si la expresión de los genes de nodulación en una cepa rizobiana es afectada por la acción de AHLs sintetizadas por rizobios de otras especies. Con tal fin, se cultivaron los microorganismos hasta la fase de crecimiento exponencial, y se determinó la expresión de genes *nod*, luego de la adición de flavonoides específicos y de autoinductores heterólogos (sobrenadantes de cultivos o extractos de AHLs).

Se utilizaron los transconjugantes *nodY::lacZ* obtenidos en este trabajo de tesis y la cepa *B. japonicum* Bj110-573, que posee una fusión cromosomal *nodC::lacZ*. Los resultados se muestran en la Tabla 3.10.

Se pudo observar que en *R. tropici*, la expresión de los genes de nodulación es inducida tanto por AHLs homólogas como heterólogas. Contrariamente, en *B. japonicum* el agregado de AHLs homólogas y heterólogas, reprimió significativamente la expresión de los genes *nod*, excepto cuando los sobrenadantes o extractos provenían de cultivos de *S. fredii* cuyas AHLs no afectaron la expresión de dichos genes. En *S. meliloti*, en cambio, la adición de AHLs homólogas o heterólogas no alteró la expresión de genes *nod*.

Tabla 3.10. Expresión de genes de nodulación en cepas de rizobios, en presencia de AHLs heterólogos.

Microorganismo	Tratamientos	Actividad β galactosidasa (Unidades Miller)
R. tropici CIAT 899-Y1	Control negativo: células en fase exponencial	27,12 \pm 5,01 ^a
	Control positivo: células en fase estacionaria	58,46 \pm 7,63 ^b
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	71,77 \pm 7,38 ^b
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	73,33 \pm 10,67 ^b
	Células en fase exponencial + extractos de AHLs de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	65,07 \pm 12,46 ^b
	Células en fase exponencial + extractos de AHLs de <i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	62,54 \pm 8,32 ^b
S. meliloti B399-Y4	Control negativo: células en fase exponencial	59,79 \pm 6,55
	Control positivo: células en fase estacionaria	55,00 \pm 8,59
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	63,59 \pm 6,85
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	65,03 \pm 12,54
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	61,95 \pm 7,02
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs de <i>Sinorhizobium meliloti</i> B399	57,73 \pm 8,92
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs de <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	61,59 \pm 9,45
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	60,98 \pm 10,37
B. japonicum Bj110-573	Control negativo: células en fase exponencial	104,91 \pm 10,06 ^a
	Control positivo: células en fase estacionaria	80,27 \pm 10,40 ^b
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> Bj110-573	72,65 \pm 9,01 ^b
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	78,69 \pm 6,78 ^b
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Bradyrhizobium elkani</i> U1302	80,13 \pm 7,15 ^b
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Bradyrhizobium sp</i> SEMIA 6144	77,42 \pm 9,13 ^b
	Células en fase exponencial + sobrenadante de fase estacionaria de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	97,06 \pm 8,13 ^a
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> Bj110-573	81,43 \pm 11,48 ^b
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109	73,56 \pm 13,02 ^b
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs de <i>Bradyrhizobium elkani</i> U1302	69,98 \pm 9,24 ^b
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs de <i>Bradyrhizobium sp</i> SEMIA 6144	76,34 \pm 10,46 ^b
	Células en fase exponencial + extracto de AHLs de <i>Sinorhizobium fredii</i> HH103	101,64 \pm 9,35 ^a

Los datos representan la media \pm ES de 5 determinaciones. Distintas letras para tratamientos de la misma cepa indican diferencias significativas $p < 0,05$.

Se ha informado que la mayoría de los microorganismos secretan un conjunto diverso de autoinductores, que en cepas relacionadas filogenéticamente, podrían tener similitud estructural, siendo factible por lo tanto que regulen los mismos sistemas (Sánchez Contreras y col., 2007; Cooper, 2007). Ello explicaría que, en *B. japonicum* Bj110-573, el agregado de AHLs heterólogas, pertenecientes a diferentes especies del género *Bradyrhizobium*, produzca el mismo efecto sobre la regulación de los genes de nodulación que la presencia de AHLs propias. Además, la ausencia de inhibición de la expresión de genes *nod* determinada en dicha cepa cuando se adicionan AHLs provenientes de *S. fredii*, indicaría una elevada especificidad del sistema de detección de AHLs, sensando sólo aquéllas que provienen de especies pertenecientes al mismo género.

En síntesis, a partir de los resultados obtenidos, es posible sugerir que la acción de las AHLs sobre la expresión de genes *nod* difiere entre rizobios de crecimiento lento (género *Bradyrhizobium*) y de crecimiento rápido (géneros *Rhizobium*, *Sinorhizobium*), siendo la expresión de dichos genes reprimida o inducida, respectivamente.

En la rizósfera habita una amplia diversidad de microorganismos cuya presencia puede estar influyendo en las respuestas fisiológicas de los diversos miembros de esa comunidad, mediante la acción de moléculas *quorum* (Ryan y Dow, 2008; Atkinson y Williams, 2009). Los hallazgos acá reportados indicarían un entrecruzamiento de señales entre diferentes cepas microbianas. Por lo tanto, ello debiera constituir un factor a considerar en la aplicación de inoculantes rizobianos dado que en el suelo en el que éstos se introducen es factible la presencia de rizobios pertenecientes a otras especies. Los resultados obtenidos permitirían, además, suponer que la disminución de la eficiencia de nodulación observada cuando los rizobios son inoculados en suelos que poseen una población rizobiana nativa o naturalizada, podría relacionarse, al menos en parte, con el al entrecruzamiento de señales de *quorum* entre las distintas especies (Musiyiwa y col., 2005; Racca, 2002). A los fines de optimizar las condiciones de aplicación de rizobios como tecnología agrícola, sería importante considerar que el sistema de sensado de *quorum* bacteriano puede también estar modulado por AHLs producidas por sus plantas huéspedes (Shiner y col., 2005; Bonfante y Anca, 2009).

Los resultados que se muestran en este capítulo han sido resumidos en el Cuadro 3.1. En su conjunto, ellos indican que en los rizobios estudiados, la respuesta a la presencia de señales *quorum* es altamente diversa, confirmando además el supuesto de que las AHLs son parte de la red de comunicación entre bacterias. Estos estudios constituyen un avance en la comprensión, desde un punto de vista molecular, de las relaciones rizobianas que se establecen en la rizosfera. Un profundo conocimiento de las mismas podría contribuir al adecuado desarrollo de estrategias de inoculación que posibiliten el establecimiento de relaciones simbióticas exitosas en términos agrícolas.

Cuadro 3.1: Regulación de genes de nodulación mediada por AHLs

Microorganismo	Producción de AHLs		Inducción de genes <i>nod</i> en cultivos de alta densidad	Efecto de AHLs heterólogas sobre expresión de genes <i>nod</i>
	Cadena Larga	Cadena Corta		
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	si	si	reprimida	represión sólo por AHL provenientes de bradirizobios
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	si	si	--	--
<i>Sinorhizobium fredii</i>	si	si	activada en células en fase exponencial	--
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	si	si	no alterada	sin efecto
<i>Rhizobium tropici</i>	si	si	activada en células en fase estacionaria	activación
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	si	si	--	--

CAPITULO 4

Efecto de AHLs sobre moléculas de la superficie rizobiana involucradas en la interacción

La superficie rizobiana contiene una variedad de polisacáridos que juegan un rol significativo en la adaptación de las bacterias a la vida libre y como bacteroides, así como en la interacción con la planta hospedadora (Downie, 2010; Janczarek, 2011). Dado que la regulación de las vías de producción de estas moléculas está influenciada por múltiples señales ambientales y vías de señalización, es importante analizar la participación del sistema de QS en regular la composición de la envoltura bacteriana.

Con tal fin se obtuvieron cultivos en medio mínimo suplementados, desde el inicio de la incubación, con extractos conteniendo AHLs. En la fase estacionaria del crecimiento se evaluó el contenido de CPS, EPS, LPS y proteínas.

Efecto de AHLs sobre el contenido de CPS y EPS

Los CPS cumplen un rol en las etapas tardías de la infección de la planta huésped, y se ha propuesto que actuarían protegiendo a las bacterias frente al estrés abiótico (Pellok y col., 2000; Fraysse y col., 2003; Becker y col., 2005; Koutsoudis y col., 2006). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el efecto de las AHLs sobre la producción de CPS es dependiente de la cepa rizobiana, ya que en *S. fredii*, *B. japonicum* y *R. tropici*, la presencia de AHLs se asocia con una disminución, y en *Bradyrhizobium sp.* y *B. elkanii* con un aumento en el contenido de dichas moléculas (Tabla 4).

Sólo en *S. meliloti* B399 y en *Bradyrhizobium sp.* se observaron variaciones en el contenido de EPS en presencia de AHLs y, en ambos, consistieron en incrementos en la producción de este polisacárido (Tabla 4). Estos resultados coinciden con los de estudios realizados en la cepa *S. meliloti* 1021, en los que se encontró que, tanto la producción de EPSI como de EPSII, se incrementa por acción de AHLs, mediante el fenómeno de QS (Marketon y col., 2003; Hoang y col. 2004; Glenn y col., 2007; Gurich y González, 2009). Es conocido que existe una estrecha relación entre la producción de EPS y la formación de biofilms bacterianos (Vu y col., 2009; Landini y col., 2010). La mayor producción de EPS en *S. meliloti* y *Bradyrhizobium sp.* en presencia de AHLs

podría relacionarse con una abundante colonización de las raíces, favoreciendo de este modo la interacción simbiótica (Vriezen y col., 2007; Fujishinge y col., 2006).

Tabla 4: Contenido de EPS y CPS en cultivos de microorganismos suplementados con AHLs.

Tratamiento	Contenido de EPS (mg hexosa/mg proteína)			Contenido de CPS (mg hexosa/mg proteína)		
	Medio mínimo	Medio mínimo + acetato de etilo	Medio mínimo + extracto de AHLs	Medio mínimo	Medio mínimo + acetato de etilo	Medio mínimo + extracto de AHLs
<i>S. fredii</i> HH103	0,069 ± 0,032	0,075 ± 0,031	0,096 ± 0,034	0,063±0,017	0,086±0,019	0,036±0,006*
<i>S. meliloti</i> B399	1,151 ± 0,603	1,442 ± 0,169	3,998 ± 0,669*	0,274±0,081	0,264±0,081	0,22±0,064
<i>B. japonicum</i> E109	0,173 ± 0,042	0,138 ± 0,057	0,143 ± 0,087	4,15±0,81	3,29±0,48	1,09±0,12*
<i>Bradyrhizobium</i> sp SEMIA 6144	2,403 ± 0,790	1,294 ± 0,412	8,474 ± 2,380*	0,399±0,048	0,310±0,037	0,93±0,19*
<i>R. tropici</i> CIAT 899	1,862 ± 0,121	1,834 ± 0,046	1,715 ± 0,113	1,95 ± 0,24	1,49 ± 0,33	0,54 ± 0,19 *
<i>B. elkanii</i> U1302	0,354 ± 0,027	0,453 ± 0,081	0,561 ± 0,094	2,55 ± 0,19	2,27 ± 0,11	2,98 ± 0,35 *

Los datos representan la media ± ES, n: 3. *diferencia significativa con respecto a los valores en medio mínimo (p<0,05).

Efecto de AHLs sobre la composición de LPS

En las Figuras 4.1 y 4.2 se muestra que el agregado de AHLs no modificó el perfil de LPS de ninguno de los microorganismos analizados. Sin embargo, las diferencias en intensidades de algunas bandas (Figura 4.1: a3, c3,; Figura 4.2: a1, a3 y c3) revelaron variaciones en la concentración total de estas moléculas. Yang y col., (2000) demostraron que la composición y el contenido los LPS de *Pseudomona aeruginosa* se modifican de forma dependiente de la densidad celular, atribuyendo este efecto a la acción de moléculas *quorum*.

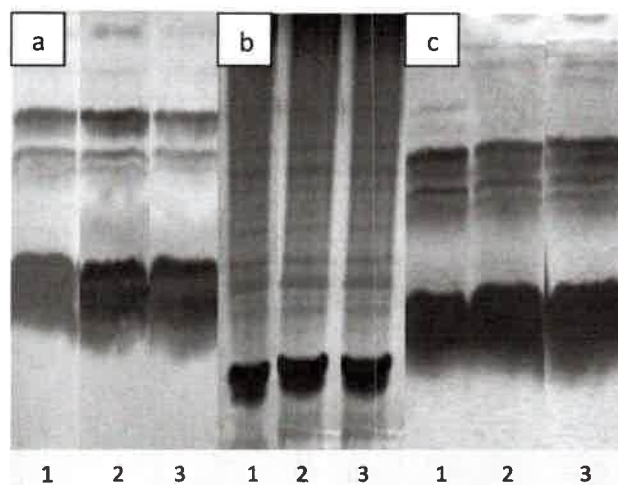


Figura 4.1: Perfil de LPS de *S. fredii* HH103 (a) *B. japonicum* E 109 (b), *S. meliloti* B399 (c). Tratamientos: control: calles 1, con agregado de acetato de etilo: calles 2 y con agregado de AHLs: calles 3.

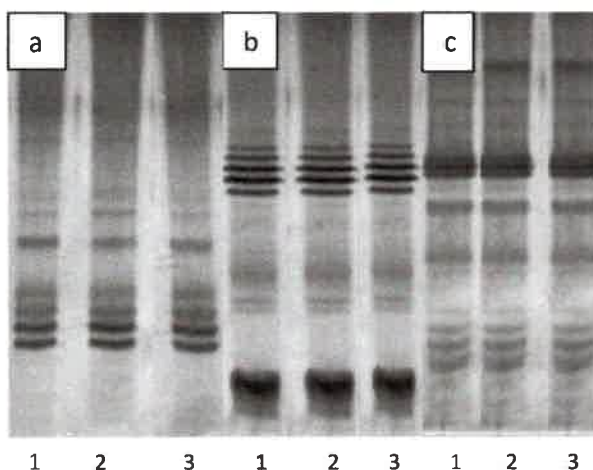


Figura 4.2: Perfil de LPS de *Bradyrhizobium* sp (a) *B. elkanii* U1302 (b), *R. tropici* CIAT 899 (c). Tratamientos: control: calles 1, con agregado de acetato de etilo: calles 2 y con agregado de AHLs: calles 3.

Si bien la participación de AHLs en la regulación de la síntesis de polisacáridos no ha sido ampliamente estudiada, los escasos estudios realizados indican efectos variables según la especie en cuestión, produciendo aumento en el contenido de dichos componente celulares en *Brucella melitensis* (Uzureau y col., 2007) y disminución en *S. meliloti* (Marketon y col., 2003).

Es bien conocido la existencia de una señalización extracelular en la interacción entre la leguminosa huésped y el rizobio compatible. Además de la importancia de los factores Nod rizobianos en la infección de leguminosas, se ha propuesto que polisacáridos extracelulares así como proteínas secretadas por estas bacterias, juegan un papel relevante en el establecimiento de la simbiosis (Downie, 2010; Janczarek, 2011). Los resultados obtenidos en esta tesis permitieron confirmar que, según la especie rizobiana, la producción de polisacáridos de superficie puede variar significativamente, en forma dependiente de AHLs.

Estos estudios indican que existen relaciones entre el fenómeno de QS y el proceso simbiótico que involucran compuestos de la envoltura celular de los rizobios, involucrados en la colonización e infección de las raíces de la planta huésped.

CAPITULO 5

Efecto de la disponibilidad de nutrientes y condiciones de estrés
sobre la producción de AHLs

Se ha descrito en *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 que un aumento en la concentración de hierro en el medio de cultivo, revierte el efecto adverso de la inoculación con cultivos de alta densidad celular sobre la nodulación de plantas de soja (Loh y col., 2002b, 2003). Ello llevó a los autores a proponer que la producción de AHLs en medios con baja concentración de hierro está afectada. Con el fin de determinar si dicho efecto del hierro es también observable en los rizobios utilizados en este estudio, se evaluó la producción de AHLs en medios con diferentes concentraciones de ese micronutriente. Por otra parte, y considerando que la interacción rizobios-leguminosa es eficiente en suelos con bajo contenido de nitrógeno, también se evaluó el efecto de este nutriente en la producción de AHLs. Finalmente, considerando las características salinas de los suelos de la zona semiárida de Argentina, así como su creciente acidez, se evaluó la influencia de diferentes concentraciones de NaCl y/o diferentes niveles de pH del medio de cultivo bacteriano, sobre la producción de la molécula señal.

Influencia del hierro y el nitrógeno sobre la producción de AHLs

Se diseñaron medios de cultivo con diferentes concentraciones de estos nutrientes y cuando los cultivos alcanzaron la fase exponencial o estacionaria de crecimiento, se separaron los sobrenadantes y se sembraron en placas cultivadas con bioindicadores de AHLs. En la Tabla 5.1 se indican los diferentes ensayos realizados.

Tabla 5.1: Tratamientos de variación de hierro y nitrógeno en cultivos rizobianos.

Tratamiento	N(mM) agregado como NH₄Cl	Fe(μM) agregado como EDTA-NaFe
1	0	20
2	1	20
3	10	20
4	0	50
5	1	50
6	10	50
7	0	100
8	1	100
9	10	100

El tratamiento 3 corresponde al control y los contenidos de hierro y nitrógeno son los especificados en el medio MSM.

No hubo diferencia significativa en el número de microorganismos entre tratamientos, con la excepción de los tratamientos 1, 4 y 7, los cuales carecían de nitrógeno en el medio de cultivo y alcanzaron densidades celulares menores a 1×10^8 UFC/mL.

En fase exponencial del crecimiento y para todas las condiciones ensayadas, no se detectó producción de AHLs en la mayoría de los microorganismos estudiados, excepto *S. fredii* y *S. meliloti*. En cambio, en la fase estacionaria se produjeron niveles claramente detectables.

Dado que los cambios observados en la síntesis de AHLs de cadena corta y de cadena larga fueron similares, sólo se muestran los resultados obtenidos frente a *Agrobacterium tumefaciens* (cepa reportera de AHLs de cadena larga).

Los resultados obtenidos para *S. fredii* HH103, en fase estacionaria del crecimiento, se muestran en las Figuras 5.1, 5.2 y 5.3.



Figura 5.1: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de *S. fredii*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens*, sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *S. fredii* HH103 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

Se observa claramente que, para una misma concentración de nitrógeno, la producción de AHLs aumenta a medida que se incrementa la concentración de hierro. Por el contrario, cuando disminuye el contenido de nitrógeno (Figura 5.2) se observa una disminución en la producción de AHLs con respecto al control.



Figura 5.2: Efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la producción de AHLs de *S. fredii*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens*, sembrada con sobrenadantes provenientes de cultivos de *S. fredii* HH103 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

Si se compara la respuesta frente a la variación de los niveles de nitrógeno en medios con 50 μM o 100 μM de hierro, se observa también que la síntesis de AHLs disminuye con la disminución de la concentración de nitrógeno (Figura 5.3).

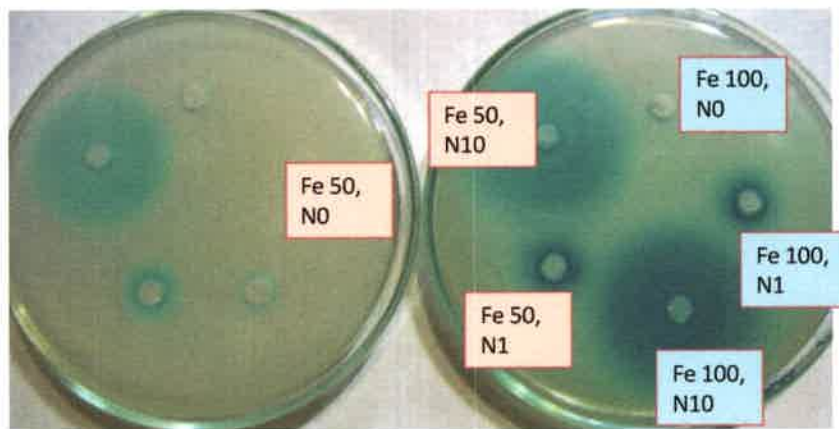


Figura 5.3: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de *S. fredii*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *S. fredii* HH103 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

Al igual que lo observado para *S. fredii*, la síntesis de AHLs en *B. japonicum* E109 se incrementa a medida que aumenta la concentración de hierro o de nitrógeno en el medio de cultivo (Figuras 5.4 y 5.5).



Figura 5.4: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de *B. japonicum*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *B. japonicum* E109 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.



Figura 5.5: Efecto de la disponibilidad de nitrógeno sobre la producción de AHLs de *B. japonicum*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *B. japonicum* E109 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

Cuando se evaluó la producción de AHLs en medios conteniendo 50 μ M o 100 μ M de hierro y distintos niveles de nitrógeno, se observó que

también en estas condiciones la síntesis de AHLs es menor a medida que disminuye el nitrógeno (Figura 5.6).



Figura 5.6: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de *B. japonicum*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *B. japonicum* E109 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

En *B. elkanii* U1302, se puede observar que la producción de AHLs no se modifica con las concentraciones de hierro (Figura 5.7). En cambio, la disminución en el contenido de nitrógeno del medio resulta en disminución del contenido de AHLs (Figura 5.8).



Figura 5.7: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de *B. elkanii*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *B. elkanii* U1302 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

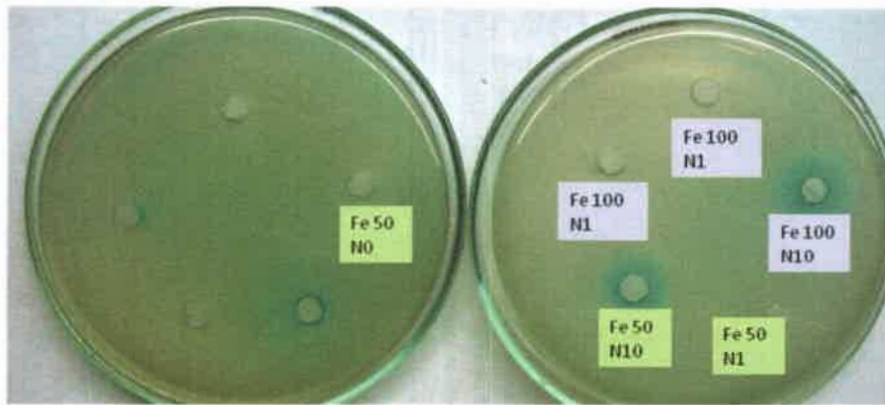


Figura 5.8: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de *B. elkanii*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *B. elkanii* U1302 de fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

Como se observa en las Figura 5.9 y 5.10, en *S. meliloti* B399, las variaciones en el hierro no afectan la síntesis de AHLs y, en este sistema de detección, la disminución de nitrógeno provoca menor producción de AHLs.



Figura 5.9: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de *S. meliloti*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *S. meliloti* B399 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

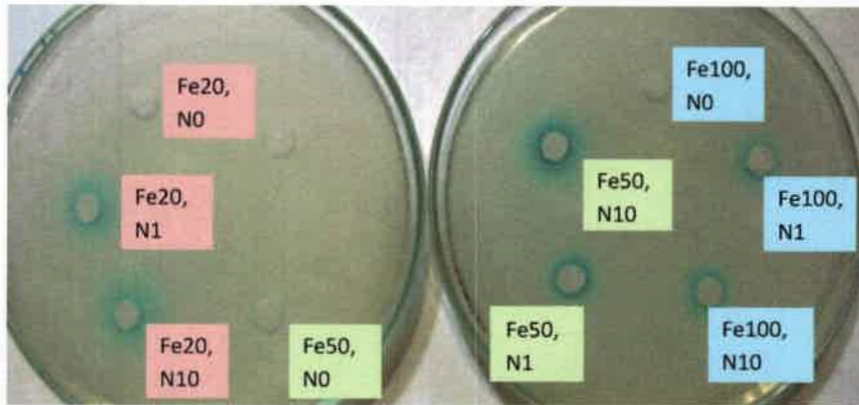


Figura 5.10: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de *S. meliloti*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *S. meliloti* B399 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

Los estudios realizados en *R. tropici* CIAT 899 muestran que la síntesis de AHLs en este microorganismo, es sensible a variaciones en el contenido de nitrógeno pero no de hierro (Figuras 5.11 y 5.12).

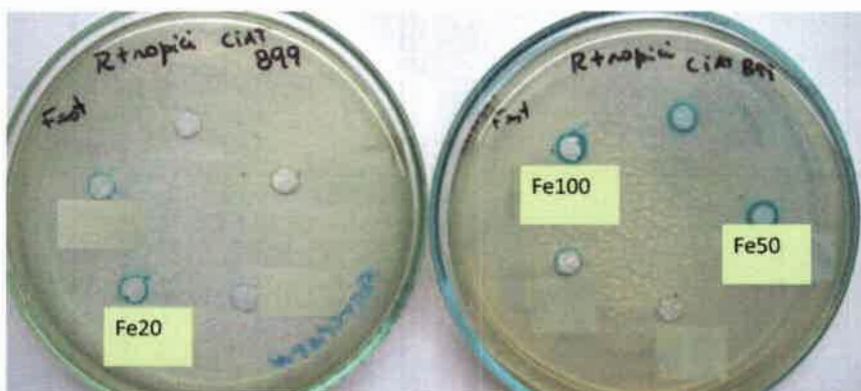


Figura 5.11: Efecto de la disponibilidad de hierro sobre la producción de AHLs de *R. tropici*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *R. tropici* CIAT 899 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

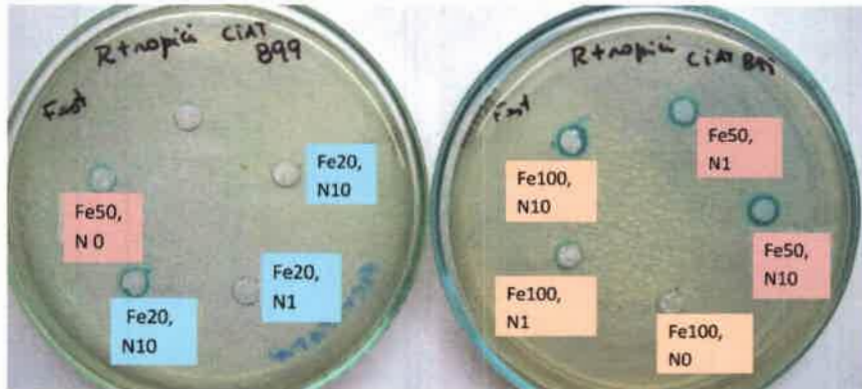


Figura 5.12: Efecto de la disponibilidad de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs de *R. tropici*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de fase estacionaria del crecimiento con distintos

En la Figura 5.13 se indica la variación de AHLs producidas por *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 a diferentes concentraciones de hierro y concentración de nitrógeno máxima.

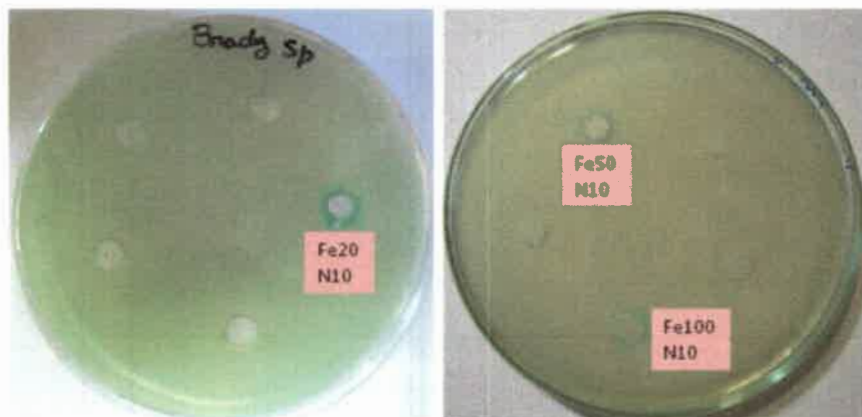


Figura 5.13: Efecto del contenido de hierro sobre la producción de AHLs en *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144. Las placas contienen el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens*, y fueron sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos.

Se observaron niveles de AHLs claramente detectables a la mayor concentración de N y en cualquier condición de disponibilidad de hierro. No hubo variación en la producción de AHLs, cuando se evaluaron diferentes concentraciones de hierro en el medio, al igual que lo observado para *B. elkanii* U1302.

Si bien se ha informado que algunas moléculas de QS, tales como las producidas por *Pseudomonas* (Diggle y col., 2007b) actúan como sideróforos, los resultados aquí obtenidos indicarían que las AHLs de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 no tendrían función como sideróforos ya que no se incrementó su producción cuando este rizobio creció en presencia de bajas concentraciones de hierro.

En la Figura 5.14 se muestran los resultados obtenidos con variación de nitrógeno. Se pudo observar que una disminución en su disponibilidad resultó en ausencia de AHLs detectables.

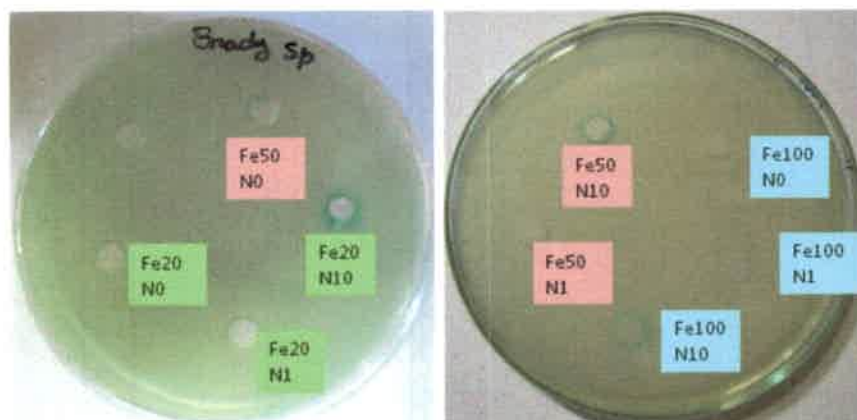


Figura 5.14: Efecto del contenido de hierro y nitrógeno sobre la producción de AHLs en *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144. Las placas contienen el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens*, y fueron sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos. Se indican con el mismo color los tratamientos con igual concentración de hierro y nitrógeno variable.

Considerando que en el suelo, que es el hábitat natural de estos microorganismos, la disponibilidad de nitrógeno puede ser muy baja, una disminución de la producción de moléculas de QS podría redundar en alteraciones en la expresión de genes mediada por AHLs.

Con respecto a la influencia del hierro sobre la síntesis de las AHLs, un aumento de su concentración no afecta adversamente la producción de dichas moléculas en ninguno de los microorganismos evaluados. Más aún, en *B. japonicum* E109, contrariamente a lo informado para *B. japonicum* USDA 110 (Loh y col., 2002a), la síntesis de AHLs se vio estimulada en altas concentraciones de hierro.

Influencia del estrés salino y ácido sobre la producción de la molécula señal

De acuerdo a los objetivos planteados, se diseñaron medios con diferentes concentraciones salinas (2, 50 y 200 mM NaCl) y a distintos valores de pH (5, 6 y 7), y cuando los cultivos alcanzaron las fases exponencial o estacionaria de crecimiento, se separaron los sobrenadantes y se sembraron en placas con los microorganismos bioindicadores de presencia de AHLs.

En la Tabla 5.2 se indican los diferentes tratamientos realizados, para cada una de las cepas

Tabla 5.2: Tratamientos de variación de NaCl y pH en cultivos rizobianos

Tratamientos	NaCl (mM)	pH
1	2	5
2	50	6
3	100	7
4	200	5
5	2	6
6	50	7
7	100	5
8	200	6
9	2	7
10	50	5
11	100	6
12	200	7

El tratamiento 9 corresponde al control y el pH y la concentración de NaCl son los especificados en el medio MSM.

No se observó crecimiento de *S. fredii* en medios de cultivo con pH 5, lo que se vio reflejado en ausencia de AHLs detectables. A pH 7 no hubo diferencia en la producción de AHLs de cadena larga (Figura 5.15, a). Sin embargo, éstas no se detectaron a pH 6 y concentraciones mayores de 2 mM NaCl. Con respecto a la producción de AHLs de cadena corta, si bien a pH 6 y 7 y NaCl 200mM se observó el crecimiento en colonias de la cepa bioindicadora, no se detectó producción de AHLs (Figura 5.15, b).

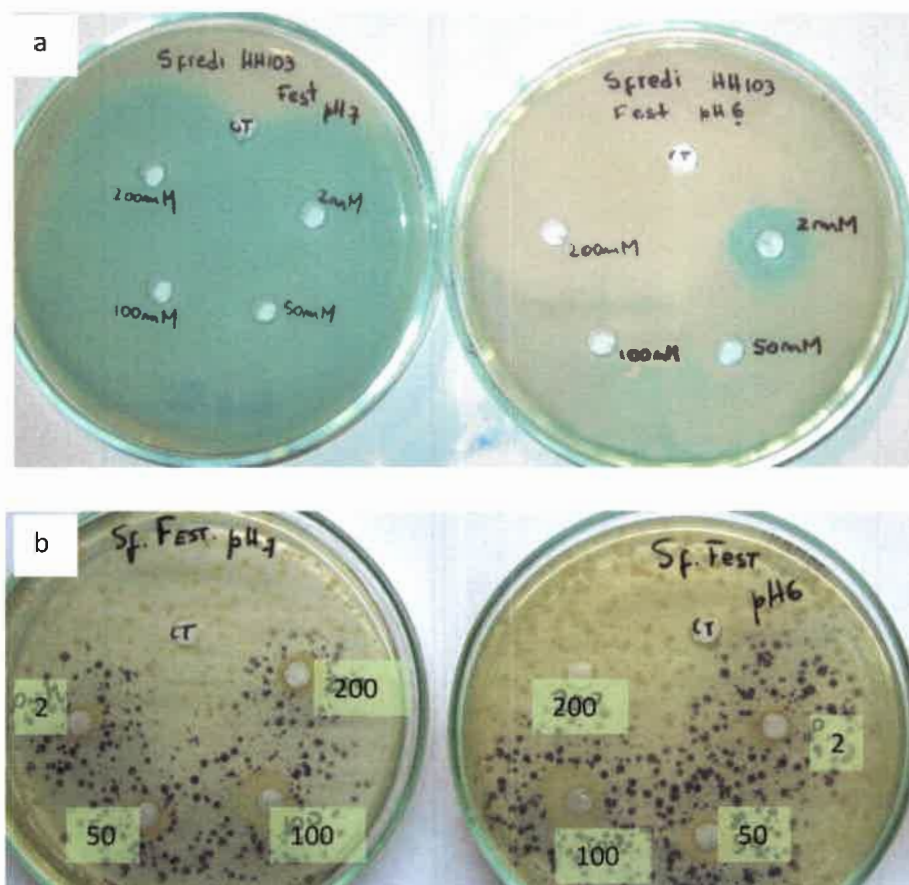


Figura 5.15: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de *S. fredii*. Placas conteniendo los microorganismos biosensores a) *Agrobacterium tumefaciens* y b) *Chromobacterium violaceum*, sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *S. fredii* HH103 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos; 2, 5, 100 y 200 mM corresponden a la concentración de NaCl para cada tratamiento; CT: control sembrado solamente con medio de cultivo estéril.

En *Rhizobium tropici*, se observó inducción de la síntesis de AHLs a pH ácido. En cambio, en medios conteniendo 200 mM NaCl no hubo producción de autoinductores detectables (Figura 5.16).

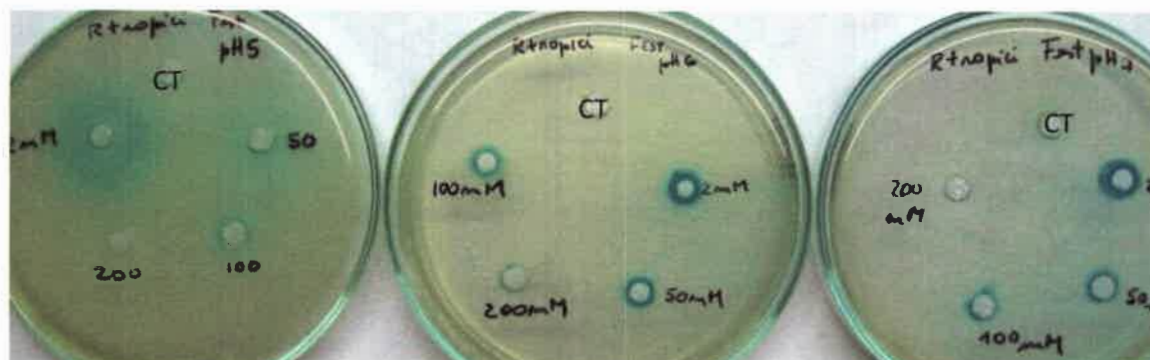


Figura 5.16: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de *R. tropici*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos, de *R. tropici* CIAT 899; 2, 5, 100 y 200 mM corresponden a la concentración de NaCl para cada tratamiento; CT: control sembrado solamente con medio de cultivo estéril.

No se observó crecimiento de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 en medios a pH 5 y tampoco producción de AHLs. A pH 6 y 7 no hubo diferencias en la producción de autoinductores; sin embargo, a estos valores de pH y concentraciones de NaCl superiores a 2mM, estas moléculas no se detectaron.



Figura 5.17: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de *Bradyrhizobium sp.* Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens* sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos; 2, 5, 100 y 200 mM corresponden a la concentración de NaCl para cada tratamiento; CT: control sembrado solamente con medio de cultivo estéril.

El crecimiento y la producción de AHLs de la cepa *S. meliloti* B399 no se afectó por el estrés ácido ni salino. Más aún, a pH 5 y 6, a medida que aumentó la concentración de NaCl (hasta 100mM) aumentó la producción de AHLs. A pH 7 la máxima producción de AHLs fue a 50 mM NaCl.

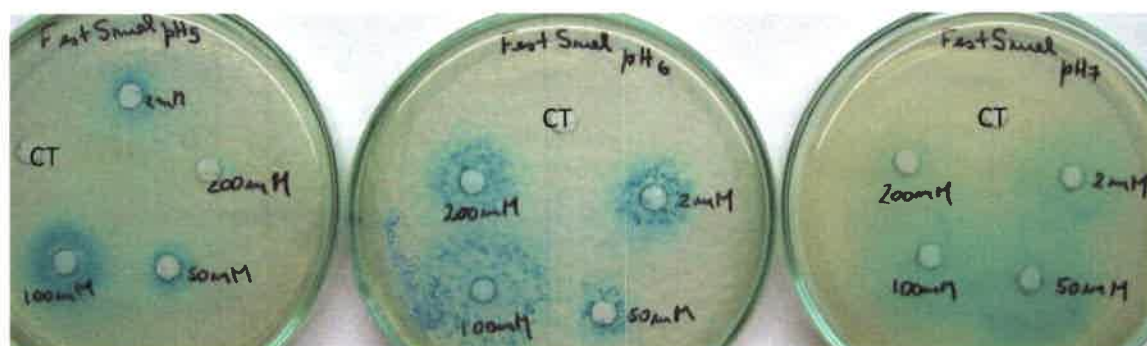


Figura 5.18: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de *S. meliloti*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens*, sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de *S. meliloti* B399 en fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos; 2, 5, 100 y 200 mM corresponden a la concentración de NaCl para cada tratamiento; CT: control sembrado solamente con medio de cultivo estéril.

El crecimiento de *B. japonicum* E109 en medio a pH 5 fue escaso (DO_{550nm} : 0,05, luego de 96 h de incubación), y como consecuencia de ello no se detectaron AHLs. A pH 6 y pH 7, el crecimiento no estuvo afectado. Sin embargo, la adición de 100 mM NaCl en medio levemente ácido (pH 6) produjo una disminución del crecimiento, el que fue nulo en presencia de 200 mM NaCl y pH 6 y 7, aún cuando la viabilidad no se afectó. Con respecto al efecto del estrés salino sobre la producción de AHLs, se observó que ésta se encuentra afectada en medio con concentraciones de NaCl superiores a 50 mM. De igual modo, la acidificación del medio (pH 5 y 6) produjo una disminución en los niveles de AHLs secretadas.



Figura 5.19: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de *B. japonicum*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens*, sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos; 2, 5, 100 y 200 mM corresponden a la concentración de NaCl para cada tratamiento; CT: control sembrado solamente con medio de cultivo estéril.

El comportamiento de *B. elkanii* U1302 no difirió del observado en *B. japonicum* E109. El crecimiento de esta cepa fue nulo a pH 5, por lo que, en esas condiciones no se detectaron AHLs. A pH 6 y pH 7 y en presencia de 50mM NaCl, el crecimiento no estuvo afectado. A pH 6 se observó una disminución del crecimiento cuando se aumentó la concentración salina a 100mM. Con el agregado de 200mM de NaCl, los microorganismos no crecieron en ninguno de los dos valores de pH evaluados, si bien su viabilidad no se vio afectó.

La producción de AHLs no se detectó a pH 6, en cualquier concentración salina, indicando que la producción de autoinductores está inhibida en condiciones de pH levemente ácido y a una concentración de NaCl de 50mM y mayores (Figura 5.20).



Figura 5.20: Efecto del pH y la concentración salina sobre la producción de AHLs de *B. elkanii*. Placas conteniendo el microorganismo biosensor *Agrobacterium tumefaciens*, sembradas con sobrenadantes provenientes de cultivos de fase estacionaria del crecimiento con distintos tratamientos; 2, 5, 100 y 200 mM corresponden a la concentración de NaCl para cada tratamiento; CT: control sembrado solamente con medio de cultivo estéril.

En el Cuadro 5.1 se resumen los resultados obtenidos en este capítulo.

Cuadro 5.1: Efecto de la disponibilidad de nutrientes y estrés ambiental sobre la producción de AHLs

Microorganismo	Producción de AHLs en condiciones de:			
	Alta disponibilidad de hierro	Baja disponibilidad de nitrógeno	Acidez	Salinidad
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	incremento	disminución	disminución	disminución
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	No varía	disminución	disminución	disminución
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	No varía	disminución	No varía	disminución
<i>Sinorhizobium fredii</i>	incremento	disminución	No varía	disminución
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	No varía	disminución	No varía	incremento
<i>Rhizobium tropici</i>	No varía	disminución	incremento	No varía

Se observa que cada microorganismo exhibe un patrón de respuesta particular. Ello cobra importancia en la rizosfera si se considera en este hábitat conviven diferentes grupos bacterianos capaces de percibir múltiples señales y generan diferentes respuestas frente a un mismo estímulo, lo que podría finalmente alterar las interacciones simbióticas.

Las bacterias deben sobrevivir y competir en comunidades microbianas complejas. Las interacciones entre microorganismos, así como con sus huéspedes, dependen de la expresión de genes que les permitan sentir y responder a condiciones ambientales cambiantes. Si bien para algunas especies rizobianas el rol de las AHL en los sistemas de *quorum* ha sido estudiado en profundidad en condiciones de laboratorio (Gurich y González, 2009), pocos avances se han realizado en la determinación del modo en que los sistemas de *quorum* son afectados por distintos factores ambientales (bióticos y abióticos). Estudios recientes indican que las condiciones ambientales pueden afectar la producción de las moléculas señal. Se ha propuesto que ello sería consecuencia de cambios en la velocidad de producción de la señal, en su vida media o en sus propiedades de difusión (Horswill y col., 2007; Decho y col., 2009; 2010). La continuación de estudios orientados en este sentido, permitirá analizar con mayor profundidad el fenómeno de *quorum* en ambientes naturales.

CAPITULO 6

Efecto de las AHLs sobre el comportamiento simbiótico

El estudio de la regulación de los genes *nod* y de la producción de polisacáridos celulares de los rizobios en presencia de señales *quorum*, así como de la influencia de diferentes condiciones ambientales sobre la producción de AHLs (cuyos resultados se presentaron en los capítulos anteriores), se complementó con la evaluación del efecto de estas moléculas sobre el comportamiento simbiótico de los microorganismos. Nos interesó analizar si la infectividad y la efectividad de las bacterias estudiadas están afectadas en cultivos en alta densidad celular y elucidar si ello era consecuencia de la densidad celular o del estado metabólico (fase de crecimiento) de los microorganismos. Teniendo en cuenta que en el ambiente natural donde se introducen los inoculantes pueden existir poblaciones rizobianas ya establecidas, se estudió el efecto de los autoinductores producidos por dichas poblaciones sobre el comportamiento simbiótico de los inoculantes.

Influencia de la densidad celular y el estado metabólico de rizobios sobre el comportamiento simbiótico

Con la finalidad de determinar la influencia de autoinductores liberados por cultivos de alta densidad celular, sobre la infectividad y efectividad rizobiana frente a su leguminosa huésped, se realizaron ensayos en plantas de soja, alfalfa, maní y poroto.

Soja

Se inocularon semillas pregerminadas con cultivos de *B. japonicum* E109, *B. elkanii* U1302 y *S. fredii* HH103 de:

- a) alta densidad celular y en fase estacionaria del crecimiento (tal como se formulan los inoculantes comerciales)
- b) baja densidad celular y en fase estacionaria del crecimiento (dilución de cultivos en fase estacionaria)
- c) baja densidad celular y en fase exponencial del crecimiento.

De esta manera fue posible analizar el efecto de 2 variables:

- 1) densidad celular: evaluada en los ensayos a y b
- 2) estado metabólico: evaluada en los ensayos b y c

Para cada microorganismo se realizaron tres experimentos en forma independiente. En la Tabla 6.1 se muestran las concentraciones bacterianas que se utilizaron para inocular las semillas.

Tabla 6.1: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de soja (UFC/ml).

Microorganismo	Fase estacionaria	Fase estacionaria diluida	Fase exponencial
<i>B. japonicum</i> E109	$2,0 \times 10^{10}$	$2,5 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7$
<i>B. elkanii</i> U1302	$2,1 \times 10^9$	$3,0 \times 10^6$	$7,0 \times 10^6$
<i>S. fredii</i> HH103	$2,0 \times 10^9$	$4,5 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6$

Los resultados obtenidos con *B. japonicum* indican que no hubo diferencia entre los tratamientos en la capacidad de nodular (Figura 6.1) y fijar simbióticamente el nitrógeno atmosférico (Figuras 6.2 y 6.3). Por lo tanto, resulta probable que en cultivos de alta densidad celular, aún cuando en esta tesis se demostró que se incrementa la producción de AHLs (Fig 3.1), la expresión de genes *nod* no se encuentre reprimida. Otra posibilidad es que, aún cuando esté reprimida, ello no se traduzca en un efecto sobre el número de nódulos formados.

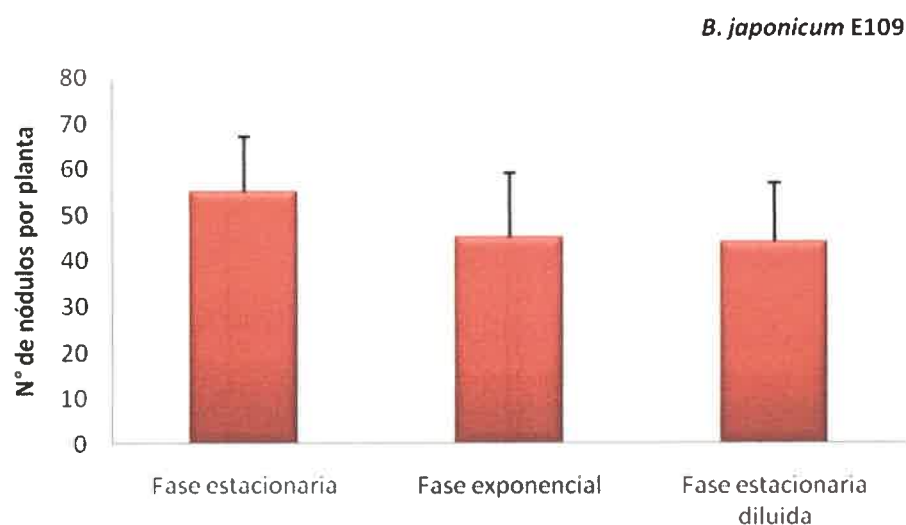


Figura 6.1: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas inoculadas con *B. japonicum* E109. Los datos se expresan como la media \pm ES, n=10.

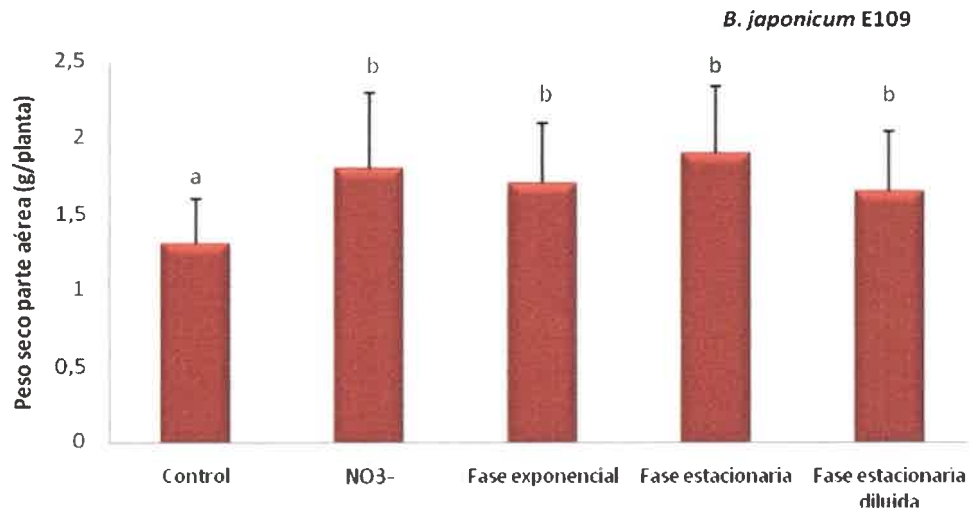


Figura 6.2: Peso seco de parte aérea de plantas inoculadas con *B. japonicum* E109. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos. ANOVA, p<0,05; n=10.

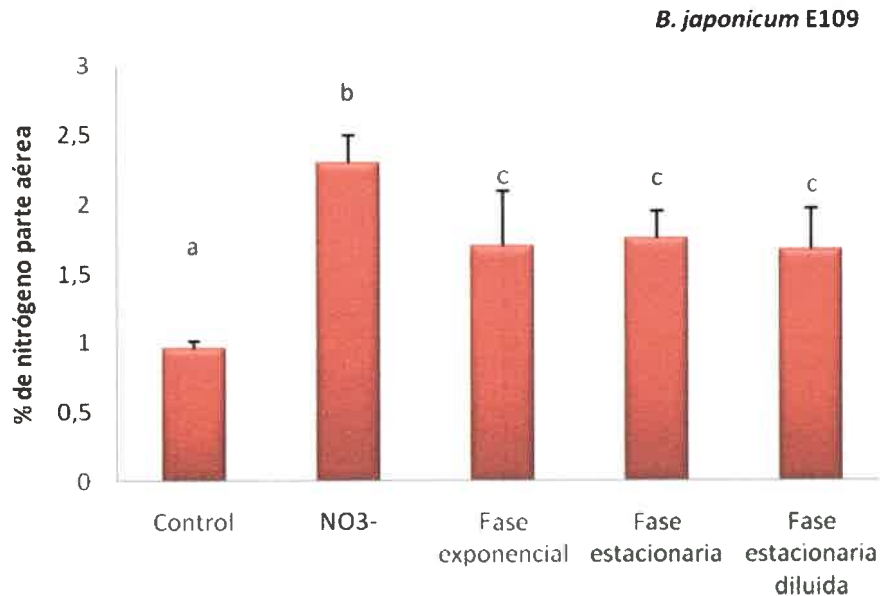


Figura 6.3: Contenido de nitrógeno en parte aérea de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos. ANOVA, p<0,05; n=10.

En este sentido, Loh y col. (2001) mostraron que la represión de la expresión de los genes *nod* en *B. japonicum* USDA 110, por acción de

moléculas de QS, afecta la infectividad de esta cepa sin alterar el número total de nódulos formados. La infectividad rizobiana se entiende como la capacidad de una cepa para nodular la raíz de la leguminosa específica, y depende de su capacidad de colonización, supervivencia y competitividad en la rizósfera. Es por ello que, para algunos sistemas simbióticos, se considera que los nódulos ubicados en la raíz primaria son inducidos por rizobios más infectivos que los que se ubican en las raíces laterales (Jitackson y Sadowsky, 2008; Cardozo y col., 2009). El efecto de la densidad celular y del estado metabólico de la cepa inoculada sobre su infectividad, se evaluó comparando en los diferentes tratamientos el número de nódulos presente en el cuello de la raíz de las plantas inoculadas (Figura 6.4).

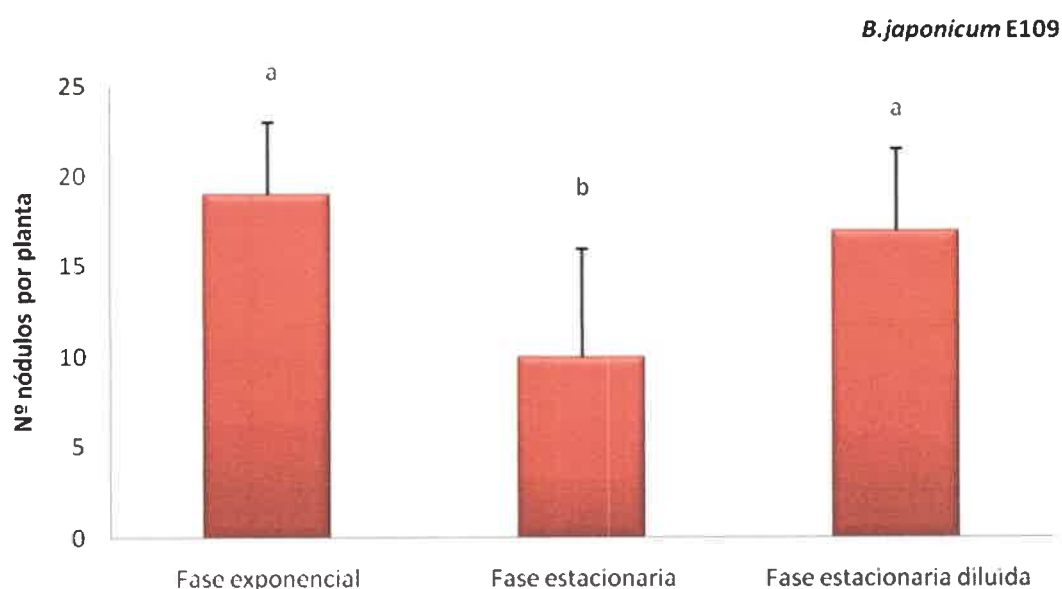


Figura 6.4: Número de nódulos en el cuello de raíz de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con *B. japonicum* E109. Los datos se expresan como la media \pm ES. Letras diferentes indican diferencia significativa, ANOVA, $p < 0.05$; $n = 10$.

Los resultados indican que se puede atribuir a la elevada densidad celular (con la consecuente producción de AHLs), y no al estado metabólico en que se encuentran sus células. Ello debido a que en plantas inoculadas con cultivos de alta densidad (y en fase estacionaria) el número de nódulos formados en el cuello de la raíz fue menor que el obtenido cuando se inoculó con células en fase

exponencial o en fase estacionaria diluida. Dado que sólo en los cultivos provenientes de fase estacionaria del crecimiento se detectó la presencia de moléculas autoinductoras (Figura 3.1), es posible sugerir que la disminución en la infectividad de esta cepa se vincularía con la presencia de AHLs. Si se considera que el contenido de EPS en esta cepa no está modificado cuando se encuentra en presencia de AHLs (Tabla 4), es posible suponer que su capacidad de adherirse o generar biofilms no estaría alterada.

Los resultados obtenidos en su conjunto, permiten inferir que, en condiciones de campo, la menor capacidad infectiva de inoculantes formulados en base a cultivos de *B. japonicum* E109 de alta densidad celular y en fase estacionaria del crecimiento, redundará en una menor competitividad frente a las cepas ya establecidas en el suelo.

A diferencia de lo observado para *B. japonicum*, los resultados obtenidos con *B. elkanii* muestran que cuando las plantas se inoculan con cultivos de alta densidad celular, en los que, en consecuencia, se encuentran presentes moléculas autoinductoras, se induce la formación de un menor número de nódulos (Figura 6.5), y se afecta de este modo la fijación de nitrógeno y el aumento de la biomasa (Figuras 6.6 y 6.7). La inhibición de la nodulación parece ser independiente del estado metabólico de los microorganismos, ya que se determinó tanto en plantas inoculadas con cultivos en fase exponencial como con cultivos en fase estacionaria diluida (Figuras 6.5-6.7). Estos resultados coinciden con los informados por Loh y col. (2001) para *B. japonicum* USDA 110 quienes lo atribuyeron a la regulación negativa de genes de nodulación en cultivos de alta densidad celular.

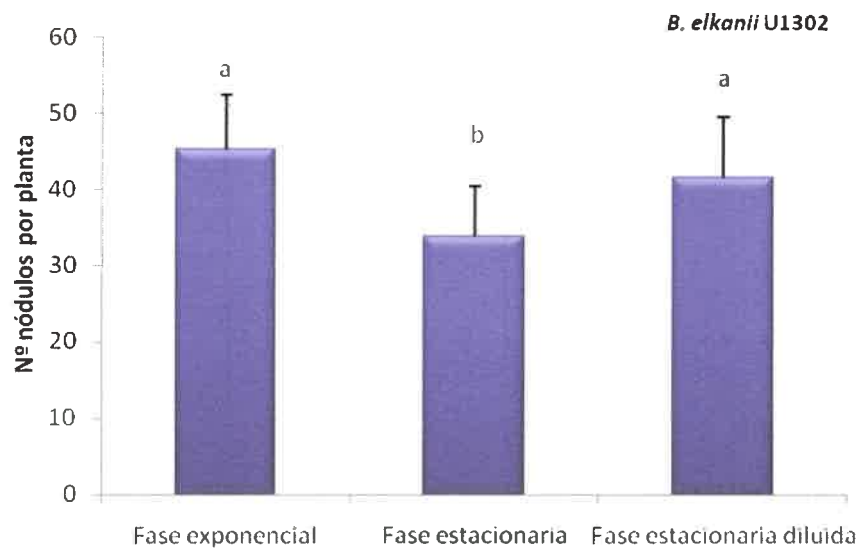


Figura 6.5: Número de nódulos totales en raíz de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con *B. elkanii*. Los datos se expresan como la media \pm ES, n=10. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,05$.

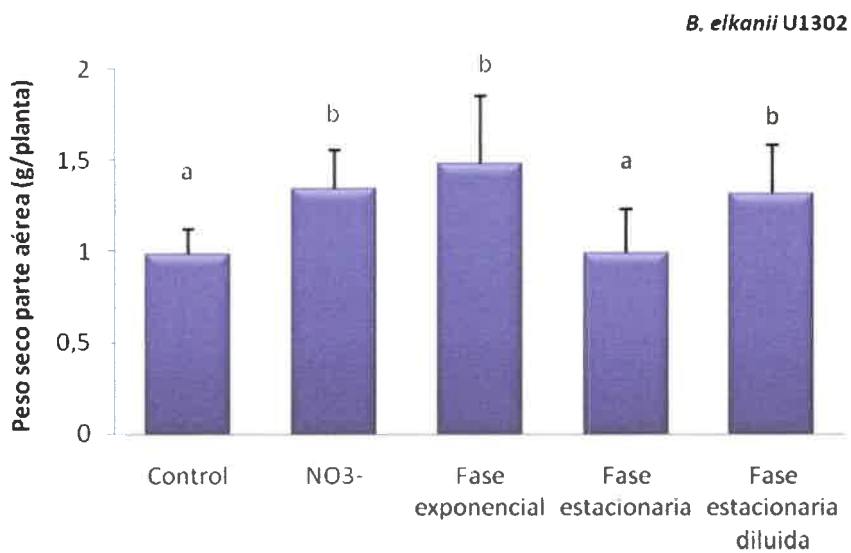


Figura 6.6: Peso seco de parte aérea de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con *B. elkanii*. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media \pm ES, n=10. Letras diferentes indican diferencias significativas con un $p < 0,05$.

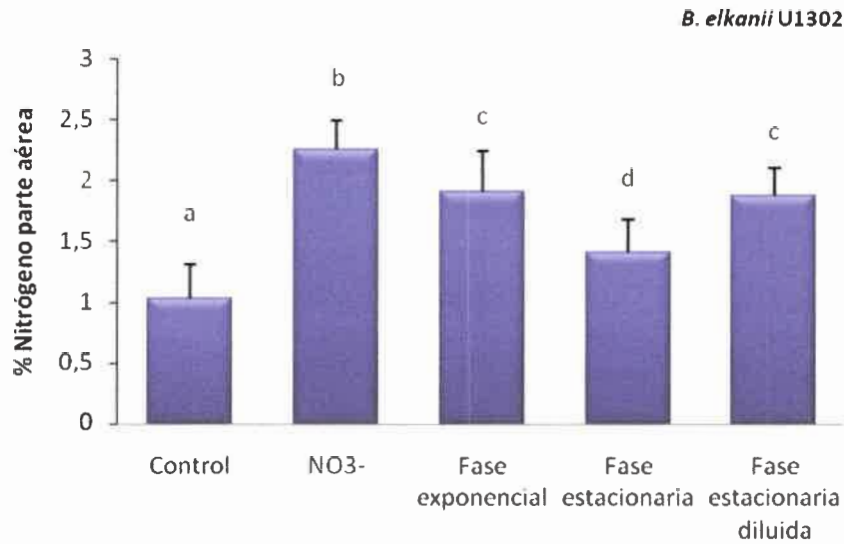


Figura 6.7: Contenido de nitrógeno en parte aérea de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con *B. elkanii*. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras diferentes muestran diferencias significativas con un p<0,05

Si bien la infectividad de *B. elkanii* se encuentra afectada cuando se inoculan cultivos de alta densidad celular (Figura 6.8), de los resultados obtenidos respecto del número de nódulos en el cuello de la raíz, es también posible inferir que, en las condiciones en que se realizaron estos ensayos, dicha infectividad es mayor que la mostrada por *B. japonicum*, ya que indujo la formación de un número mayor de nódulos en la corona de la raíz. Esta característica podría ser tomada en cuenta a la hora de seleccionar cepas para la producción de inoculantes para soja.

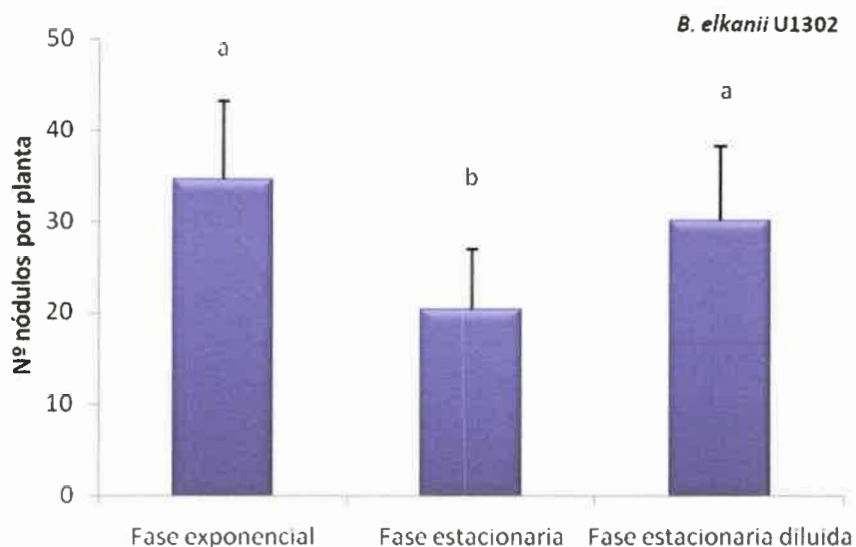


Figura 6.8: Número de nódulos en cuello de raíz de plantas de soja, para diferentes tratamientos de inoculación con *B. elkanii*. Los datos se expresan como la media \pm ES. Letras diferentes muestran diferencias significativas con un $p < 0,05$

A diferencia de lo observado en plantas de soja inoculadas con *B. japonicum*, cuando se inoculó con *S. fredii* no se encontraron diferencias en el número de nódulos formados (Figura 6.9) y en la fijación de nitrógeno entre los diferentes tratamientos evaluados (Figuras 6.10 y 6.11). Los nódulos se ubicaron preferentemente en la raíz secundaria, por lo que no se realizó la estimación de la infectividad para esta cepa.

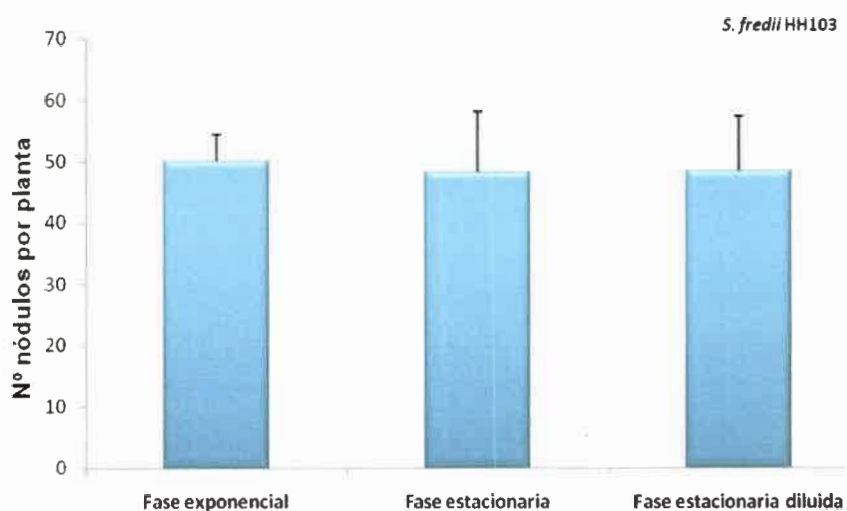


Figura 6.9: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con *S. fredii* HH 103. Los datos se expresan como la media \pm ES, $n=10$.

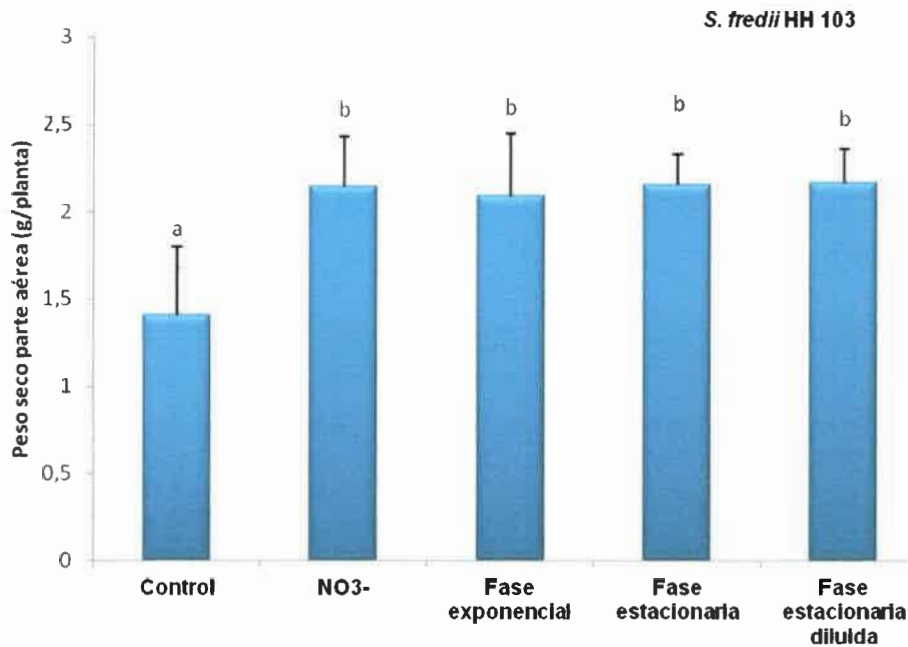


Figura 6.10: Peso seco de parte aérea para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con *S. fredii* HH 103. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$.

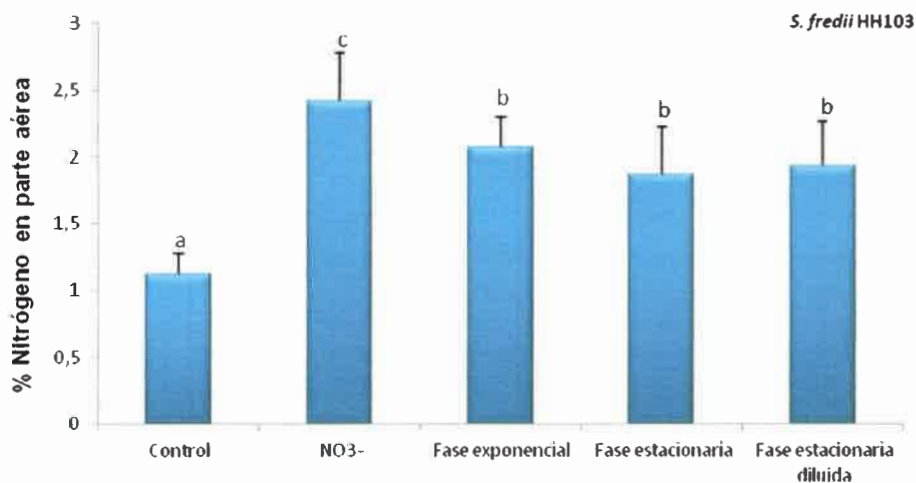


Figura 6.11: Contenido de nitrógeno para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con *S. fredii* HH103. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$.

Ensayos anteriores permitieron concluir que, en fase estacionaria, la expresión de los genes *nod* está reprimida en estos microorganismos

(Tabla 3.6). Además, y dado que la adición de AHLs a cultivos en estadios más tempranos del crecimiento (fase exponencial) indujo la transcripción de dichos genes (Tabla 3.8), se propuso que cuando *S. fredii* HH103 se encuentra en fase estacionaria, el sistema de QS sería modulado por otro sistema regulador, como ha sido descrito en *Bacillus subtilis* (Lazazzera, 2000). A partir de los resultados que se muestran (Figuras 6.9, 6.10 y 6.11) es posible inferir que la capacidad de nodulación y efectividad de cultivos de alta densidad celular de *S. fredii* HH103 no está afectada, aún cuando la expresión de los genes *nod* se encuentra reprimida. Ello apoyaría nuestra hipótesis de que otro sistema regulador sería activado en este microorganismo cuando alcanza la fase estacionaria de crecimiento. Teniendo en cuenta los estudios mencionados, se evaluó en forma adicional el comportamiento simbiótico de cultivos jóvenes (fase exponencial) de *S. fredii* HH103 suplementados con AHLs. Los resultados se muestran en la Figura 6.12, y permiten relacionar la inducción de los genes *nod* mediada por AHLs en células en dicha fase de crecimiento, con un aumento en su capacidad de inducir el desarrollo de nódulos.

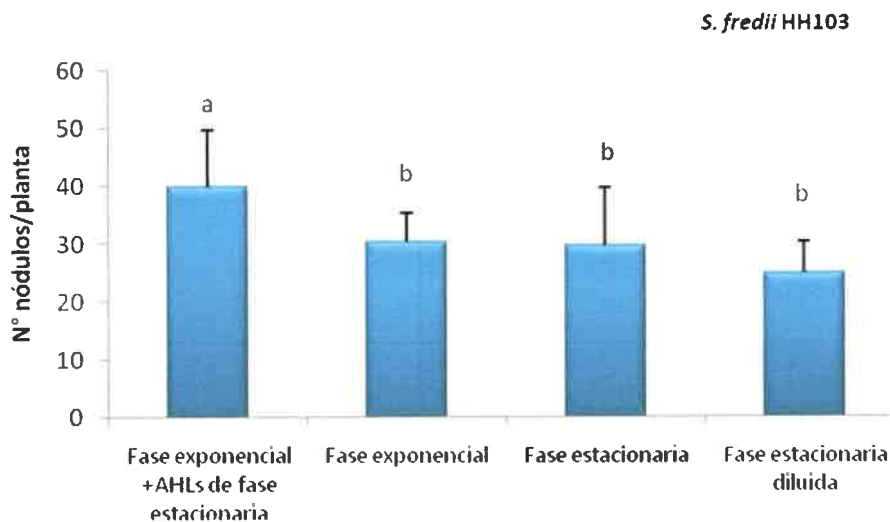


Figura 6.12: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas de soja inoculadas con *S. fredii* HH 103. Los datos se expresan como la media \pm ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos. ANOVA, $p < 0,05$ $n = 10$.

Alfalfa

En alfalfa se realizaron tres ensayos independientes con los mismos tratamientos que fueron descritos para plantas de soja. En la Tabla 6.2 se muestran las concentraciones de microorganismos utilizadas para inocular las plantas.

Tabla 6.2: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de alfalfa.

Cepa bacteriana	Fase estacionaria	Fase estacionaria diluida	Fase exponencial
<i>S. meliloti</i> B399	$1,3 \times 10^{10}$ UFC/ml	$5,8 \times 10^7$ UFC/ml	$3,3 \times 10^7$ UFC/ml

La evaluación del comportamiento simbiótico de los distintos cultivos de *S. meliloti* B399 inoculados indica que no hubo diferencias en cuanto al número total de nódulos formados (Figura 6.13), número de nódulos en la raíz principal (Figura 6.14), peso seco (Figura 6.15) y contenido de nitrógeno (Figura 6.16) de la parte aérea de las plantas. Ello indica que concentraciones del inoculante que difieren en 1000 veces, aún en presencia de AHLs, presentan la misma capacidad de nodular y de fijar nitrógeno. Estos resultados se correlacionan con la ausencia de regulación negativa de la expresión de genes *nod* por acción de AHLs, determinada previamente en *S. meliloti* B399 (Tablas 3.6 y 3.8).

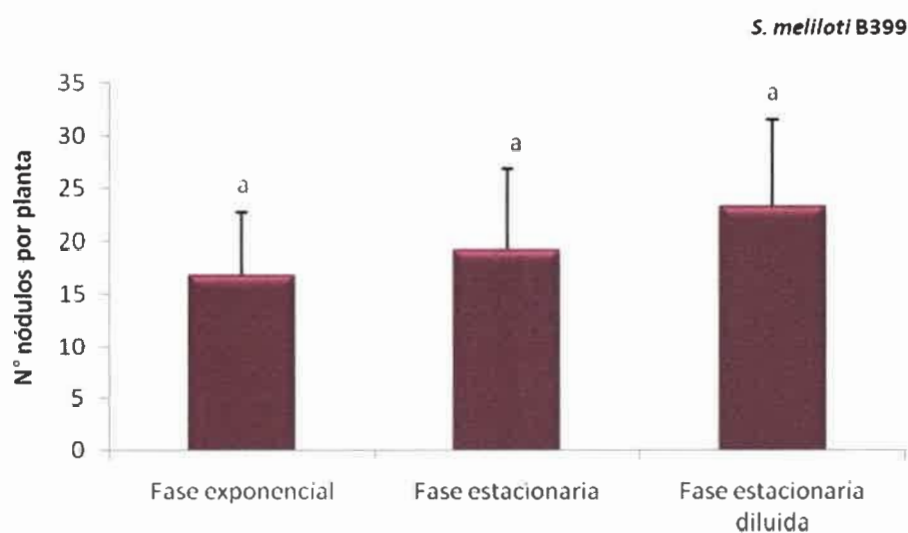


Figura 6.13: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación con *S. meliloti* B399 en plantas de alfalfa. Los datos se expresan como la media \pm ES, n=10.

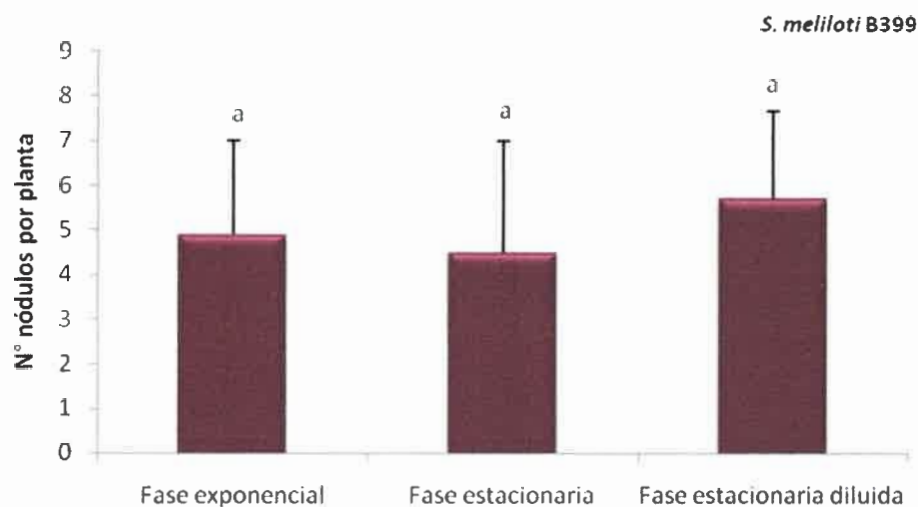


Figura 6.14: Número de nódulos en raíz principal para distintos tratamientos de inoculación con *S. meliloti* B399 en plantas de alfalfa. Los datos se expresan como la media \pm ES, n=10.

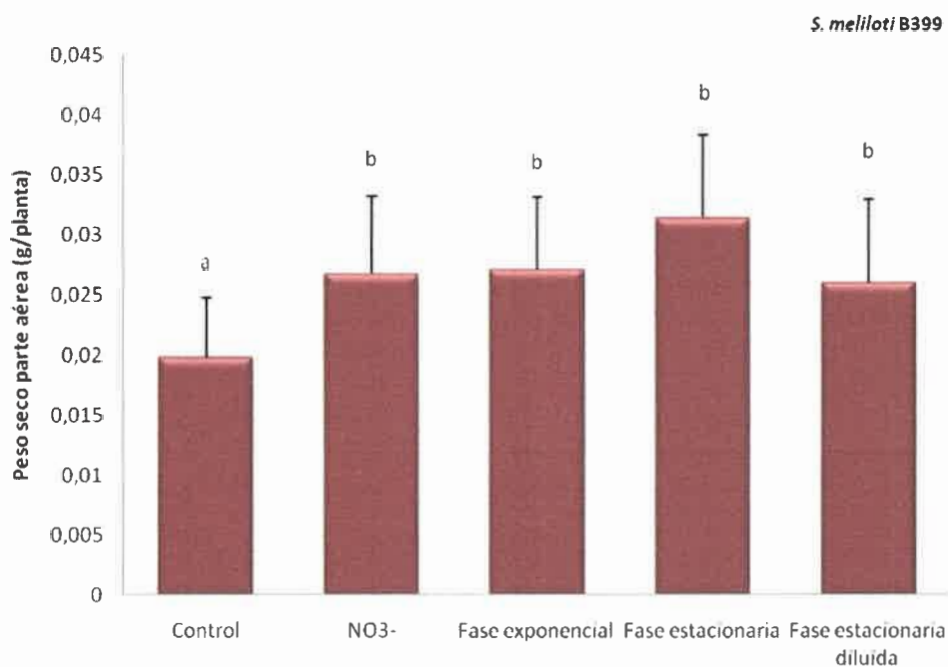


Figura 6.15: Peso seco de parte aérea de plantas de alfalfa para diferentes tratamientos de inoculación con *S. meliloti* B399. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los valores se expresan como la media \pm ES, Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos. ANOVA, p<0,05; n=10.

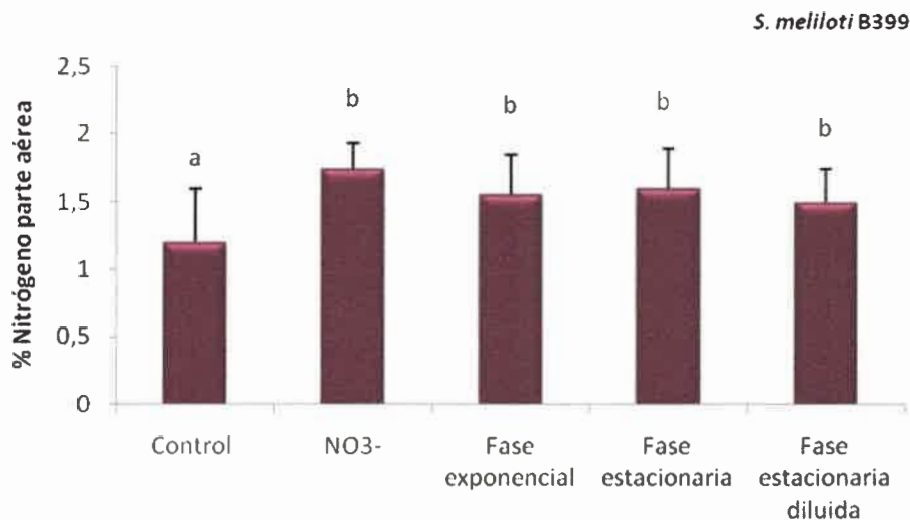


Figura 6.16: Contenido de nitrógeno de parte aérea para distintos tratamientos de inoculación con *S. meliloti* B399, en plantas de alfalfa. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, ANOVA; p<0,05; n=10.

Marketon (2002a) informó que, la nodulación en alfalfa está regulada por QS, ya que mutantes de *S. meliloti* Rm1021 afectados en dicho sistema, indujeron la formación de un menor número de nódulos que la cepa salvaje. En estudios posteriores, el mismo autor mostró que en este microorganismo, la síntesis de EPS (moléculas relevantes en el establecimiento de simbiosis) está regulada positivamente por el sistema *quorum*, lo que podría explicar la alteración en el comportamiento simbiótico de la mutante evaluada. En los estudios aquí mostrados, aún cuando la síntesis de EPS en *S. meliloti* B399 se vio incrementada en presencia de AHLs, dicho incremento no se correlacionó con una mayor nodulación.

Maní

Las plantas de maní se inocularon con cultivos del rizobio específico *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, en las siguientes concentraciones:

Tabla 6.3: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de maní.

Cepa bacteriana	Fase estacionaria	Fase estacionaria diluida	Fase exponencial
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	$2,0 \times 10^8$ UFC/ml	$2,7 \times 10^5$ UFC/ml	$3,2 \times 10^5$ UFC/ml

A diferencia de lo informado para *B. japonicum* USDA 110 en soja (Loh y col., 2002b), el número de nódulos formados por *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 en maní fue significativamente mayor en plantas inoculadas con microorganismos en fase estacionaria del crecimiento sin diluir, respecto de los otros dos tratamientos (Figura 6.17). Dicho incremento se correlacionó con un aumento en el contenido de nitrógeno de las plantas (Figura 6.19) aún cuando no se observaron variaciones en su peso seco (Figura 6.18). En estos ensayos no se analizó la infectividad de la cepa dado que, en esta leguminosa, el número de nódulos formados en cuello o raíz principal no es indicador de dicho parámetro, ya que la infección rizobiana en maní ocurre en las fisuras que se producen como consecuencia de la formación de raíces laterales (mecanismo de infección denominado “crack-entry”).

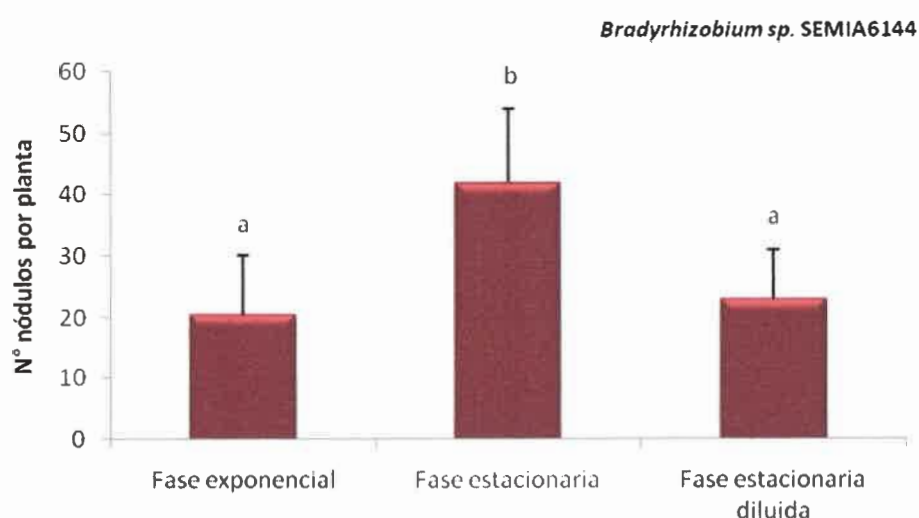


Figura 6.17: Número de nódulos por planta en raíz de plantas de maní, para diferentes tratamientos de inoculación con *Bradyrhizobium sp.* Los datos se expresan como la media \pm ES, n=10. Letra diferentes indican diferencia significativa con $p < 0.05$.

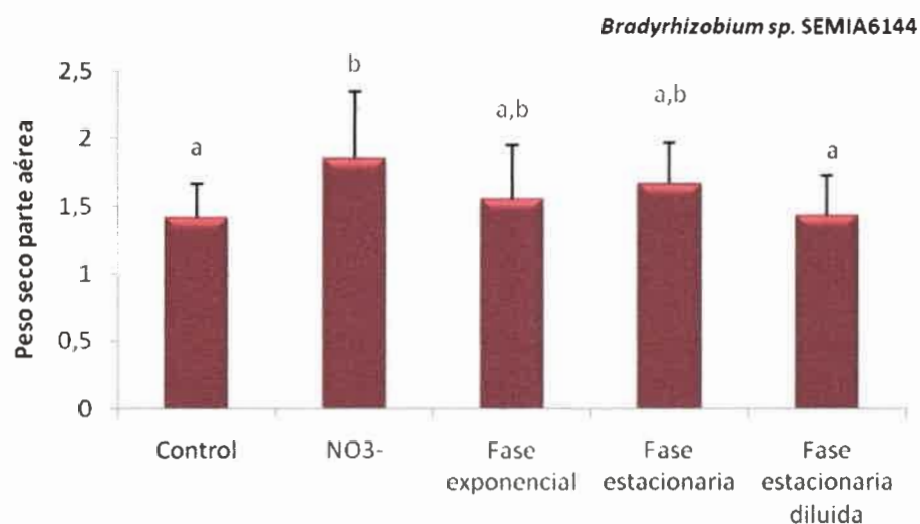


Figura 6.18: Peso seco en parte aérea de plantas de maní, para diferentes tratamientos de inoculación con *Bradyrhizobium sp.* Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES, n=10. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos, ANOVA, p<0,05.

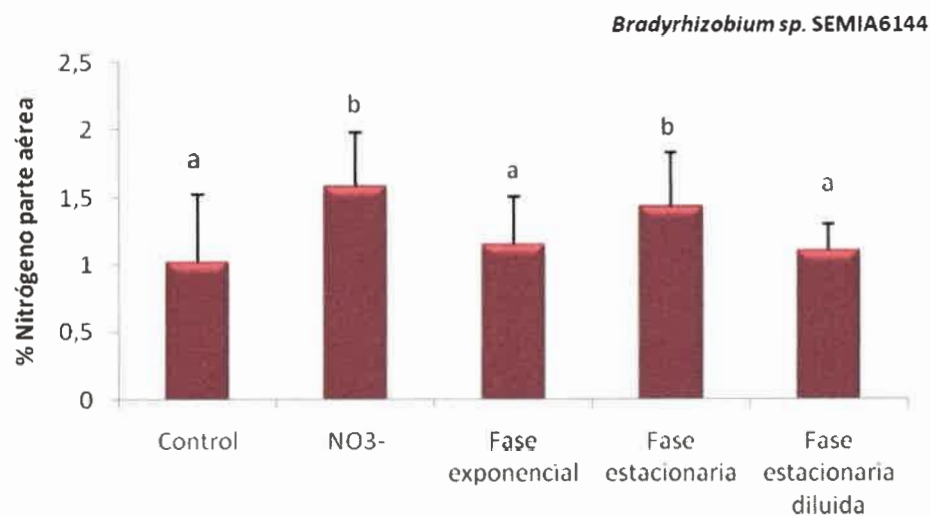


Figura 6.19: Contenido de nitrógeno en parte aérea de plantas de maní, para diferentes tratamientos de inoculación con *Bradyrhizobium sp.* Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos. ANOVA, p<0,05; n=10.

Dado que cultivos de *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 en fase estacionaria producen AHLs (Figura 3.1), los resultados obtenidos parecen indicar que en estos microorganismos dichas moléculas no reprimen la expresión de genes de nodulación. El incremento en la capacidad de esta cepa de inducir la formación de nódulos cuando se inoculó en fase estacionaria, podría correlacionarse con el aumento en el contenido de EPS y CPS detectado en presencia de AHLs (Tabla 4), lo que podría otorgarle una mayor protección al microorganismo contra las reacciones de defensa de la planta. En este sentido, Morgante y col. (2005) informaron que la síntesis de EPS en simbioses de maní se requiere para la formación de nódulos eficientes, y le adjudicaron a dichas moléculas un rol de protección frente a las especies reactivas del oxígeno producidas por maní en su interacción con rizobios (Morgante y col., 2007).

Poroto

Las plantas fueron inoculadas con cultivos del rizobio específico *R. tropici* CIAT899, en las siguientes concentraciones:

Tabla 6.4: Concentraciones de suspensiones de microorganismos utilizadas en ensayos de inoculación de plantas de poroto.

Cepa bacteriana	Fase estacionaria	Fase estacionaria diluida	Fase exponencial
<i>R. tropici</i>	8,2x 10 ⁹ UFC/ml	6,5 x 10 ⁶ UFC/ml	7,01 x10 ⁶ UFC/ml

Los resultados obtenidos indicaron que no existen diferencias entre los tratamientos en cuanto al número total de nódulos formados (Figura 6.20), al peso seco de la parte aérea (Figura 6.21) y al contenido de nitrógeno de la parte aérea (Figura 6.22). Ello no era esperable si se considera el incremento en la expresión de genes de nodulación por acción de AHLs previamente determinada (Tablas 3.6, 3.7 y 3.8).

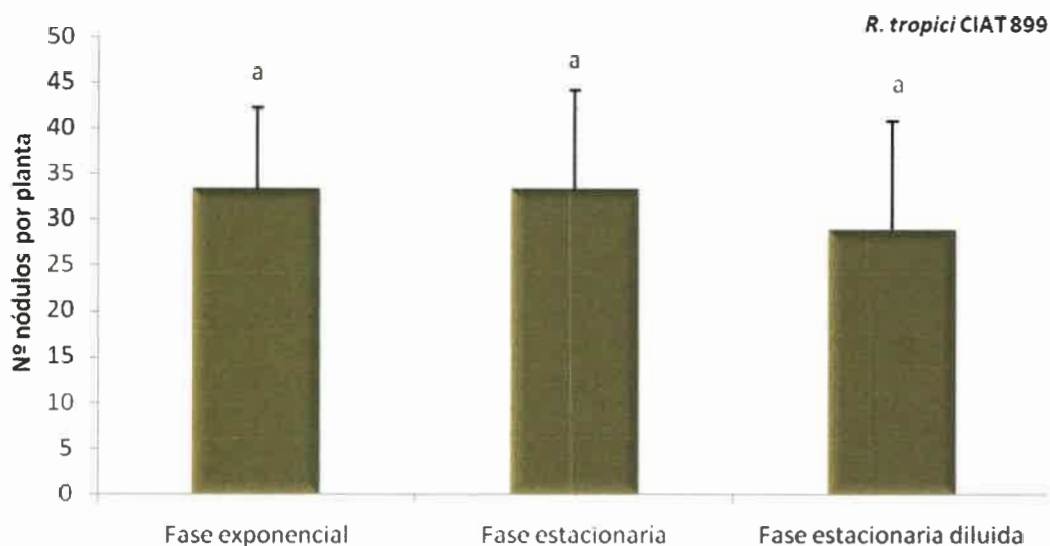


Figura 6.20: Número de nódulos para distintos tratamientos de inoculación en plantas de poroto con el microorganismo *R tropici* CIAT 899. Los datos se expresan como la media \pm ES. n=10.

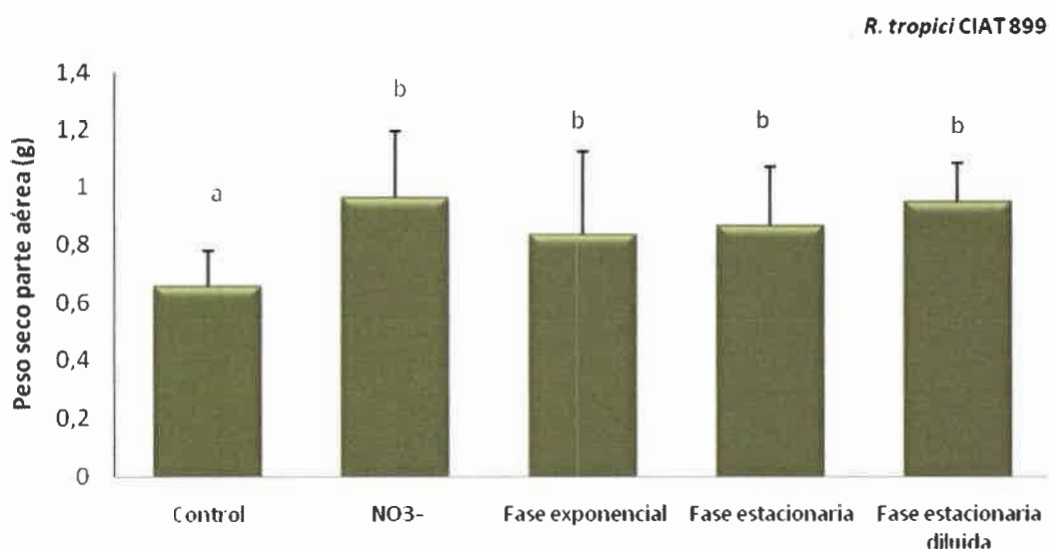


Figura 6.21: Peso seco de parte aérea para distintos tratamientos de inoculación en plantas de poroto con el microorganismo *R tropici* CIAT 899. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media \pm ES.. Letras distintas indican diferencia significativa. ANOVA, $p < 0,05$; n=10

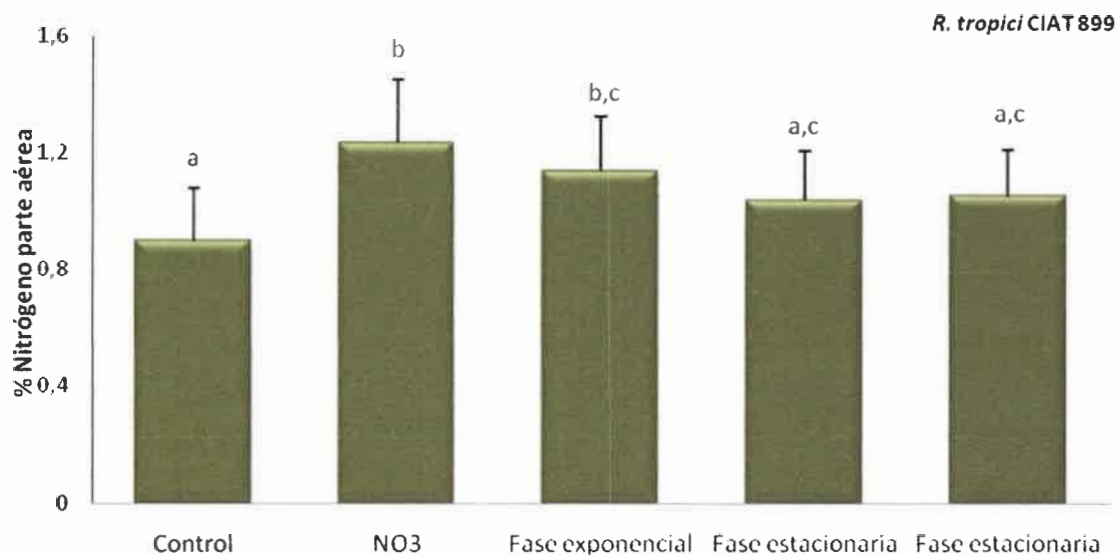


Figura 6.22: Contenido de nitrógeno para distintos tratamientos de inoculación en plantas de poroto con el microorganismo *R. tropici* CIAT 899. Control: sin inocular, NO₃⁻: fertilizado con nitrógeno inorgánico (7mM NH₄NO₃). Los datos se expresan como la media ± ES. Letras distintas indican diferencia significativa entre tratamientos. ANOVA, p<0,05; n=10.

No fue posible evaluar en este sistema simbiótico la cantidad de nódulos formados en cuello o raíz principal debido a que, en esta planta, dichos órganos se distribuyeron en cúmulos y de modo heterogéneo.

Efecto de la población rizobiana presente en el suelo sobre el comportamiento simbiótico de rizobios inoculados

Es conocido que inoculaciones realizadas con cultivos de *B. japonicum* USDA 110 en alta densidad celular inhiben la expresión de genes *nod* y, por lo tanto, la infectividad de estas cepas. Ello fue atribuido a la acción de las AHLs que se encuentran en alta concentración cuando el número de células viables de los inoculantes es elevado (Loh y col., 2001; Jitacksorn y Sadowsky, 2008). Estos resultados plantearon el interrogante acerca de si efectos similares pudieran estar ocurriendo, aún con inoculantes formulados en baja densidad celular, como consecuencia de la presencia en el suelo de rizobios de la misma cepa o diferentes.

Con el objetivo de evaluar el efecto de la densidad de las poblaciones de rizobios presentes en el suelo sobre la capacidad de nodulación de cepas bacterianas inoculadas en un número de células marcadamente

inferior al establecido para los inoculantes comerciales, se realizaron ensayos cuyos resultados se muestran a continuación. Dichos ensayos permitieron inferir acerca del efecto de la molécula *quorum* sintetizada por la población rizobiana previamente establecida en el suelo, sobre el comportamiento simbiótico de las cepas inoculadas.

En estos ensayos las plantas estuvieron creciendo en macetas conteniendo suelo estéril y vermiculita. El soporte se inoculó con diferentes concentraciones celulares de *B. japonicum*: 10^2 UFC/g (baja densidad) o 10^5 UFC/g (alta densidad), constituyendo de este modo la población de rizobios establecidos. Luego de la emergencia de las plántulas, éstas se inocularon con 1 mL de suspensiones bacterianas de baja densidad celular (DO_{600} : 0,05, equivalente a 10^6 microorganismos/ml). Como control positivo se le adicionó al soporte, 1 mL de sobrenadante de cultivos de alta densidad celular en el cual la presencia de AHLs había sido previamente determinada (Figura 3.1). Los tratamientos realizados se indican en la siguiente Tabla:

Tabla 6.5: Tratamientos realizados en ensayos de nodulación en plantas con diferentes poblaciones establecidas.

Tratamientos	Población establecida (UFC/g suelo)	Inoculación
1: Baja densidad rizobiana en suelo	10^2	1×10^6 UFC
2: Control positivo de tratamiento 1	$10^2 + \text{AHLs}$	1×10^6 UFC
3: Alta densidad rizobiana en el suelo	10^5	1×10^6 UFC
4: Control positivo de tratamiento 3	$10^5 + \text{AHLs}$	1×10^6 UFC
5: Ausencia de rizobios en el suelo	0	1×10^6 UFC
6: Control positivo de tratamiento 5	0 + AHLs	1×10^6 UFC

A los 30 días posteriores a la inoculación, se evaluó el número de nódulos formados en las distintas condiciones. De acuerdo al diseño experimental realizado, se analizaron los datos con ANOVA de dos

factores y se determinó la presencia de interacción entre las variables población preestablecida y presencia de AHLs. Se analizaron las diferencias entre los tratamientos con ANOVA de un factor.

Interacción soja-*B. japonicum*

En plantas de soja inoculadas con *B. japonicum*, los datos revelaron que la nodulación está influenciada negativamente por la densidad de los microorganismos preestablecidos en el suelo (Figura 6.23, Tratamiento 1 vs Tratamiento 3). Este efecto puede ser atribuido a las AHLs producidas por la población establecida, debido a que el número de nódulos formados no difirió del obtenido en plantas creciendo en un suelo con baja densidad de rizobios preestablecidos, pero suplementado con dichas moléculas (Tratamiento 3 vs Tratamiento 2). Además, y en apoyo de esta hipótesis, se determinó que la presencia de moléculas *quorum* en el suelo cuya población rizobiana establecida es baja (Tratamiento 2) disminuyó significativamente el número de nódulos formados (Tratamiento 1 vs Tratamiento 2) y en los tratamientos sin población establecida, la presencia de AHL determinó una disminución significativa de la nodulación (Tratamiento 6 vs Tratamiento 5).

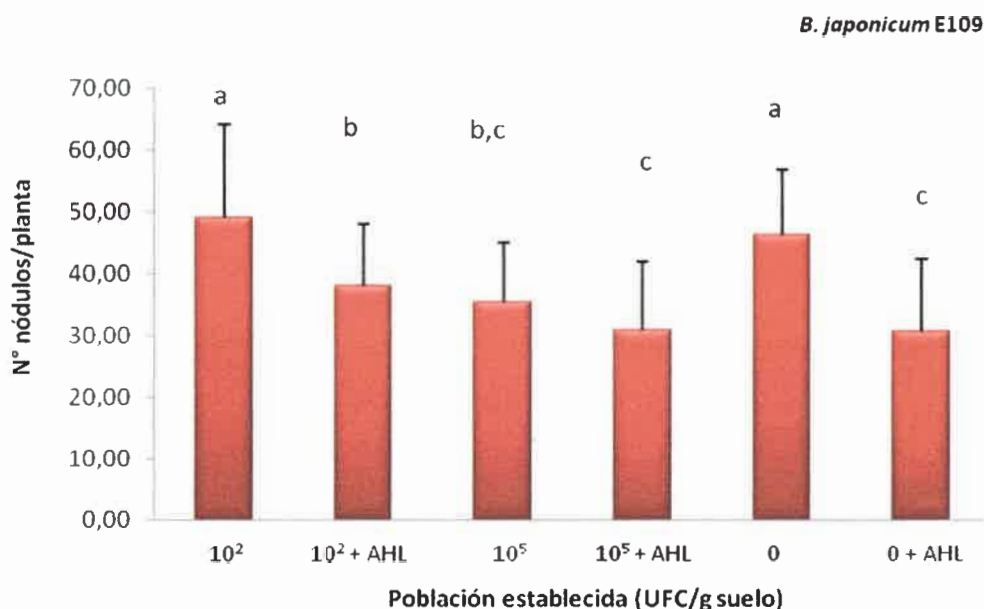


Figura 6.23 : Número de nódulos en plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* E109, con diferentes poblaciones de rizobios establecidas en el suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, $p < 0,05$; $n=10$

En base a estos resultados y a los mostrados anteriormente que indican que en este microorganismo la expresión de genes *nod* es inhibida por AHLs (Tablas 3.6, y 3.8), se puede inferir que, en soja, la práctica de inocular con cultivos de alta densidad celular, en los que la producción de AHLs es elevada, debería ser revisada. La ausencia de inhibición de la nodulación por acción de AHL cuando éstas son adicionadas a un suelo con alta densidad rizobiana (Tratamiento 3 vs Tratamiento 4) podría relacionarse con un fenómeno de saturación, llegando dicha inhibición a un nivel máximo cuando la densidad de la población establecida es como mínimo de 10^5 UFC/g suelo.

En términos generales, a medida que aumenta la densidad de la población rizobiana establecida en el suelo, disminuye el número de nódulos formados. Esta disminución también se observó cuando en ausencia de población establecida, se agregó al suelo el sobrenadante de un cultivo de alta densidad celular, que contiene AHLs (Tratamiento 5 vs tratamiento 6). Por lo tanto, el efecto inhibitorio de la nodulación, podría atribuirse a la acción de moléculas *quorum*.

Interacción soja-*B. elkanii*

En la Figura 6.24 se muestra que para *B. elkanii*, el aumento de la densidad celular de rizobios en el suelo no afecta el comportamiento simbiótico del inóculo (Tratamiento 1 vs Tratamiento 3). Sin embargo, la mayor cantidad de nódulos se obtuvo cuando en el suelo no existe una población rizobiana establecida (Tratamientos 1 y 3 vs Tratamiento 5), disminuyendo dicho valor cuando se adicionaron moléculas *quorum* (Tratamiento 5 vs Tratamiento 6).

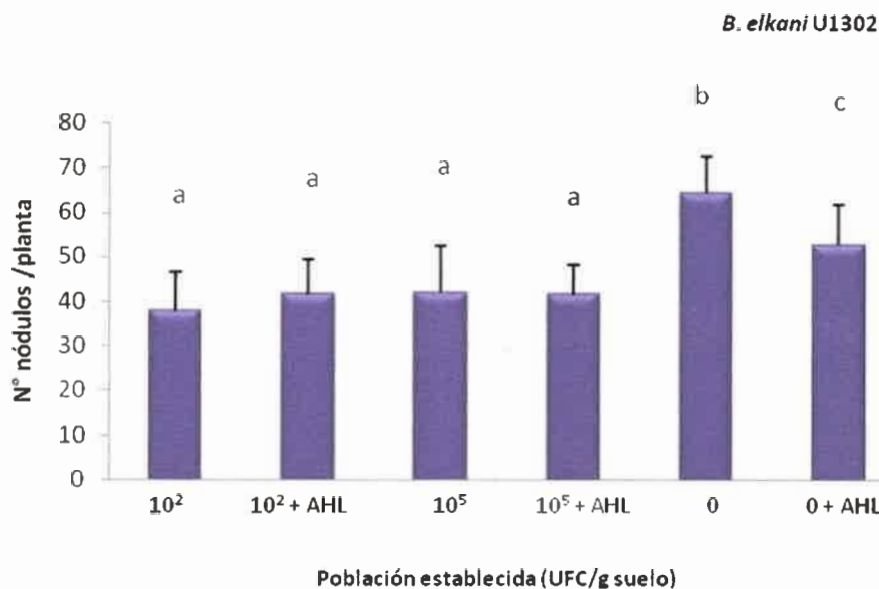


Figura 6.24 : Número de nódulos en plantas de soja inoculadas con *B. elkani* U1302 y con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$

Se puede considerar entonces que el efecto inhibitorio de la nodulación es más severo que el observado con *B. japonicum* (Figura 6.23), ya que se produce cuando la densidad de la población preestablecida es tan baja como 10^2 microorganismos/g de suelo (Tratamiento 1 vs Tratamiento 5). Aún cuando la densidad de los rizobios preestablecidos es baja (Tratamiento 1), su producción de AHLs resultó suficiente para alcanzar la máxima inhibición de la nodulación. Al igual que en *B. japonicum*, estos resultados permiten sugerir que las condiciones en las que se realiza la inoculación agrícola, deberían ser revisadas. Los resultados mostrados son coherentes con los ensayos informados de infectividad y efectividad en plantas (Figuras 6.5 y 6.8), en los que se encontró que los inoculantes formulados con altas densidades rizobianas resultan pobremente infectivos.

Interacción soja-*S. fredii*

En plantas de soja inoculadas con *S. fredii*, se determinó que la presencia de una alta densidad de rizobios en el suelo no afectó la capacidad de nodulación del inóculo (Figura 6.25, Tratamiento 1 vs Tratamiento 3). Sólo en ausencia de rizobios establecidos en el suelo,

la adición de moléculas *quorum*, incrementó la nodulación de los microorganismos (Figura 6.25, Tratamiento 5 vs Tratamiento 6).

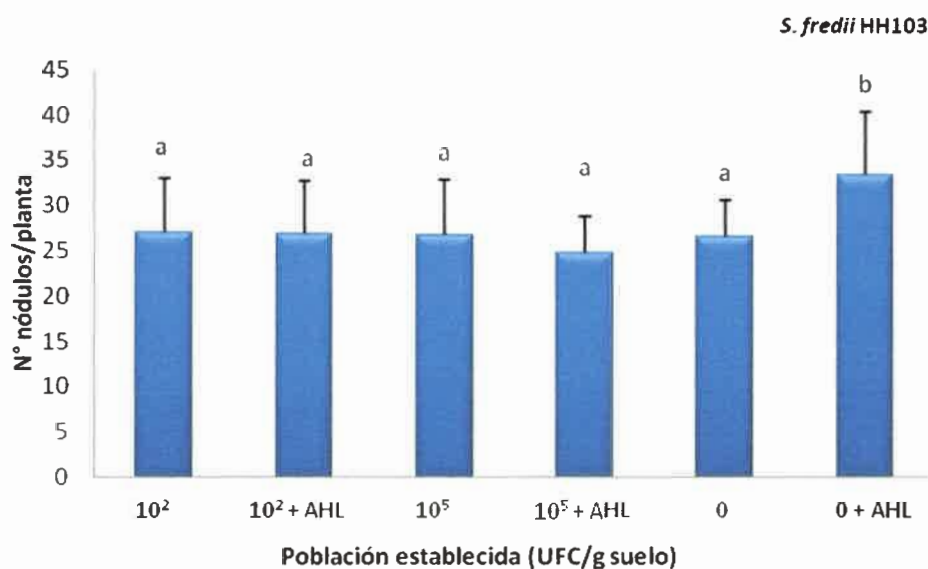


Figura 6.25 : Número de nódulos en plantas de soja inoculadas con *S. fredii* HH103 con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos $p < 0,05$. $n=10$

Estos resultados son coherentes con los obtenidos y previamente evaluados (Figura 6.12) que indican que la infectividad de inóculos de células en fase exponencial del crecimiento, se encuentra incrementada en presencia de AHLs.

Interacción alfalfa-*S. meliloti*

No se encontró diferencia en la nodulación entre los tratamientos realizados en plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* (Figura 6.26), lo que indicaría que para este microorganismo, la densidad celular de una población establecida (Tratamiento 1 vs. Tratamiento 3) o el agregado de moléculas *quorum* (Tratamiento 2 vs Tratamiento 3), no altera su capacidad de nodular. Estos resultados son compatibles con los obtenidos en los ensayos de infectividad y efectividad en plantas (Figuras 6.12 a 6.15) que indicaron que dichos parámetros no varían con la densidad celular y estado metabólico de los microorganismos inoculados.

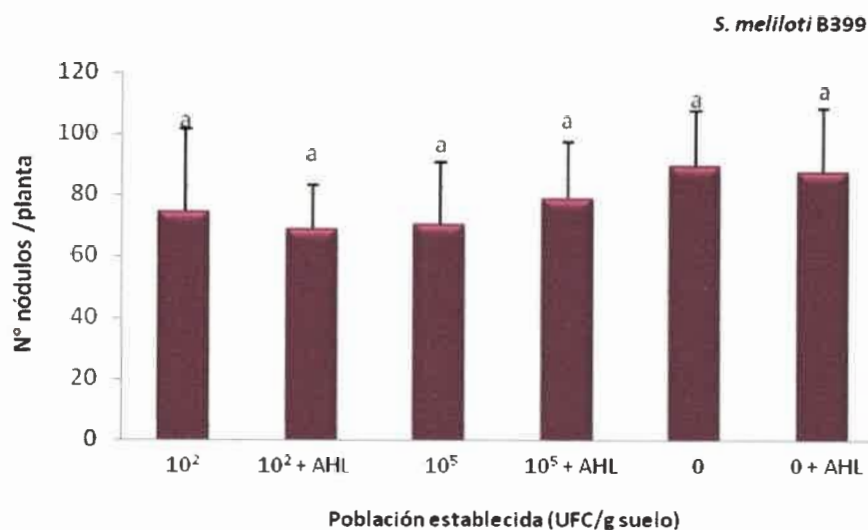


Figura 6.26: Número de nódulos en plantas de alfalfa inoculadas con *S. meliloti* B399 con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$

Interacción maní-*Bradyrhizobium sp.*

La infectividad de *Bradyrhizobium sp.* no se alteró por la presencia de rizobios en el suelo (Figura 6.27, Tratamiento 1 vs. Tratamientos 3). Sin embargo, la adición de AHL, tanto en presencia (Tratamiento 1 vs 2 y 3 vs 4) como en ausencia de rizobios (Tratamiento 5 vs. 6), estimuló la nodulación.

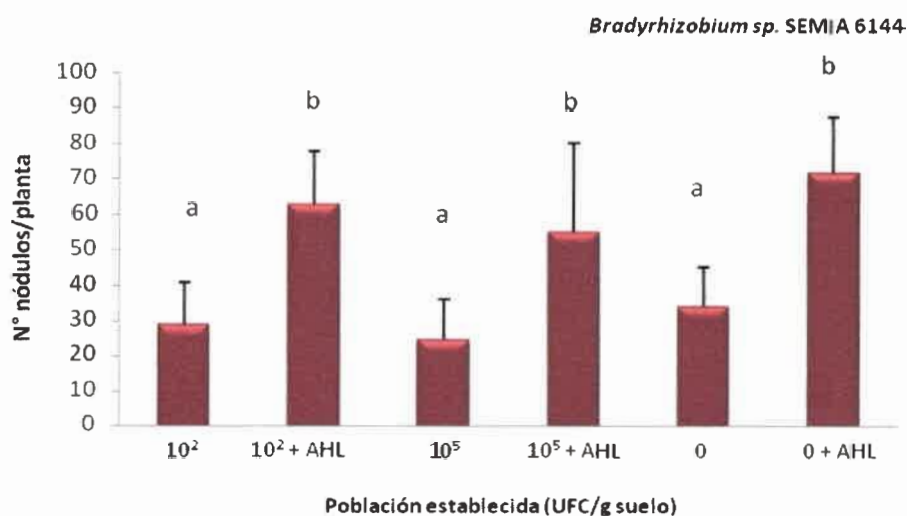


Figura 6.27 : Número de nódulos en plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144 con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$.

El hallazgo de que, independientemente de la población bacteriana preestablecida en el suelo, el agregado de moléculas *quorum* al inoculante provoca un aumento en el número de nódulos formados en maní, apoya las prácticas de inoculación con alto número de microorganismos (y, en consecuencia alta concentración de AHLs). Por otra parte, la información obtenida se correlaciona con los resultados de nodulación determinados para este par simbiote (Figura 6.17) que indican que este parámetro se incrementa cuando se inocula con cultivos de alta densidad celular, en fase estacionaria de crecimiento.

Interacción poroto-*R. tropici*

Los ensayos efectuados en plantas de poroto inoculadas con *R. tropici*, muestran que, al igual que lo observado para la interacción alfalfa-*S. melloti*, ni la densidad de la población rizobiana en el suelo, ni la presencia de AHLs afectan la capacidad de nodulación del microorganismo (Figura 6.28, Tratamiento 1 vs 3 y 2 vs Tratamiento 3).

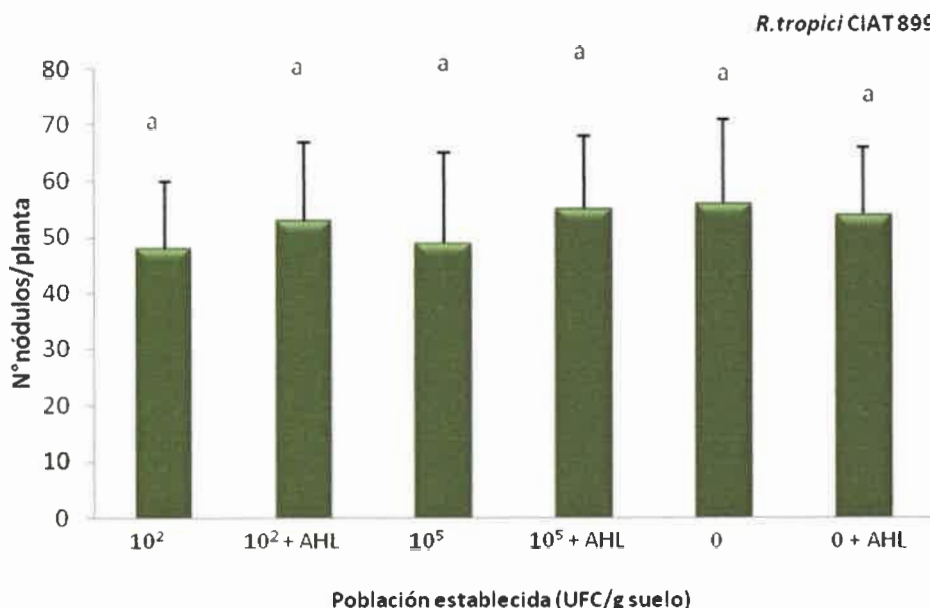


Figura 6.28 : Número de nódulos en plantas de poroto inoculadas con *R. tropici* CIAT 899 con diferentes poblaciones establecidas de rizobios en el suelo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos. ANOVA, $p < 0,05$; $n = 10$

En el Cuadro 6.1, se resumen los resultados de la evaluación del efecto de la población rizobiana presente en el suelo sobre la capacidad de nodulación de rizobios inoculados.

Cuadro 6.1: Efecto de población rizobiana establecida sobre nodulación

Microorganismo	Efecto de molécula <i>quorum</i> sobre nodulación	Efecto de población establecida sobre nodulación
<i>Sinorhizobium fredii</i>	no la afecta	no la afecta
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	no la afecta	no la afecta
<i>Rhizobium tropici</i>	no la afecta	no la afecta
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	inhibitorio	inhibitorio
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	inhibitorio	inhibitorio
<i>Bradyrhizobium sp</i>	potenciador	no la afecta

En términos generales, se observó que la capacidad de nodulación de rizobios de crecimiento lento, está relacionada con la presencia de autoinductores, tanto si provienen de una población establecida en el suelo como si se agregan como sobrenadante de un cultivo de alta densidad bacteriana. El efecto es diferente dependiendo del par simbiote en estudio. En *B. japonicum* y *B. elkanii*, (simbiontes de soja) la infectividad está disminuida en presencia de AHLs, mientras que en *Bradyrhizobium sp.*, (simbiote de maní) se encuentra aumentada. Por el contrario, la presencia de AHLs no influye sobre la infectividad en los microorganismos de crecimiento rápido, *S. meliloti*, *S. fredii* y *R. tropici*.

CAPITULO 7

Conclusiones y perspectivas futuras

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis permiten corroborar nuestra hipótesis sobre la influencia del *quorum sensing* en el comportamiento simbiótico de los rizobios. Los aspectos y el modo de regulación fue variable según el microorganismo que se considere.

- ✓ Todos los microorganismos estudiados producen AHLs de cadena corta y de cadena larga.
- ✓ La regulación de la expresión de los genes *nod* por QS varía con la especie y género rizobiano: en *S. meliloti* no está mediada por AHL, mientras que en *R. tropici* estas moléculas inducen su expresión; en *S. fredii*, la regulación por QS es dependiente del estado metabólico del microorganismo. En *B. japonicum* la expresión de genes de nodulación está regulada negativamente por AHLs homólogas así como por las heterólogas, siempre que éstas sean producidas por cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium*.
- ✓ Las AHLs regulan la producción de EPS en *S. meliloti* y en *Bradyrhizobium sp.*, mientras que en *B. japonicum*, *Bradyrhizobium sp.*, *R. tropici* y *B. elkanii* afectan el contenido de CPS. En cambio, la síntesis de LPS no está influenciada por la presencia de AHL en ninguno de los rizobios estudiados.
- ✓ Las condiciones ambientales inciden en la producción de AHLs en los microorganismos estudiados. La limitación de nitrógeno disminuye la producción de autoinductores en todos los casos, mientras que el contenido de AHLs se incrementa en presencia de hierro en *B. japonicum*, *S. fredii* y *S. meliloti*. Condiciones de acidez afectan la concentración de AHLs en *B. japonicum*, *B. elkanii* y *R. tropici*, en tanto que un aumento en la salinidad incide en la producción de AHLs de todos los rizobios estudiados excepto *R. tropici*.

- ✓ La elevada densidad celular del inóculo, y la producción de AHLs asociada a ello, incide en la capacidad de nodulación solamente en los rizobios de crecimiento lento (género *Bradyrhizobium*).
- ✓ La presencia de poblaciones establecidas en el suelo afecta la capacidad de nodulación de *B. japonicum*, *B. elkanii* y *Bradyrhizobium sp.* En las especies rizobianas de crecimiento rápido, en cambio, no se modifica la nodulación en presencia de rizobios en el suelo.

Los estudios realizados en este trabajo de tesis permitieron demostrar que el fenómeno de *quorum* está involucrado en la regulación de diferentes aspectos inherentes a la simbiosis de rizobios con las plantas hospedadoras.

La rizosfera es una zona densamente poblada con organismos del suelo, incluidos bacterias, levaduras, hongos, protozoos e insectos. La mayoría de los compuestos liberados alrededor de las raíces podrían actuar como mensajeros que comunican un amplio rango de organismos que viven en el suelo. La capacidad de microorganismos inoculados para sensar AHLs heterólogos y modificar los niveles de expresión de genes o su infectividad en presencia de poblaciones establecidas en el suelo, muestra que las AHLs de rizobios forman parte de una red de señalizaciones que permiten a estas bacterias sensar no sólo la presencia de individuos de su propia especie sino también de otros de diferentes especies. En un contexto ecológico, los hallazgos de esta tesis, abren la posibilidad de profundizar diferentes líneas de investigación.

- ✓ Desde el punto de vista básico es de interés dilucidar la estructura química y la variedad de AHLs que produce cada uno de los microorganismos estudiados. La disponibilidad de las especies químicas aisladas permitiría profundizar en el mecanismo regulatorio de los genes de nodulación mediado por AHLs.

- ✓ Desde el punto de vista aplicado, la evaluación en ensayo a campo de inoculantes de soja formulados con cultivos de *B. japonicum* y *B. elkanii* en baja densidad celular permitiría contar con información que promueva cambios en la tecnología de inoculación actualmente utilizada.

- ✓ Por otra parte, a pesar de que la práctica de inoculación en el cultivo de maní no está muy difundida, la evaluación de inoculantes conteniendo AHLs podría aportar datos para la optimización del comportamiento simbiótico de los preparados comerciales.

CAPITULO 8

Bibliografía

- Ahmer, BMM. Cell-to-cell signalling in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*, 52: 933–945, 2004.
- Albus U, Baier R, Holst O, Pühler A, Niehaus K. Suppression of an elicitor-induced oxidative burst reaction in *Medicago sativa* cell cultures by *Sinorhizobium meliloti* lipopolysaccharides. *New Phytol* 151: 597-606, 2001.
- An DD, Danhorn T, Fuqua C, Parsek MR. Quorum sensing and motility mediate interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Agrobacterium tumefaciens* in biofilm cocultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 3828–3833, 2006.
- Atkinson S y Williams P. *Quorum sensing* and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface* 6:959-78, 2009.
- Banfalvi Z, Nieuwkoop A, Schell M, Besl L, Stacey G. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol Gen Genetics* 214, 420–424, 1988.
- Becker A y Pühler A. Production of exopolysaccharides. En: Spaink HP, Kondorosi A, and Hooykaas PJJ (ed), *The Rhizobiaceae: Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. p: 97-118. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1998.
- Becker A, Fraysse N, Sharypova L. Recent advances in studies on structure and symbiosis-related function of rhizobial K-antigens and lipopolysaccharides. *MPMI* 18:899-905, 2005.
- Blandergroen MR y Spaink HP. Genes and signal molecules involved in the rhizobia-Leguminoseae symbiosis. *Curr Op Plant Biol*; 1:353-359, 1998.
- Bonfante P y Anca I. Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annu Rev Microbiol* 63: 363–38, 2009.
- Bradford MM. 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, 1976.
- Breedveld MW y Miller KJ. Cyclic beta-glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol Rev* 58:145-61, 1994.
- Broughton WJ y Perret X. Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Cur Op in Plant Biol*; 2:305-311, 1999.
- Brown CM y Dilworth, MJ. Ammonia assimilation by *Rhizobium* cultures and bacteroids. *J Gen Microbiol* 86:39-48, 1975.
- Cangelosi, GA, Martinetti G, Nester EW. Osmosensitivity phenotypes of *Agrobacterium tumefaciens* mutants that lack periplasmic beta-1,2-glucan. *J Bacteriol* 172: 2172-4, 1990.
- Cao H, Yang M, Zheng H, Zhang J, Zhong Z, Zhu J. Complex *quorum sensing* regulatory systems regulate bacterial growth and symbiotic nodulation in *Mesorhizobium tianshanense*. *Arch Microbiol* 191:283-9, 2009.
- Cardozo JD, Gomes DF, Goes KC, da Fonseca N, Dorigo OF, Hungria M, Andrade DS. Relationship between total nodulation and nodulation at the root crown of peanut, soybean and common bean plants. *Soil Biol Biochem* 41:1760-1763, 2009.

- Cha C, Gao P, Chen YC, Shaw PD, Farrand SK. Production of acyl-homoserine lactone *quorum sensing* signals by gram-negative plant-associated bacteria. *MPMI* 11:1119-1129, 1998.
- Cheng HP y Walker GC. Succinoglycan is required for initiation and elongation of infection threads during nodulation of alfalfa by *Rhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 180: 5183-91, 1998.
- Choma A, Urbanik-Sypniewska T, Russa R, Kutkowska J, Mayer H. Occurrence and taxonomic significance of oxo-fatty acids in lipopolysaccharides from members of *Mesorhizobium*. *Syst Appl Microbiol* 23: 185-90, 2000.
- Choudhary S y Schmidt-Dannert C. Applications of *quorum sensing* in biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1267-1279, 2010.
- Cooper, JE. Early interactions between legumes and rhizobia: disclosing complexity in a molecular dialogue. *J App Microbio* 103: 1355-1365, 2007.
- Cubo MT, Economou A, Murphy G, Johnston AW, Downie JA. Molecular characterization and regulation of the rhizosphere-expressed genes *rhi*-ABCR that can influence nodulation by *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J Bacteriol* 174:4026-4035, 1992.
- Daniels R, De Vos DE, Desair J, Raedschelders G, Luyten E, Rosemeyer V, Verreth C, Schoeters E, Vanderleyden J y Michiels J. The *cin* quorum sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J Bio Chem* 277:462-468, 2002.
- De Hoff PL., Brill LM, Hirsch AM. Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Mol Genet Genomics* 282: 1–15, 2009.
- Deakin WJ y Broughton WJ. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat Rev Microbiol* 7: 312–320, 2009.
- Decho AW, Norman RS, Visscher PT. Quorum sensing in natural environments: emerging views from microbial mats. *Trends Microbiol* 18:73-80, 2010.
- Decho AW, Visscher PT, Ferry J, Kawaguchi T, He L, Przekop KM, Norman RS, Reid RP. Autoinducers extracted from microbial-mats reveal a surprising diversity of N-acylhomoserine lactones (AHLs) and abundance changes that may relate to diel pH. *Environ Microbiol* 11:409-20, 2009.
- Diggle SP, Gardner A, West SA, Griffin AS. Evolutionary theory of bacterial quorum sensing: when is a signal not a signal? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 362:1241-1249, 2007a.
- Diggle SP, Griffin AS, Campbell GS, West SA. Cooperation and conflict in quorum-sensing bacterial populations. *Nature* 450:411-414, 2007b.
- Dische Z. General color reactions. En *Methods Carbohydr Chem* 1: 478-492, Academic Press, Inc., New York, 1962.
- Dixon R, y Kahn D. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nature Rev Microbiol* 2:621-631, 2004.
- Dockendorff TC, Sanjuan J, Grob P, Stacey G. NolA represses *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *MPMI* 7:596–602, 1994.

- Downie, JA. The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS Microbiol Rev* 34: 150-170, 2010.
- Drechsel H y Jung G. Peptide siderophores. *J Pept Sci* 4:147-181, 1998.
- Dylan T, Helinski DR, Ditta GS. Hypoosmotic adaptation in *Rhizobium meliloti* requires beta-(1-2)-glucan. *J Bacteriol* 172:1400-8, 1990.
- Fabra A, Castro S, Taurian T, Angelini J, Ibáñez F, Dardanelli M, Tonelli M, Bianucci E, Valetti L. Interaction among *Arachis hypogea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it know? *Crit Rev Microbiol* 1-16, 2010.
- Ferguson GP, Datta A, Carlson RW, Walker GC. Importance of unusually modified lipid A in *Sinorhizobium* stress resistance and legume symbiosis. *Mol Microbiol* 56: 68-80, 2005.
- Finan TM, Hirsch AM, Leigh JA, Johansen E, Kuldau GA, Deegan S, Walker GC, Signer ER. Symbiotic mutants of *Rhizobium meliloti* that uncouple plant from bacterial differentiation. *Cell* 40: 869-77, 1985.
- Forsberg LS, Bhat UR, Carlson RW. Structural characterization of the O-antigenic polysaccharide of the lipopolysaccharide from *Rhizobium etli* strain CE3. A unique O-acetylated glycan of discrete size, containing 3-O-methyl-6-deoxy-L-talose and 2,3,4-tri-O-methyl-l fucose. *J Biol Chem* 275:18851-63, 2000.
- Fraysse, N, Couderc F, Poinot V. Surface polysaccharide involvement in establishing the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Eur J Biochem* 270: 1365-80, 2003.
- Frederix M, Edwards A, McAnulla C , Downie A. Co-ordination of quorum-sensing regulation in *Rhizobium leguminosarum* by induction of an anti-repressor. *Mol Microbiol* 81:994–1007, 2011.
- Fujishige NA, Kapadia NN, DeHoff PL, Hirsch AM, Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol Ecol* 56:195–20, 2006.
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176: 269-275, 1994.
- Gage DJ y Margolin W. Hanging by a tread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr Op Microbiol*; 3:613-617, 2000.
- Gage DJ. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing Rhizobia during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev* 68: 280-300, 2004.
- Glenn SA, Gurich N, Feeney MA, Gonzalez JE. The ExpR/Sin quorum-sensing system controls succinoglycan production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 189, 7077-7088, 2007.
- González JE y Keshavan ND. Messing with bacterial quorum sensing. *Microbiol Mol Biol Rev* 70:859-875, 2006.
- González JE y Marketon M. Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 574-592, 2003.

- González JE, B. L. Reuhs BL, Walker GC. Low molecular weight EPS II of *Rhizobium meliloti* allows nodule invasion in *Medicago sativa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:8636-8641, 1996.
- Gottfert M, Hitz S, Hennecke H. Identification of *nodS* and *nodU*, two inducible genes inserted between the *Bradyrhizobium japonicum* *nodYABC* and *nodIJ* genes. *MPMI* 3: 308-316, 1990.
- Göttfert M, Holzhauser D, Bani D, Hennecke H. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *MPMI* 5: 257-265, 1992.
- Gresshoff P, Lohar D, Chan P, Biswas B, Jiang Q, Reid D, Ferguson B, Stacey G. Genetic analysis of ethylene regulation of legume nodulation. *Plant Signal Behav* 4: 818–823, 2009.
- Gurich N y González JE. Role of quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *J Bacteriol* 191: 4372-4382, 2009.
- Hirsch, AM. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr Op Plant Biol*; 2 :320-326, 1999.
- Hitchcock PJ y Brown TM. Morphological heterogeneity among *Salmonella* lipopolysaccharide chemotypes in silver-stained polyacrylamide gels. *J Bacteriol* 154:269-277, 1983.
- Hoang HH, Becker A, González, JE. The LuxR homolog ExpR, in combination with the Sin quorum sensing system, plays a central role in *Sinorhizobium meliloti* gene expression. *J Bacteriol* 186, 5460–5472, 2004.
- Horswill AR, Stoodley P, Stewart PS, Parsek MR. The effect of the chemical, biological, and physical environment on quorum sensing in structured microbial communities. *Anal Bioanal Chem* 2007, 387:371-380, 2007.
- Janczarek M. Environmental signals and regulatory pathways that influence exopolysaccharide production in rhizobia. *Int J Mol Sci* 12:7898-933, 2011.
- Jitacksorn S y Sadowsky MJ. Nodulation Gene Regulation and Quorum Sensing Control Density-Dependent Suppression and Restriction of Nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum*-Soybean Symbiosis. *Appl Environ Microbiol* 74: 3749–3756, 2008.
- Johnston AW, Yeoman KH, Wexler M. Metals and the rhizobial-legume symbiosis uptake, utilization and signalling. *Adv Microb Physiol* 45:113-256, 2001.
- Kanipes MI, Kalb SR, Cotter RJ, Hozbor DF, Lagares A, Raetz CR. Relaxed sugar donor selectivity of a *Sinorhizobium meliloti* ortholog of the *Rhizobium leguminosarum* mannosyl transferase LpcC. Role of the lipopolysaccharide core in symbiosis of *Rhizobiaceae* with plants. *J Biol Chem* 278:16365-16371, 2003.
- Kannenberg EL y Carlson RW. Lipid A and O-chain modifications cause *Rhizobium* lipopolysaccharides to become hydrophobic during bacteroid development. *Mol Microbiol* 39: 379-91, 2001.
- Kawaguchi M y Minamisawa K. Plant–Microbe Communications for Symbiosis. *Plant Cell Physiol* 51: 1377–1380, 2010.

- Keller L y Surette MG. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* 4:249-58, 2006.
- Kouchi H, Imaizumi-Anraku H, Hayashi M, Hakoyama T, Nakagawa T, Umehara Y, Suganuma N, Kawaguchi M. How many peas in a pod? Legume genes responsible for mutualistic symbioses underground. *Plant Cell Physiol* 51:1381-97, 2010.
- Koutsoudis MD, Tsaltas D, Minogue TD, von Bodman S. Quorum-sensing regulation governs bacterial adhesion, biofilm development, and host colonization in *Pantoea stewartii* subspecies *stewartii*. *Proc Natl Acad Sci* 103:5983–5988, 2006.
- Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
- Landini P, Antoniani D, Burgess JG, Nijland R. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:813-23, 2010.
- Lazazzera BA. Quorum sensing and starvation: signals for entry into stationary phase. *Curr Opin Microbiol* 3:177-82, 2000.
- Leigh JA, Signer ER, Walker GC. Exopolysaccharide-deficient mutants of *Rhizobium meliloti* that form ineffective nodules. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6231-5, 1985.
- Lepek, VC y D'Antuono A. Bacterial surface polysaccharides and their role in the rhizobia-legume association. *Lotus Newsletter* 35: 93-105, 2005.
- Lerouge I y Vanderleyden J. O-antigen structural variation: mechanisms and possible roles in animal/plant–microbe interactions. *FEMS Microbiol Rev*, 26: 17–47, 2002.
- Lithgow J K, Wilkinson A, Hardman A, Rodelas B, Wisniewski-Dye F, Williams P, Downie JA. The regulatory locus *cinRI* in *Rhizobium leguminosarum* controls a network of quorum-sensing loci. *Mol Microbiol* 37:81-97, 2000.
- Loh J y Stacey G. Nodulation Gene Regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Appl Environ Microbiol* 69:10-17, 2003.
- Loh J, Carlson RW, York WS, Stacey G. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:14446-14451, 2002a.
- Loh J, Lohar DP, Andersen B, Stacey G. A two-component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *J Bacteriol* 184:1759-1766, 2002b.
- Loh JT, Yuen-Tsai JP, Stacey MG, Lohar D, Welborn A, Stacey G. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Mol Microbiol* 42:37-46, 2001.
- Madinabeitia N, Bellogín RA, Buendía-Clavería AM, Camacho M, Cubo T, Espuny MR, Gil-Serrano AM, Lyra MC, Moussaid A, Ollero FJ, Soria-Díaz ME, Vinardell JM, Zeng J, Ruiz-Sainz JE. *Sinorhizobium fredii* HH103 has a truncated *noI*O gene due to a -1 frameshift mutation that is conserved among other geographically distant *S. fredii* strains. *MPMI* 15: 150-159, 2002.

- Marketon M M, González J E. Identification of two quorum-sensing systems in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 184:3466-3475, 2002a.
- Marketon MM, Glenn SA, Eberhard A, González JE. Quorum Sensing control exopolysaccharide Production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 185: 325-331, 2003.
- Marketon, MM, Gronquist MR, Eberhard A, González JE. Characterization of the *Sinorhizobium meliloti sinR/sinI* locus and the production of novel N-acyl homoserine lactones. *J Bacteriol* 184:5686-5695, 2002b.
- Martinez-Romero E, Segovia L, Mercante FM, Franco AA, Graham P, Pardo MA. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* trees. *Int J Syst Bacteriol* 41:417-426, 1991.
- Mathis R, Van Gijsegem F, De Rycke R, D’Haeze W, Van Maelsaeke E, Antonio E, Holster M, y Vereecke D. Lipopolysaccharides as a communication signal for progression of legume endosymbiosis. *Proc Nat Acad Sci* 102:2655-2600, 2005.
- McLean RJ, Whiteley M, Stickler DJ, Fuqua WC. Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. *FEMS Microbiol Lett* 154: 259–263, 1997.
- Miller JH. A short course in bacterial genetics. A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1972.
- Morgante C, Castro S, Fabra A. Role of rhizobial EPS in the evasion of peanut defense response during the crack-entry infection process. *Soil Biol Biochem*, 39: 1222–1225, 2007.
- Morgante C, Castro S, Fabra A. Role of rhizobial exopolysaccharides in crack entry/intercellular infection of peanut. *Soil Biol Biochem*, 37:1436–1444, 2005.
- Mulligan JT y Long SR. Induction of *Rhizobium meliloti* nodC expression by plant exudates requires nodD. *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 6609-6613, 1985.
- Musiyiwa K, Mpeperekwi S, Giller KE, Musiyiwa K. Symbiotic effectiveness and host ranges of indigenous rhizobia nodulating promiscuous soybean varieties in Zimbabwean soils. *Soil Biol Biochem* 37:1169-1176, 2005.
- Niehaus K, Baier R, Kohring B, Flashl E, Pühler A. Symbiotic suppression of the *Medicago sativa* plant defense system by *Rhizobium meliloti* oligosaccharides *Rhizobium meliloti* oligosaccharides. In: Legoki A, Bothe H, Pühler A (eds) *Biological fixation of nitrogen for ecology and sustainable agriculture*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 110–114, 1997.
- Noel KD, Box JM, Bonne VJ. 2-O-methylation of fucosyl residues of a rhizobial lipopolysaccharide is increased in response to host exudate and is eliminated in a symbiotically defective mutant. *Appl Environ Microbiol* 70:1537-1544, 2004.
- Noel KD, Forsberg LS, Carlson R W. Varying the abundance of O antigen in *Rhizobium etli* and its effect on symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol*. 182:5317-5324, 2000.

- Okazaki S, Nukui N, Sugawara M, Minamisawa K. Rhizobial strategies to enhance symbiotic interactions: rhizobitoxine and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase. *Microbes Environ* 19:99-111, 2004.
- Omura S, Murata M, Imamura N, Iwai Y, Tanaka H, Furusaki A, Matsumoto H. Oxetin, a new antimetabolite from an actinomycete. Fermentation, isolation, structure and biological activity. *J Antibiot* 37: 1324-1332, 1984.
- Pacheco AR y Sperandio V. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr Opin Microbiol* 12:192-8., 2009.
- Pellock BJ, Cheng HP, Walker GC. Alfalfa root nodule invasion efficiency is dependent on *Sinorhizobium meliloti* polysaccharides. *J Bacteriol* 182: 4310-8, 2000.
- Pellock BJ, Teplitski M, Boinay RP, Bauer WD, Walker GC. A LuxR homolog controls production of symbiotically active extracellular polysaccharide II by *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 184: 5067-5076, 2002.
- Peoples MB, Ladha JK and Herridge DF. Biological nitrogen fixation: an efficient source of nitrogen for sustainable agricultural production. *Plant Soil*; 174:3-28, 1995.
- Pérez-Montaña F, Guasch-Vidal B, González-Barroso S, López-Baena FJ, Cubo T, Ollero FJ, Gil-Serrano AM, Rodríguez-Carvajal MÁ, Bellogín RA, Espuny MR. Nodulation-gene-inducing flavonoids increase overall production of autoinducers and expression of N-acyl homoserine lactone synthesis genes in rhizobia. *Res Microbiol* 162:715-23, 2011.
- Pongsilp N, Triplett EW, Sadowsky MJ. Detection of homoserine lactone-like quorum sensing molecules in *Bradyrhizobium* strains. *Curr Microbiol* 51: 250-254, 2005.
- Postgate, JR. The fundamentals of nitrogen fixation. *Cambridge University Press*, Cambridge, United Kingdom, 1982.
- Racca, R. W. Fijación Biológica del Nitrógeno. *X Congreso Nacional de AAPRESID* 1:197-208, 2002.
- Reuber TL, Urzainqui A, Glazebrook J, Reed JW, Walker GC. *Rhizobium meliloti* exopolysaccharides. Structures, genetic analyses, and symbiotic roles. *Ann N Y Acad Sci* 646: 61:68, 1991.
- Reuhs BL, Williams MN, Kim JS, Carlson RW, Côté F. Suppression of the Fix- phenotype of *Rhizobium meliloti* *exoB* mutants by *IpsZ* is correlated to a modified expression of the K polysaccharide. *J Bacteriol* 177: 4289-96, 1995.
- Reuhs, BL, Carlson RW, Kim JS. *Rhizobium fredii* and *Rhizobium meliloti* produce 3-deoxy-D-manno-2-octulosonic acid-containing polysaccharides that are structurally analogous to group II K antigens (capsular polysaccharides) found in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 3570-80, 1993.
- Rodelas, B, Lithgow JK, Wisniewski-Dye F, Hardman A, Wilkinson A, Economou A, Williams P, Downie J A. Analysis of quorum-sensing-dependent control of rhizosphere-expressed (*rhi*) genes in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *J Bacteriol* 181:3816-3823, 1999.

- Rosemeyer, V, Michiels J, Verreth C, Vanderleyden J. *luxI*- and *luxR*-homologous genes of *Rhizobium etli* CNPAF512 contribute to synthesis of autoinducer molecules and nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *J Bacteriol* 180:815-821, 1998.
- Ryan RP y Down JM. Diffusible signals and interspecies communication in bacteria. *Microbiology* 154:1845-58, 2008.
- Sadowsky MJ, Cregan PB, Gottfert M, Sharma A, Gerhold D, Rodriguez-Quinones F, Keyser HH, Hennecke H, Stacey G. The *Bradyrhizobium japonicum nol A* gene and its involvement in the genotype-specific nodulatin of soybeans. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:637-641, 1991.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual, 2nd Edition. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 1989.
- Sánchez-Contreras M, Bauer WD, Gao M, Robinson JB, Downie A. Quorum sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Phil Trans R Soc B*. 363, 1149-1163, 2007.
- Sanjuan J, Grob P, Göttfert M, Hennecke H, Stacey G. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *MPMI* 7:364–369, 1994.
- Sawada H, Kuykendall LD, y Young JM. Changing concepts in the sistematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J Gen Appl Microbiol*. 49:155-79, 2003.
- Sessitsch A, Howieson JG, Perret X, Antoun H, Martinez-Romero E. Advances in *Rhizobium* research. *Crit Rev Plant Sci* 21, 4:323-378, 2002.
- Sharypova LA, Niehaus K, Scheidle H, Holst O, Becker A. *Sinorhizobium meliloti* acpXL mutant lacks the C28 hydroxylated fatty acid moiety of lipid A and does not express a slow migrating form of lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 278: 12946-54, 2003.
- Shiner EK, Reddy S, Timmons C, Li G, Williams SC. Deciphering the language of acyl homoserine lactones. *FEMS Microbiol Rev* 29: 935–947, 2005.
- Simon R, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: Transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. *Biotechnology* 1: 784-791, 1983.
- Skorupska A, Derylo M, Iorkiewicz Z. Role of noncarbohydrate substitutions of *Rhizobium* exopolysaccharide in nodulation process. *Arch Microbiol* 143: 307-310, 1985.
- Skorupska A, Janczarek M, Marczak M, Mazur A, Król J. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiosis functions. *Microb Cell Fact* 5:7, 2006.
- Somasegaran P y Hoben HJ. Handbook for *Rhizobia*. Methods in Legume-*Rhizobium* Technology. Bacterial Growth Media and Plant Nutrient Solutions. *Springer - Verlag*, New York, 1994.
- Spaink HP, Okker RJH, Wuffelman CA, Lugtenberg BJJ. Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* *Sym* plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* 9: 27-39, 1987.
- Spaink, HP. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Ann Rev Microbiol* 54:257-288, 2000.

- Stacey G, Sanjuan J, Luka S, Dockendorff T, Carlson RW. Signal exchange in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. *Soil Biol Biochem* 27, 4/5: 473-483, 1995.
- Stougaard, J. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol* 124:531-40, 2000.
- Straight PD y Kolter R. Interspecies chemical communication in bacterial development. *Annu Rev Microbiol* 63:99–118, 2009.
- Teplitski M, Eberhard A, Gronquist MR, Gao M, Robinson JB, Bauer WD. Chemical identification of N-acyl homoserine lactone *quorum sensing* signals produced by *Sinorhizobium meliloti* strains in defined medium. *Arch Microbiol* 180:494-497, 2003.
- Thorne SH y Williams HD. Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*: identification of the role of an N-acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival. *J Bacteriol* 181:981-990, 1999.
- Tsai C y Frash C. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrilamide gels. *Anal Biochem* 119: 115-119, 1982.
- Tun-Garrido C, Bustos P, Gonzalez V, Brom S. Conjugative transfer of p42a from *Rhizobium etli* CFN42, which is required for mobilization of the symbiotic plasmid, is regulated by *quorum sensing*. *J Bacteriol* 185:1681-1692, 2003.
- Uzureau S, Godefroid M, Deschamps Ch, Lemaire J, De Bolle X, Letesson JJ. Mutations of the Quorum Sensing-Dependent Regulator VjbR Lead to Drastic Surface Modifications in *Brucella melitensis*. *J Bacteriol* 189: 6035–6047, 2007.
- van Workum WA, van Slageren S, Brussel AA, Kijne JW. Role of Exopolysaccharides of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* as Host Plant-Specific Molecules Required for Infection Thread Formation During Nodulation of *Vicia sativa*. *MPMI* 11: 1233-1241, 1998.
- Versalovic J, Schneider M, de Bruijn FJ, Lupski JR. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Meth Mol Cell Biol* 5:25-40, 1994.
- Vincent JM. A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook n°15. *Blackwell Scientific Publications, Oxford*, 1970.
- Visick KL y McFall-Ngai MJ. An exclusive contract: specificity in the *Vibrio fischeri*-*Euprymna scolopes* partnership. *J Bacteriol* 182:1779-1787, 2000.
- Vriezen JA, de Bruijn FJ, Nüsslein, K. Responses of rhizobia to desiccation in relation to osmotic stress, oxygen and temperatura. *Appl Environ Microbiol* 73: 3451-3459, 2007.
- Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial Extracellular Polysaccharides Involved in Biofilm Formation. *Molecules* 14:2535-2554, 2009.
- Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513, 1991.
- Wang LX, Wang Y, Pellock B, Walker GC. Structural characterization of the symbiotically important low-molecular-weight succinoglycan of *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* 181: 6788-96, 1999.

- Werner D, Wilcockson J, Zimmermann E. Adsorption and selection of rhizobia by ion exchange papers. *Arch Microbiol* 105:27-32, 1975.
- Wilkinson A, Danino V, Wisniewski-Dye F, Lithgow JK y Downie J A. N-Acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two *quorum-sensing* genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* 184:4510-4519, 2002.
- Wisniewski-Dye F y Downie JA. Quorum sensing in Rhizobium. *Antoine Van Leeuwenhoek* 81:397-407, 2002.
- Yang H, Matewish M, Loubens I, Storey DG, Lam JS, Jin S. *migA*, a quorum-responsive gene of *Pseudomonas aeruginosa*, is highly expressed in the fibrosis lung environment and modifies low molecular-mass lipopolysaccharide. *Microbiology* 146: 2509-2519, 2000.
- Yang M, Sun K, Zhou L, Yang R, Zhong Z, Zhu J. Functional analysis of three AHL autoinducer synthase genes in *Mesorhizobium loti* reveals the important role of quorum sensing in symbiotic nodulation. *Can J Microbiol* 55:210-4, 2009.
- Zhang LH y Dong YH. *Quorum sensing* and signal interference: diverse implications. *Mol Microbiol* 53:1563-1571, 2004.



UNRCL
Biblioteca Central



71209

71209