

*“La felicidad no llega cuando conseguimos lo que deseamos, sino cuando sabemos disfrutar de lo que tenemos”*

*Dedicado a mi familia.*

**TRABAJO FINAL DE MICROBIOLOGIA**

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta-Microorganismo, Departamento de Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

**DIRECTOR:**

Dr. Cassán Fabricio Darío

**CO-DIRECTORA:**

Mic. Torres Daniela Soledad

**MIEMBROS DEL TRIBUNAL EVALUADOR:**

Dr. Cassán Fabricio Darío

Dra. Talano Melina

Dra. Viglioco Ana

**AGRADECIMIENTOS**

A mi Papá y a mi Mamá, Ricardo y Claudia que me acompañaron en cada aprendizaje de la vida. Gracias a ellos por la educación y el amor que me brindaron día a día y el apoyo incondicional para nunca bajar los brazos y ser una mejor persona. Valoro y agradezco cada sacrificio que hicieron por mí para cumplir con mis metas. Sin ellos no lo hubiera logrado es por eso que estoy agradecida por tenerlos en mi vida. Los amo infinitamente.

Mis hermanos Marianela, Agustín y la pequeña Martina por su amor incondicional todos los días, por su paciencia y confianza en mí que me dieron las fuerzas para culminar con esta etapa.

A mis abuelos, tíos y amigos que formaron parte de mi aprendizaje y me acompañaron en cada momento.

A Leonardo por ser mi compañero y gran amor y darme las fuerzas para luchar y seguir adelante en esta etapa. Por creer y confiar en mí y hacerme mejor persona. Gracias por entrar en mi vida.

A mi director de tesis Fabricio Cassan por permitirme participar en su equipo y brindarme las herramientas para cumplir con mis objetivos, gracias por sus grandes enseñanzas, dedicación y confiar en mí.

A mi co-directora Daniela que me acompañó y me brindó su tiempo, dedicación, cariño y responsabilidad para que pudiera aprender y cumplir con cada objetivo en esta maravillosa etapa y ser mejor persona. Aprendí grandes cosas junto a ella.

A mis jurados por su dedicación y aprendizaje y a mis compañeros de laboratorio por su cariño y humildad en esta etapa. Disfrute cada momento junto a ustedes.

A mis grandes amigas de universidad que formaron parte de esta maravillosa y hermosa etapa de mi vida, agradezco haberlas conocido y formar parte de mi vida, gracias por cada momento de enseñanza, compañerismo, complicidad, locura y alegría. Grandes momentos compartidos que me llenan el alma y por siempre quedaran. Las quiero muchísimo.

**ABREVIATURAS**

**AG<sub>3</sub>**: Ácido giberélico

**AIA**: Ácido indol-3-acético

**BLAST**: Herramienta básica de búsqueda de alineaciones (del inglés Basic local alignment search tool)

**C**: Carbono

**Cl<sub>2</sub>Fe<sub>3</sub>**: Cloruro férrico

**DO**: Densidad óptica

**ECN**: Extracto crudo de nabo

**EPS**: Exopolisacáridos

**FBN**: Fijación Biológica de Nitrógeno

**GAs**: Giberelinas

**gr**: Gramo

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>**: Peróxido de hidrogeno

**H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>**: Ácido sulfúrico

**HPLC**: Cromatografía Líquida de Alta Performance

**HRP**: Peroxidasa de rábano picante

**IAM**: Indol acetamida

**IAN**: Indol-3-acetonitrilo

**IPyA**: Indol-3-piruvato

**M**: Molar

**MgSO<sub>4</sub>**: Sulfato de magnesio

**ml**: Mililitro

**mM**: Milimolar

**MS**: Espectrometría de masas

**N**: Nitrógeno

**NCBI**: Centro nacional de información biotecnología (del inglés National Center for Biotechnology Information)

**nm**: Nanómetro

**PCR**: Reacción en cadena de la polimerasa

**PGPB**: Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal por Control Biológico o Biocontrol (del inglés, Plant Growth Promoting Biocontrol)

**PGPR:** Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria)

**RAST:** Anotación rápida usando tecnología de subsistema (del inglés, Rapid Annotation using Subsystem Technology)

**Rpm:** Revoluciones por minuto

**SD:** Desviación estándar

**SO<sub>4</sub>Mn:** Sulfato de manganeso

**TSA:** Tripteína de soya

**U:** Unidades de enzima

**Z:** Zeatina

**µg.ml<sup>-1</sup>:** Microgramo/mililitro

**µl:** Microlitro

**µm:** Micrómetro

## RESUMEN

La rizósfera es la región del suelo en la cual la actividad microbiológica está influenciada por las raíces de diversas especies vegetales. Las bacterias de la rizósfera denominadas rizobacterias, poseen la capacidad de colonizar el interior o exterior de las raíces estableciendo una relación simbiótica o de vida libre con especies de leguminosas y no leguminosas. Varios géneros bacterianos tienen la potencialidad de promover el crecimiento vegetal por mecanismos como la fijación biológica de nitrógeno, la solubilización de minerales, producción de sideróforos y elaboración de sustancias reguladoras de crecimiento de las plantas. *Bradyrhizobium japonicum* E109, la cepa más utilizada en la formulación de inoculantes para soja en Argentina, posee la capacidad de producir compuestos reguladores del crecimiento vegetal, tales como auxinas, citocininas y giberelinas. La regulación de los niveles óptimos de tales hormonas tanto en la bacteria como en la planta se define como homeostasis y es llevada a cabo por mecanismos tales como la biosíntesis y el catabolismo. Evidencia preliminar de nuestro grupo sugiere que el catabolismo de auxinas y particularmente del ácido indol-3-acético (AIA) en E109 es llevado a cabo por una molécula de origen protéico y carácter enzimático con capacidad de oxidar en forma irreversible la hormona. En este trabajo se evaluó el comportamiento de sobrenadantes de E109 en su capacidad de catabolizar el AIA y dilucidar el agente responsable de dicha degradación. Para ello, en sobrenadantes puros de E109 previamente con la adición exógena de AIA se evaluó la concentración de AIA, en función del tiempo, luego de ser sometidos a tratamientos físicos desnaturizantes como el calor, o la adición exógena de enzimas del tipo peroxidasa o peróxido de hidrogeno, para evaluar el catabolismo de la hormona en tales condiciones. Adicionalmente, este comportamiento se evaluó en variantes genotípicas de E109 deficientes en genes que podrían participar potencialmente de la degradación de la hormona. Los resultados obtenidos demuestran que luego de las 6 horas de adicionar el AIA, la concentración de la misma disminuye en un 50% y luego de 24 h no se detecta trazas de la hormona. Cuando se somete el sobrenadante de E109 a desnaturización por calor, y se adiciona posteriormente AIA, la degradación no es llevada a cabo. Se cree que el o los compuestos responsables del mecanismo catabólico son liberados al medio de manera constitutiva, previo a la adición de la hormona, que se acumulan en el medio en la fase estacionaria de crecimiento y tienen un comportamiento de saturación del tipo enzimático. A partir de estas observaciones se podría considerar el catabolismo de AIA como un mecanismo para mantener la homeostasis bacteriana en presencia de la hormona y como parte del metabolismo de esta hormona en rizobacterias.

## Summary

The rhizosphere soil is the region in which the microbiological activity is influenced by the roots of various plant species. The rhizosphere bacteria denominated as rhizobacterias, have the ability to colonize the inside or outside of the roots establishing a symbiotic relationship with free-living species of legumes and non-legumes. Several bacterial genera have the potentiality to promote plant growth by mechanisms like biological nitrogen fixation, solubilization of minerals, siderophore production and production of growth regulating compounds of the plant. *Bradyrhizobium japonicum* E109, the strain most commonly used in the formulation of inoculants for soybean in Argentina has the ability to produce growth regulating compounds, such as auxins, cytokinins and gibberellins growth. The regulation of the optimum levels of such hormones in bacteria as in plants is defined as homeostasis and is carried out by mechanisms such as biosynthesis and catabolism. Preliminary evidence suggests from our group suggest that auxin catabolism and particularly indole-3-acetic acid (IAA) in E109 is performed by molecule as a protein and enzymatic character capable of oxidizing irreversibly the hormone. In this work the behavior of E109 supernatants in their ability to catabolize the IAA and elucidate the responsible agent of such degradation was evaluated. For this, in E109 supernatants previously with the exogenous addition of IAA was evaluated the concentration of IAA, in function of time, after being subjected to physical denaturants treatments such as heat, or exogenous addition of peroxidase enzyme or peroxide hydrogen to evaluate the catabolism of the hormone in such conditions. Additionally, this behavior was evaluated in genotypic variants of E109 deficient in genes that could potentially participate in the degradation of the hormone. The results show that after 6 hours of adding the IAA, the concentration thereof decreases by 50% and after of 24 hours no traces of the hormone are detected. When the E109 supernatant is subjected to heat denaturalization and then added IAA, the degradation is not performed. We believe that the compound or compounds responsible for catabolic mechanism are released into the culture medium constitutively, prior to addition of the hormone, which accumulate in the medium in the stationary phase of growth and have behavior saturation as the enzymes. From these observations it could be considered the catabolism of IAA as a mechanism to maintain bacterial homeostasis in the presence of hormone and as part of metabolism of this hormone in rhizobacterias.

**INDICE**

1. INTRODUCCION .....	11
1.1. Marco Teórico .....	11
1.2. Bacterias del Orden Rhizobiales.....	12
1.2.1. La Familia Bradyrhizobiaceae.....	12
1.2.2. El Género <i>Bradyrhizobium</i> .....	13
1.3. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E109 como modelo de estudio .....	14
1.4. Importancia de la interacción simbiótica Soja- <i>Bradyrhizobium</i> .....	15
1.4.1. Mecanismo de promoción del crecimiento vegetal por <i>B. japonicum</i> E109 .....	16
1.5. Auxinas .....	16
1.5.1. Auxinas en <i>B. japonicum</i> .....	16
1.5.2. Metabolismo de Auxinas.....	17
1.5.2.1. Biosíntesis de AIA en <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	17
1.5.2.2. Catabolismo de AIA en bacterias .....	19
1.5.2.3. Catabolismo de AIA en <i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	20
1.6. Peroxidasas en la degradación de AIA .....	22
2. HIPOTESIS.....	24
2.1. Hipótesis general.....	24
3. OBJETIVOS .....	25
3.1. Objetivos Generales .....	25
3.2. Objetivos específicos.....	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1. Material Biológico. ....	26
4.2. Metodología general para la cuantificación de AIA por espectrofotometría. ....	26
4.3. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109.....	26
4.4. Evaluación de actividad catabólica del AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 desnaturalizados mediante calor. ....	27
4.5. Detección de la actividad peroxidasa en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109.....	27



4.6. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 modificados con la adición exógena de peroxidasa de rábano picante (HRP). .....	28
4.7. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 modificados con la adición exógena de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . .....	28
4.8. Construcción de una mutante $\Delta per$ de <i>B. japonicum</i> E109 (-per).....	29
4.9. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 y E109 -per12.....	30
4.11. Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 y E109 -per12. ....	30
4.12. Evaluación del catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109, con doble inducción de AIA. ....	31
4.13. Efecto del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 en diferentes fases de crecimiento. ....	32
4.14. Búsqueda bioinformática de alineaciones en el genoma de <i>B. japonicum</i> E109 de secuencias codificantes implicados en el catabolismo de AIA.....	32
4.15. Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en cultivo de <i>B. japonicum</i> E109. ....	33
4.16. Evaluación del catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> cepa E109, 110 sp4 y 8620.....	33
4.17. Análisis Estadístico .....	34
5. RESULTADOS .....	35
5.1 Evaluación del catabolismo en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109. ....	35
5.2. Evaluación de actividad catabólica del AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 desnaturalizados mediante calor.....	35
5.3. Detección de actividad peroxidasa en sobrenadantes de E109. ....	37
5.4. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 modificados con la adición exógena de peroxidasa de rábano picante (HRP). .....	38
5.5. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 modificados con la adición exógena de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . ....	40
5.6. Construcción de una mutante $\Delta per$ de <i>B. japonicum</i> E109.....	41
5.7. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109-per12. ....	42
5.9. Evaluación del catabolismo de AIA empleando células puras de <i>B. japonicum</i> E109 y E109-per.....	43
5.10. Evaluación del catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109, con doble inducción de AIA. ....	44

5.11. Efecto del catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109 en fases de crecimiento.....	45
5.12. Búsqueda bioinformática en el genoma de <i>B. japonicum</i> E109 de secuencias codificantes implicados en el catabolismo de AIA .....	48
5.13. Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en cultivo de <i>B. japonicum</i> E109. ....	50
5.14. Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109, 110 sp4 y 8620. .	50
6. DISCUSIÓN.....	52
7. CONCLUSIÓN .....	55
8. BIBLIOGRAFÍA.....	56
9. ANEXO .....	65

## 1. INTRODUCCION

### 1.1. Marco Teórico

El suelo es el soporte natural en el que proliferan comúnmente un gran número de microorganismos. Se utiliza el término rizósfera para describir la parte del suelo en la que se induce la proliferación de microorganismos por la presencia del sistema radical de las plantas (Gárate and Bonilla, 2008). Las bacterias de la rizósfera denominadas rizobacterias, tienen la capacidad de colonizar el interior o exterior de las raíces de muchas especies vegetales y se pueden dividir entre las que generan una relación simbiótica con la planta y las que no lo hacen, denominadas de *vida libre*, que se ubican cerca, sobre las raíces o dentro de ellas como endofíticas (Kloepper et al. 1989). Las rizobacterias simbióticas pertenecientes a ciertos géneros incluidos en el Orden *Rhizobiales*, tales como *Rhizobium*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium*; *Azorhizobium* y *Bradyrhizobium* han sido extensamente estudiadas desde la perspectiva de su asociación con leguminosas y en términos de la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, nueva evidencia sugiere que gran parte de los miembros de este género tendrían potencialidad para promover el crecimiento vegetal por mecanismos distintos a la fijación biológica de nitrógeno, tales como biocontrolar ciertos microorganismos deletéreos para las plantas o regular el desarrollo vegetal en condiciones de estrés, tanto en leguminosas como en no-leguminosas (Biswas et al. 2000). Así, estas bacterias o las de *vida libre* se consideran benéficas para el crecimiento de las plantas y se las denomina en general como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper et al. 1979). Entre las asociaciones más exitosas de la naturaleza se destacan las de leguminosas con bacterias simbiotas fijadoras de nitrógeno, comúnmente denominadas rizobios y la asociación benéfica entre gramíneas y ciertas cepas PGPR de *vida libre* pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, capaces de colonizar la rizósfera de dichas plantas o sus tejidos de manera endofítica. Dobereiner y Pedrosa (1987) introdujeron un nuevo concepto que divide este grupo entre las PGPR, que promueven el crecimiento mediante mecanismos directos y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal por control biológico o biocontrol-PGPB (del inglés, Plant Growth Promoting Biocontrol) que promueven el crecimiento de las plantas por mecanismos indirectos mediados por la inhibición del desarrollo o actividad de fitopatógenos. La promoción directa del crecimiento se produce cuando una PGPR proporciona moléculas con actividad biológica que directamente afectan al metabolismo de la planta o cuando se facilita la adquisición de nutrientes no disponibles en el suelo para las plantas. En las PGPR los mecanismos directos más importantes que han sido propuestos, además de la fijación biológica del nitrógeno son: la actividad nitrato reductasa, la solubilización de fosfatos, la

producción de sideróforos y la biosíntesis de fitohormonas y otros compuestos reguladores del crecimiento vegetal, tal como el ácido indol-3-acético (AIA) (Prinsen et al. 1993).

## 1.2. Bacterias del Orden Rhizobiales

En la clase  $\alpha$ -proteobacterias encontramos bacterias que viven en ambientes acuáticos (como *Caulobacter* sp. y varias especies del Orden Rhodobacterales), bacterias patógenas de plantas (*Agrobacterium* actualmente reclasificadas con *Rhizobium*), bacterias que son parásitos intracelulares de animales (como *Rickettsia* y *Brucella*), y bacterias que viven en el suelo (como muchas de las especies del Orden Rhizobiales). El Orden Rhizobiales es fenotípicamente heterogéneo y amplio. Este orden reúne a bacterias gram negativas y su clasificación se basa únicamente en el secuenciamiento del gen 16s RNA (Kuykendall, 2005). Un tipo de bacterias muy importante a nivel agronómico es el que está conformado por aquéllas que son capaces de establecer simbiosis mutualistas específicas con plantas leguminosas. En este grupo se enmarcan muchas de las especies pertenecientes al Orden Rhizobiales, a las que se las denomina rizobios. Entre ellas encontramos bacterias de los géneros *Mesorhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, y *Bradyrhizobium* (Pini et al. 2011), siendo este último género el de mayor interés para nuestro trabajo debido que es el género principal en el establecimiento de la simbiosis con una de las leguminosas, soja (*Glycine max* (L.) Merr.), con mayor superficie de área sembrada en nuestro país.

### 1.2.1. La Familia Bradyrhizobiaceae

El género *Bradyrhizobium* fue descrito por Jordan (1982), el cual incluía todas las bacterias que fijan biológicamente el nitrógeno (FBN) en asociaciones simbióticas con leguminosas. Los avances en los métodos moleculares para el análisis filogenético, han llevado a la creación de la familia Bradyrhizobiaceae, que incluye géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno que tienen características diferentes del resto de los géneros que la componen, pero que tienen tasas similares de crecimiento lento (5-6 días) en medio de cultivo (Garrity et al. 2005; Turner and Young, 2000). Además del género *Bradyrhizobium* (derivado del *bradus* término latino, que significa crecimiento lento) (Garrity et al. 2005; Euzéby, 2006), la familia Bradyrhizobiaceae comprende 11 géneros más. La taxonomía en Bradyrhizobiaceae es bastante confusa y hace a esta familia una de las más distintas en términos de la inclusión de géneros que son fenotípicamente diversos y que presentan características fisiológicas y ecológicas extremas (Marcondes et al. 2014).

### 1.2.2. El Género *Bradyrhizobium*

El género *Bradyrhizobium*, se caracteriza por bacterias pequeñas en forma de bacilos en cultivos jóvenes, pero pleomórficas en cultivos de mayor edad o bajo condiciones adversas, gram negativas, móviles y no formadoras de esporas. Las diferentes especies del género *Bradyrhizobium* forman nódulos simbióticos en las raíces de las leguminosas tropicales (Leguminosae), en el que las bacterias viven como simbiontes fijadores de nitrógeno. Los bacteroides, donde se fija el nitrógeno, tienen gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato que son refráctiles por microscopía de contraste de fase, y puede presentar inclusiones de polifosfato. En medio de cultivo sólido que contiene arabinosa, extracto de levadura, o gluconato (Kuykendall and Elkan, 1987; Kuykendall et al. 1988), las colonias de *Bradyrhizobium* se caracterizan por ser opacas, rara vez translúcidas, blancas, y convexas; puede tener un aspecto granular; y nunca son más grande que 1 mm de diámetro después de la incubación durante 5-6 días. En medio líquido, la turbidez sólo aparece después de 3-4 días, y el tiempo de generación de estas especies se calcula que es entre 9 y 18 h. A continuación, en la Tabla 1, se resumen las características más representativas del Género.

**Tabla 1.** Características más representativas del Género *Bradyrhizobium*

Género <i>Bradyrhizobium</i>	
Morfología	Varillas (0,5-0,9x1,2-3,0 $\mu$ m)
División Celular	Se hinchan y se bifurcan en forma de Y
Cápsula y estructura interna	Gránulos Poli- $\beta$ -hidroxibutirato
Movilidad	Un flagelo polar o subpolar
Compuestos importantes o almacenamiento	Poli- $\beta$ -hidroxibutirato
	Polisacárido extracelular soluble en agua
Contenido G+C	61-65%
Tamaño de la colonia, apariencia y color	>1,0 mm, circular, opaca, blanca y convexa
Temperatura óptima	25-30 °C
pH óptimo	pH 6-7. Tolerante al ácido
Metabolismo y características de cultivo	Aeróbicas
	Quimioorganótrofas
	No crecen en medio con 2% NaCl
	Absorben levemente el indicador rojo congo en EMA (Vincent, 1970)
Principal fuente de Carbono	Usan varias fuentes de carbono y ácidos orgánicos
Principal fuente de Nitrógeno	Sales de amonio, nitrato y aminoácidos
Fijación de Nitrógeno	En simbiosis con la raíces de leguminosas

El género *Bradyrhizobium* cuenta con ocho especies descritas: *B. canariense*, *B. elkanii*, *B. iriomotense*, *B. japonicum*, *B. jicamae*, *B. liaoningense*, *B. pachyrhizi* y *B. yuanmingense* (Ramírez-Bahena et al. 2009). En el 2013, una comparación de secuencias de genes 16s RNA, caracterización fenotípica e hibridación DNA-DNA permitieron a Ramírez-Bahena et al. (2013) proponer la reclasificación de *Agromonas oligotrophica* dentro del género *Bradyrhizobium* como *Bradyrhizobium oligotrophica*. La cepa tipo de *Bradyrhizobium*, *B. japonicum* USDA110 fue reclasificada a *B. diazoefficiens* (Delamuta et al. 2013)

Las especies de *Bradyrhizobium* son habitantes comunes de suelo potencialmente capaces de invadir los pelos radicales de leguminosas e inducir la formación de nódulos y la interacción simbiótica con la planta que termina con la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Estas cepas causan la producción de nódulos en *Glycine max* (L.) Merr., *Vigna unguiculata* (L.) Walp (caupí), *Macroptilium atropurpureum* (siratiro), ciertas especies de Lotus, y una amplia variedad de las leguminosas, que también son noduladas por *Mesorhizobium loti*, como la Acacia. Dado que las cepas de *Bradyrhizobium* son difíciles de aislar directamente del suelo, el aislamiento requiere el uso de la planta de leguminosa de la que se seleccionan los nódulos para el aislamiento. Las cepas de *Bradyrhizobium* producen lipo-quitto-oligosacáridos (LCO) denominados factores Nod para controlar la especificidad del hospedador (Dénarié et al. 1992; Carlson et al. 1993; Stacey et al. 1995).

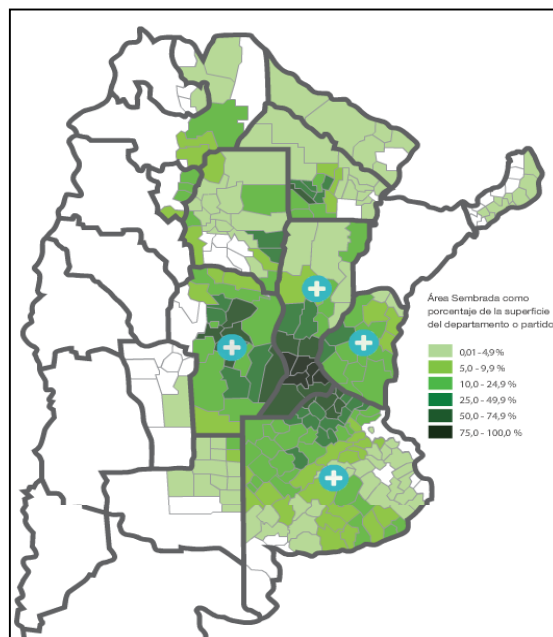
### 1.3. *Bradyrhizobium japonicum* E109 como modelo de estudio

En la década del 70, cuando se produjo la expansión de soja en nuestro país, se consideró la introducción de cepas seleccionadas de *B. japonicum* en semillas destinadas a la producción agrícola. Varias cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* se recibieron en Argentina a partir de diferentes colecciones de todo el mundo para ser evaluadas en condiciones agronómicas, incluida la cepa 2860 (anteriormente llamado USDA138 y que corresponde al serogrupo *Bradyrhizobium japonicum* USDA6), enviados por el Departamento de Investigación Científica e Industrial (DSIR) de Nueva Zelanda. Luego de una exhaustiva evaluación, selección y re aislamiento de nódulos de soja, la cepa aislada fue renombrada como *Bradyrhizobium japonicum* cepa E109. Hasta la fecha, *B. japonicum* E109 ha sido la única cepa recomendada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) para la inoculación de soja debido a su capacidad para colonizar efectivamente la planta y fijar el nitrógeno, y como consecuencia directa produce un aumento en la productividad de los cultivos (Peticari et al. 1996). Junto con esta capacidad, se han propuesto mecanismos alternativos para explicar la promoción del crecimiento, especialmente en no leguminosas, tales como la solubilización de fosfato (Halder et al. 1991), la producción de sideróforos

(Chabot et al. 1996), la inducción de resistencia sistémica (Cartieaux et al. 2008), y la biosíntesis de fitohormonas (Antoun et al. 1998). Boiero et al. (2007) y Cassán et al. (2009) evaluaron *in vitro* e *in vivo* los mecanismos de promoción del crecimiento que operan en *B. japonicum* E109. En tal sentido, la producción de fitohormonas tales como auxinas (AIA), giberelinas (GAs) y citocininas parecerían tener un rol fundamental en los procesos de interacción con la planta y promoción del crecimiento. En el año 2012 se inició un proyecto en la UNRC bajo la dirección del Dr. Cassán, cuyo objetivo fundamental se basó en la obtención de la secuencia del genoma de *B. japonicum* E109 y esta iniciativa culminó exitosamente en 2014 con la publicación de la secuencia completa del genoma de esta bacteria (Torres et al. 2015).

#### 1.4. Importancia de la interacción simbiótica Soja-*Bradyrhizobium*

La simbiosis *Bradyrhizobium*-soja es considerada una de las asociaciones de mayor importancia económica mundial (Hungria and Mendes, 2014). Fue domesticada por primera vez en China e introducida en diferentes partes del mundo (Qiu et al. 2011). Según datos oficiales de la Bolsa de Cereales de Buenos Aires y Bolsa de Comercio de Rosario, durante la campaña 2014/15, el área destinada a la siembra de soja se ubicaría entre los 20,6 y 20,9 millones de hectáreas con una producción total de 60,1 millones de toneladas. El cultivo agronómico se extiende más de 20 millones de hectáreas en Argentina, donde al menos el 85%, son inoculados con la cepa E109 (Piccinetti et al. 2013). En la Figura 1, se observa una representación del área sembrada con el cultivo de soja en nuestro país.



**Figura 1.** Área sembrada de soja campaña 2014/15. Fuente obtenida de la Bolsa de Comercio de Rosario.

#### 1.4.1. Mecanismo de promoción del crecimiento vegetal por *B. japonicum* E109

Bajo un consorcio llevado a cabo por nuestro laboratorio, la UNRC, Indear, INTA-IMyZA, entre otros se llevó a cabo la secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109 (Torres et al. 2015). Su posterior análisis genómico, reveló que esta bacteria sería capaz de promover el crecimiento vegetal por mecanismos diferentes a la fijación biológica de nitrógeno. El genoma de E109 contiene genes relacionados con el sistema de secreción tipo II y VI y la biosíntesis de fitohormonas. Resultados previos de nuestro laboratorio (Boiero et al. 2007; Cassán et al. 2009) sugieren que esta cepa sería capaz de promover el crecimiento de plantas inoculadas a través de la producción de fitohormonas y su consecuente liberación en las formulaciones biológicas utilizadas para el tratamiento de semillas. Boiero et al. (2007) identificaron y cuantificaron las fitohormonas del tipo ácido indol-3-acético (AIA), zeatina (Z) y ácido giberélico (GA<sub>3</sub>), producidas y liberadas al medio de cultivo. En trabajos similares otros autores sugieren la capacidad de otras cepas de la misma especie para mineralizar fósforo por la solubilización de fosfatos (Halder et al. 1991) o captar hierro a través de la producción de sideróforos (Chabot et al. 1996).

#### 1.5. Auxinas

Auxinas, es el nombre genérico que representa a un grupo de compuestos reguladores del crecimiento vegetal que se caracterizan por su capacidad de inducir la elongación de las células del tallo en la región subapical. El ácido indol-3-acético (AIA) es la auxina más representante de este grupo y es la más abundante en la naturaleza. Estos compuestos han sido vinculados a procesos claves del desarrollo vegetal, tales como la orientación del crecimiento de tallos y raíces en respuesta a la luz (fototropismo) y gravedad (gravitropismo) (Kaufman et al. 1995); dominancia apical; iniciación de las raíces laterales y adventicias (Malamy and Benfey, 1997); estimulación de la división celular (Kende and Zeevaart, 1997) y elongación de tallos y raíces (Ross et al. 2000) entre otros. Las fuentes más importantes de auxinas que regulan el "pool" endógeno disponible para la planta involucran: síntesis *de novo*, degradación o catabolismo y formación e hidrólisis de conjugados, transporte, compartimentalización tanto en los tejidos de la planta como en aquellas bacterias asociadas con ella (Glick et al. 1999).

##### 1.5.1. Auxinas en *B. japonicum*

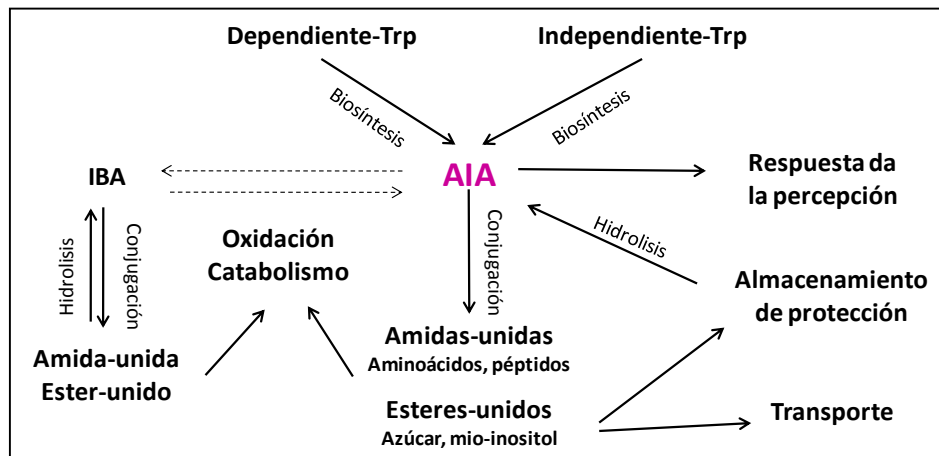
La respuesta de la planta al AIA producido por microorganismos puede variar de benéfica a perjudicial, dependiendo de la concentración incorporada en los tejidos. En este sentido, algunos autores consideran que el aumento del contenido endógeno de la hormona



por la actividad microbiana del suelo ó sobre la planta, podría suplementar transitoriamente los niveles sub-óptimos del hospedador, modificar parcialmente el metabolismo celular, y por ello, promover el crecimiento. La infección de las raíces de plantas de soja con *B. japonicum* proporciona la formación de nódulos en las raíces donde se reduce el nitrógeno atmosférico en amoníaco. La formación de nódulos es el resultado de una compleja interacción entre la bacteria y la planta, donde las hormonas vegetales juegan un papel clave en el desarrollo y/o mantenimiento de los nódulos. Se ha demostrado que los nódulos contienen mayores niveles de auxinas (Thimann, 1936), y que la auxina principal en nódulos de las raíces es el AIA (Dullaart, 1970). En la actualidad algunos trabajos indican que los cambios en el balance de esta hormona son un pre-requisito para la organogénesis del nódulo (Mathesius et al. 1998).

**1.5.2. Metabolismo de Auxinas.**

Los niveles reales de auxinas en una célula en un momento determinado del desarrollo están determinados por biosíntesis, transporte, interconversión, conjugación, hidrólisis y catabolismo. La Figura 2 muestra los procesos biológicos del metabolismo de AIA.



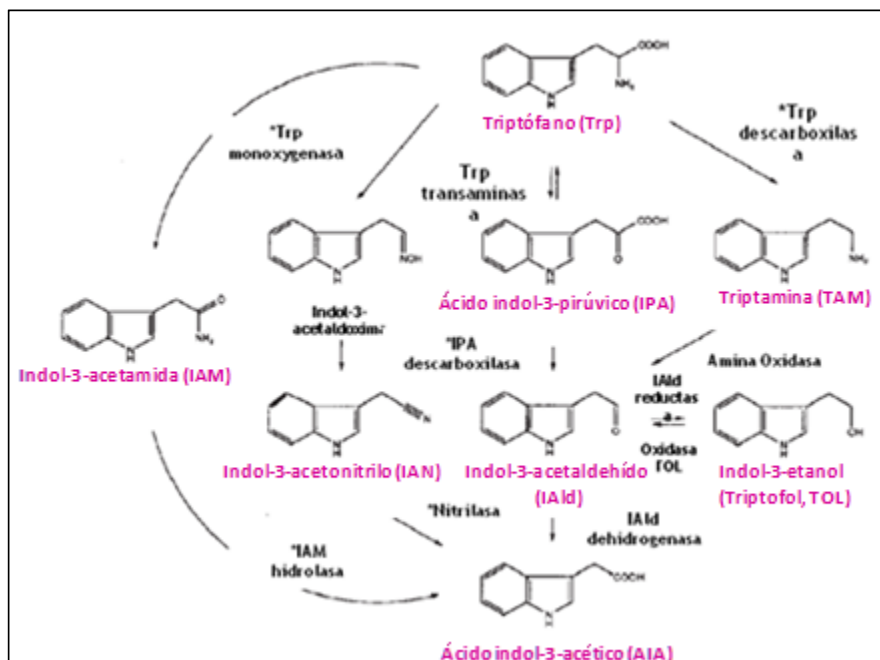
**Figura 2.** Procesos biológicos y bioquímicos que integran el metabolismo de AIA en la naturaleza. (IBA= ácido indol butírico).

La interconversión de IBA a AIA estaría dada por una enzima denominada acil-coA deshidrogenasa, donde oxida la molécula para convertirla en AIA en *Arabidopsis* (Zolman et al. 2007).

**1.5.2.1. Biosíntesis de AIA en *Bradyrhizobium japonicum***

Para *B. japonicum*, la producción de auxinas ha sido descrita como parte de la capacidad promotora del crecimiento, a nivel del desarrollo del sistema radical y en la formación de nódulos durante la simbiosis con leguminosas. *Bradyrhizobium* sp. tiene la

capacidad genética y fisiológica de producir AIA en medios de cultivos (Hutzinger and Kosuge 1968; Kaneshiro et al. 1983) y esto ha sido demostrado en numerosos experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*. En el caso de experimentos llevados a cabo *in vivo* se ha comprobado que los nódulos producidos por una cepa de *B. japonicum* hiperproductora de AIA contienen mayor cantidad de AIA que aquellos nódulos inducidos por una cepa salvaje (Hunter 1987; Hunter 1989) lo que indicaría que la bacteria es capaz sintetizar su propia hormona en el estado de bacteroide. Minamisawa and Fukai (1991) observaron que las cepas de *Bradyrhizobium japonicum* productoras de rhizobitoxina excretaban un compuesto fitotóxico en el medio de cultivo; siendo este compuesto purificado e identificado como AIA. Los autores observaron que las cepas pertenecientes al genotipo II (USDA 94 y USDA 31) que producían rhizobitoxina, además excretaban mayor cantidad de AIA en el medio de cultivo, sin embargo, las cepas de genotipo I (USDA 110) no excretaron este tipo de compuesto en el sobrenadante, incluso cuando se añadió triptófano en el medio. Estos resultados sugieren que, en *B. japonicum*, la biosíntesis completa de AIA solo se limitaría a las cepas del genotipo II, que producen rhizobitoxina. En la biosíntesis de AIA se han descrito múltiples vías, pero en rizobacterias predominan dos sobre las demás: la vía del indol-3-acetamida (IAM) y la vía del indol-3-piruvato (IPyA) (Lambrecht and Okon 2000). El análisis genómico y funcional de *B. japonicum* E109, mostró que la cepa posee la información para la biosíntesis de AIA y que las vías predominantes en E109 serían IAN (indol-3-acetonitrilo) y IAM debido a la ausencia del gen para la enzima clave de la síntesis por la vía de IPyA (Torres et al. 2013). A continuación, en la figura 3, se muestra un resumen de las vías de síntesis de AIA en *B. japonicum*.



**Figura 3.** Rutas de la biosíntesis de AIA dependiente de triptófano. Las rutas de biosíntesis de AIA mostradas han sido implicadas tanto en planta como en microorganismos. Los genes que codifican las enzimas indicadas con un asterisco se han clonado a partir de bacterias asociadas a las plantas (Costacurta and Vanderleyden, 1995; Monteiro et al. 1988; Patten and Glick, 1996). Los genes que codifican las enzimas triptófano descarboxilasa (De Luca et al. 1989) y nitrilasa (Bartel and Fink, 1994; Bartling et al. 1992; Bartling et al. 1994; Tsunoda and Yamaguchi, 1995) se han clonado a partir de plantas.

#### 1.5.2.2. Catabolismo de AIA en bacterias

El catabolismo se define como un proceso catalítico irreversible que implica la pérdida de la actividad biológica de la hormona. En el caso del AIA el catabolismo puede llevarse a cabo por medio de las siguientes reacciones químicas:

1. Oxidación que altera la cadena lateral.
2. Oxidación que producen compuestos oxindol o dioxindol.
3. Apertura del anillo pirrol y otras reacciones.
4. Conjugación con aminoácidos, carbohidratos o moléculas pequeñas.

En esta última reacción, no se produce un catabolismo de AIA propiamente dicho, sino que la molécula se inactiva al conjugarse con las moléculas mencionadas.

Las reacciones 1, 2 y 4 han sido caracterizadas en bacterias (Ernstsen et al. 1987; Hutzinger and Kosuge, 1968; Mino, 1970) y plantas (Kinashi et al. 2014; Nonhebel and Bandurski, 1984; 1985; Reinecke and Bandurski, 1983; Sandberg et al. 1987). Las reacciones de tipo 3, solo se han descrito para bacterias como *Arthobacter* sp. (Mino, 1970) y *Pseudomonas* sp. donde la vía de catabolismo implica la formación de los compuestos intermediarios: escatol (3-metil indol); indoxilo (3-hidroxi indol); ácido salicílico y catecol (Proctor, 1958). En el caso de aislamientos de muestras obtenidas del aire la degradación del AIA ocurre con la formación de ácidos o-formaminobenzoilacético; o-aminobenzoilacético y ácido antranílico (Tsubokura et al. 1961).

Por otro lado, el AIA puede ser utilizado como fuente de C o N por parte de un organismo (catabolismo asimilativo). Por ejemplo, se puede mencionar a *Pseudomonas putida* cepa 1290 donde el AIA degradado sirve como fuente de C y N para el crecimiento de la bacteria por su alto valor nutritivo y la fácil digestibilidad, permitiendo la presencia y la expansión de las poblaciones de la bacteria en lugares donde el AIA está presente. *P. putida* 1290 degrada el AIA hasta catecol mediante un cluster compuesto de 10 genes para la asimilación de AIA, los que codifican para enzimas que actúan sobre el grupo indol, teniendo estas proteínas una función reguladora o desconocida. Por otro lado, se identificaron grupos

de genes *iac* similares en 22 genomas de especies bacterianas como por ejemplo *P. putida* GB-1, *Marinomonas* sp. MWYL1, *Burkholderia* sp. 383, *Sphingomonas wittichii* RW1 y *Rhodococcus* sp. RHA1. *B. diazoefficiens* USDA110 carece de la información genética que codifica para el cluster *iac*, pero tiene una secuencia con alta homología para el gen *iacA* el cual sería gen en iniciar la degradación de AIA (Leveau and Gerards 2008). Otra vía propuesta, es aquella descrita para los bradyrizobios, que supone el catabolismo de AIA a través de ácido dioxindol-3-acético, que luego se convierte a 2-dioxindol y por acción de una isatina reductasa a isatina, luego una isatina amidohidrolasa lo convierte a ácido aminofenil glioxílico (ácido isatínico), el que finalmente origina el ácido antranílico (Olesen and Jochimsen, 1996). En la siguiente figura, se muestra un resumen de las vías de catabolismo de AIA.

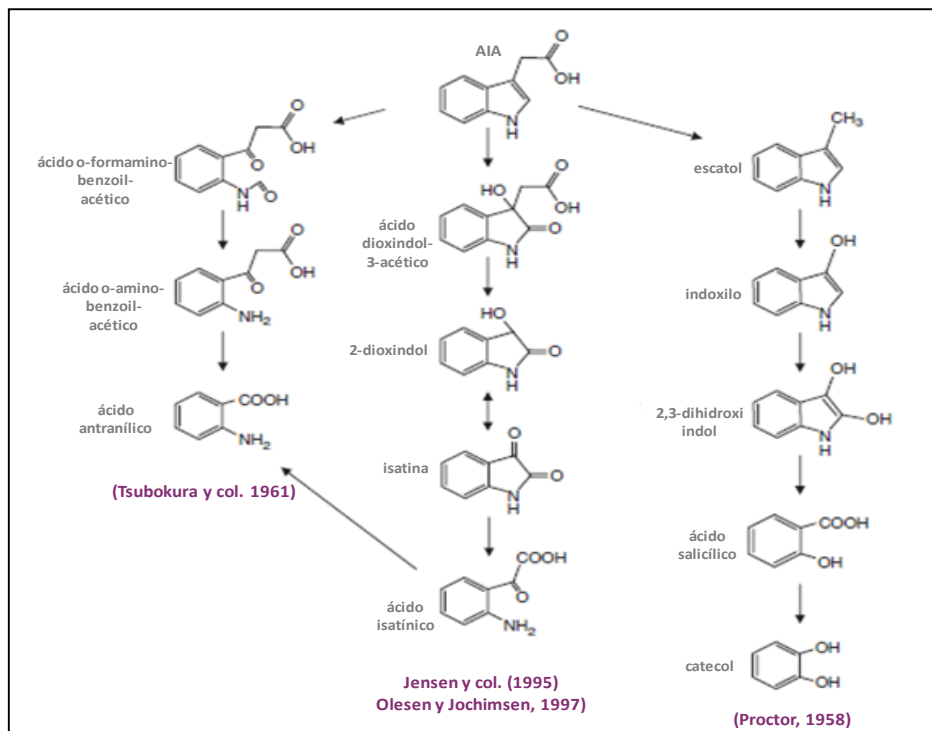


Figura 4. Vías propuestas para el catabolismo de AIA. Catabolismo asimilativo u oxidativo.

### 1.5.2.3. Catabolismo de AIA en *Bradyrhizobium japonicum*

A comienzo de la década del 90 se evaluó la capacidad de metabolizar (sintetizar y catabolizar) el AIA en cepas de *B. japonicum* incluyendo la cepa *B. diazoefficiens* USDA110 y se comprobó que algunas de ellas eran incapaces de producir esta hormona y sobre la base de esta diferenciación, junto a la capacidad de producir rizobiotoxina y exopolisacáridos (EPS) dividieron a la especie en dos genotipos, denominados Genotipos I y II (Minamisawa and Fukai, 1991). Los autores propusieron que la diferencia de acumulación de AIA podría tener dos posibles explicaciones; la primera en el que las cepas del Genotipo I no solo producen AIA, sino que también pueden catabolizarlo y por ello que no se acumula en el sobrenadante del medio

de cultivo; mientras que las cepas de Genotipo II presentan un comportamiento opuesto. Otros autores evaluaron la capacidad catabólica de *B. diazoefficiens* USDA 110 y observaron que esta cepa es capaz de catabolizar la hormona y que la reacción sería dependiente de oxígeno. Según datos espectrofotométricos el anillo indol se rompería y la enzima encargada de dicha reacción sería análoga a la triptófano 2,3-dioxigenasa. También han propuesto que el ácido antranílico sería un producto de degradación de esta vía catabólica (Egebo et al. 1991). Jensen and Jochimsen (1995) aislaron los metabolitos de la degradación de AIA de USDA 110 y los analizaron a través de cromatografía líquida (HPLC), y espectrometría de masas (MS); los productos identificados indicarían una nueva vía metabólica en la que el AIA se oxida a ácido dioxindol-3-acético, luego a dioxindol; ocurriendo una nueva oxidación que da como producto isatina, el que luego este se hidroliza a ácido glioxílico  $\alpha$ -aminofenil (ácido isatínico) para dar como producto final de la reacción ácido antranílico. Estos autores proponen que el ácido antranílico sigue metabolizándose a productos no identificados, no pudiéndose determinar tampoco las enzimas encargadas de la degradación de la hormona. Otros autores observaron que al adicionar AIA a una mutante de USDA110 hiperproductora de AIA, se acumulaba en el medio de cultivo, un compuesto que se correlacionaba con el ácido isatínico y dioxindol, sin embargo al evaluar otra cepa de *Bradyrhizobium* sp. con las mismas características que la anterior, no se observaba la acumulación de dichos compuestos. Este hecho, más la ausencia de la actividad de las enzimas isatina amidohidrolasa e isatina reductasa, hacen suponer que una vía catabólica diferente podría estar operando en bacterias de este género (Jarabo-Lorenzo et al. 1998).

Recientemente, Donati et al. (2013) evaluaron la actividad transcripcional de *B. diazoefficiens* USDA110 posterior a la adición de AIA al medio de cultivo. Estos autores observaron un incremento en la expresión de genes relacionados con el estrés (proteínas de shock térmico, frío y proteínas asociadas al mantenimiento de la integridad de las proteínas), como también un incremento en la expresión de los genes de EPS. No pudieron determinar las enzimas responsables de la degradación de AIA, pero proponen dos enzimas como las responsables del catabolismo de la hormona, la indol piruvato ferredoxina oxidoreductasa y la triptófano 2,3-dioxigenasa, ya que fueron inducidas y tendrían un rol en el metabolismo de AIA (Van Puyvelde et al. 2011; Egebo et al. 1991); sin embargo, no existen reportes posteriores que confirmen esta hipótesis. En trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio (Cassán et al. 2011; Torres et al. 2014), determinamos la capacidad de *B. japonicum* E109 y/o de sobrenadantes obtenidos de tales medios de catabolizar AIA en medio de cultivo definido. La adición exógena de AIA a cultivos puros de esta cepa en fase exponencial de crecimiento permitió comprobar una rápida disminución de hasta un 50% de la concentración de la

hormona en las primeras 8 h posteriores al tratamiento y en menos de 24 h ya no se detectó el compuesto indólico tanto en el cultivo como en el sobrenadante de la cepa E109.

### 1.6. Peroxidasas en la degradación de AIA

Las peroxidasas están presentes en todas las plantas del planeta. Estas enzimas están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos a lo largo de todo el ciclo de vida vegetal, donde podemos destacar su intervención en la germinación, el crecimiento celular, crecimiento de la pared celular, lignificación, estrés biótico y abiótico, simbiosis, nodulación, micorrización y la senescencia de la planta. Las peroxidasas vegetales (Welinder 1992) catalizan la reducción de  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno) mediante la adopción de electrones a diversas moléculas donantes, tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina, auxinas, o metabolitos secundarios (Hiraga et al. 2001). El AIA es un potente regulador del crecimiento vegetal. La descarboxilación oxidativa de AIA por peroxidasas vegetales se considera una reacción de degradación de gran importancia vinculada con el control de los niveles endógenos de AIA (Gazaryan et al. 1996). El catabolismo de AIA por peroxidasas se ha estudiado en numerosos sistemas biológicos además de las plantas, y el requisito de la presencia de co-factores y el  $H_2O_2$  varía entre especies. La degradación de auxina por HRP (Peroxidasa de rábano picante) puede ocurrir sin co-factores añadidos, y en presencia o ausencia de  $H_2O_2$  (Hinman and Lang, 1965). La oxidación aeróbica de AIA catalizada por la peroxidasa en ausencia de  $H_2O_2$ , dejaría como productos finales el indol-3-aldehído y oxindol 3-metileno aunque la sensibilidad del sistema a una variedad de parámetros y la complejidad de los productos de reacción, como de los productos intermediarios de la enzima han dificultado la dilucidación de la secuencia completa de las vías de reacción y el mecanismo de la activación de oxígeno (Grambow and Langenbeck-Schwich, 1983).

Una peroxidasa inducida por *Ensifer sp.* - (ex *Sinorhizobium sp.*), se expresa con rapidez y de forma transitoria en las primeras etapas de interacción con *Medicago truncatula* (Cook et al. 1995). Esta peroxidasa podría, mediar en la alteración de la pared celular y en la formación del hilo de infección en el desarrollo de nódulos tempranos (Salzwedel and Dazzo 1993). Las auxinas se acumulan en el sitio de iniciación de nódulos y posteriormente disminuyen durante la formación del primordio nodular (Mathesius et al. 1998; Penmetsa et al. 2003). El aumento de peroxidasas durante nodulación podría estar relacionado con el control de los niveles de auxina en las raíces. De hecho, algunas peroxidasas de clase III oxidan las auxinas y así podrían controlar indirectamente la formación de nódulos a través del catabolismo de tales compuestos (Savitsky et al. 1999; Mathesius, 2001).

En resumen, el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109, ha sido estudiado parcialmente en diferentes rizobios del mismo orden, género o especie y por el abordaje de diferentes mecanismos. A la fecha, no existe un modelo definitivo que permita comprender el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109 razón por la cual en este trabajo de tesis de grado nos enfocamos en comprender el modelo que opera en esta bacteria.

## 2. HIPOTESIS

En base a los antecedentes, se sugiere la siguiente hipótesis de trabajo.

### 2.1. Hipótesis general

El catabolismo de ácido indol-3-acético en *B. japonicum* E109 depende de la actividad de un compuesto del tipo enzimático secretado al medio de cultivo y con capacidad de oxidar esta molécula.



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivos Generales

1. Evaluar el comportamiento de cultivos puros de *Bradyrhizobium japonicum* E109 en su capacidad de catabolizar ácido indol-3-acético en diferentes condiciones experimentales.

#### 3.2. Objetivos específicos

1. Identificar el agente biológico responsable del proceso catabólico de la hormona en cultivos puros de *B. japonicum* E109 y analizar los resultados desde el punto de vista fisiológico.
2. Evaluar la actividad y capacidad de la enzima responsable del catabolismo.
3. Generar variantes genóticas para dicha función metabólica y evaluar su comportamiento molecular, microbiológico y fisiológico.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Material Biológico.

*B. japonicum* E109 fué provista por el Banco de cepas del IMyZA-INTA Castelar y *B. elkanii* SEMIA 5019 por el Banco de cepas de Embrapa de Brasil.

### 4.2. Metodología general para la cuantificación de AIA por espectrofotometría.

Se tomaron 1000 µl del cultivo bacteriano y se colocaron en un tubo plástico de tipo eppendorf de 1,5 ml de capacidad. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min y se filtró con filtros Millipore de 0.2 µm. Se tomaron 500 µl del sobrenadante y se mezclaron con 500 µl del reactivo de Salkowski (Salkowski, 1885) (7,9 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 12,5 g/l FeCl<sub>3</sub>) agitando 10 veces en forma de inversión y suavemente. Se incubó por 30 min en completa oscuridad y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 530 nm. Con los datos de absorbancia se obtuvo un promedio de 3 réplicas de la muestra (réplica experimental) y 3 réplicas del tratamiento (réplica biológica) y se hizo el cálculo de concentración por el uso de la ecuación obtenida de una curva patrón generada con soluciones entre 0,1- 50 mM de AIA puro. La concentración de AIA se expresa en µg.ml<sup>-1</sup>. La preparación de los medios y soluciones, de las metodologías detalladas hasta aquí, se encuentran en el **Anexo**.

### 4.3. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109.

Se inoculó un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de caldo de cultivo EMA (Vincent 1970) con la adición de 10 mg.l<sup>-1</sup> L-triptófano, con un pre-cultivo de *Bradyrhizobium japonicum* E109. El cultivo se incubó en estufa a 30°C y con una agitación de 180 rpm. Una vez que el cultivo llegó a una DO<sub>595</sub>≈0,6 (aproximadamente 72 h) correspondiente a principio de la fase exponencial, se colocó 50 ml del cultivo en un tubo plástico cónico de igual capacidad que se centrifugó a 8000 rpm por 15 min a 4°C. Se repitió el ciclo de centrifugación para lograr la máxima separación del sobrenadante. Luego de obtener el sobrenadante se tomaron 5 ml del mismo. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental, para un total de 6 tubos de ensayo. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. Sobrenadante de E109 con 10 µg.ml<sup>-1</sup> de AIA.
2. Sobrenadante de E109 con agua destilada.

Los tubos se incubaron a la temperatura y en agitación como se mencionó previamente, y se tomaron muestras periódicas del sobrenadante, cada 2 h y hasta la finalización del experimento, donde se cuantificó AIA por el método de cuantificación de Salkowski (1885). Al cultivo se le hizo los controles de pureza en placa de Petri conteniendo

agar EMA (Vincent, 1970) para observar el desarrollo típico del microorganismo y agar TSA (Tripteina de soya) para la detección de microorganismos contaminantes dado que este medio inhibe el desarrollo de bradyrhizobios.

#### **4.4. Evaluación de actividad catabólica del AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 desnaturalizados mediante calor.**

Se obtuvo un cultivo de *B. japonicum* E109 y se repitió la metodología descrita en el punto 4.3. Una vez que se obtuvo el sobrenadante del cultivo se tomaron 5 ml y el proceso se repitió para un total de 6 tubos de ensayo, donde 3 de ellos fueron sometidos a desnaturalización por acción de calor. La desnaturalización del sobrenadante mediante un baño a 90°C durante 10 min. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. Sobrenadante de E109 con 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA.
2. Sobrenadante de E109 desnaturalizado con 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA

Los tubos se incubaron en las mismas condiciones antes mencionadas, y se tomaron muestras periódicas de sobrenadante, cada 2 h y hasta la finalización del experimento para la cuantificación de AIA (Salkowski, 1885) y se realizaron los controles de pureza correspondientes.

Como consecuencia de los resultados obtenidos y para dilucidar si una enzima del tipo peroxidasa producida y liberada al medio de cultivo por *B. japonicum* E109 es la principal responsable del catabolismo de AIA, se desarrollaron los siguientes ensayos.

#### **4.5. Detección de la actividad peroxidasa en sobrenadantes de *B. japonicum* E109.**

Se cultivó la bacteria bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.3. El procedimiento consistió en determinar actividad por el método espectrofotométrico continuo a 37°C, con *o*-dianisidina 0,63 mM y peróxido de hidrógeno 0,5 mM como sustrato, empleando como solución buffer acetato de sodio/ácido acético 0,1 M; pH 5,3. Se siguió el aumento de absorbancia a 470 nm durante 1 min originado por la aparición del producto coloreado de la reacción [bis (3,3' -dimetoxi-4-amino) azo-bifenilo] ( $\epsilon = 11,3 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad obtenida se expresó en Unidades de enzima. Considerando que 1 U representa la cantidad de enzima capaz de oxidar 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato por min.

#### 4.6. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 modificados con la adición exógena de peroxidasa de rábano picante (HRP).

*B. japonicum* E109 se cultivó como se describió en el punto 4.3 y se realizaron los controles de pureza. Se tomó 50 ml del cultivo y se centrifugó a 8000 rpm por 15 min. Se tomó 5 ml del sobrenadante y se colocó en un tubo estéril. Este proceso se repitió para un total de 6 tubos de ensayo, donde 3 de ellos fueron sometidos a una desnaturalización con calor como se describió en el punto 4.4. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. Sobrenadante de E109 con 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA y 20  $\mu\text{l}$  de HRP.
2. Sobrenadante de E109 desnaturalizado con 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA y 20  $\mu\text{l}$  de HRP.

La solución de AIA, se esterilizó en filtros Millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ . Los tubos se incubaron en las mismas condiciones, y se tomaron muestras periódicas de sobrenadante, cada 2 h y hasta la finalización del experimento, donde se cuantificó la concentración de AIA.

Nota: Utilizamos la concentración de (20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), dado que es el doble de lo que produce *Azospirillum brasilense*, y esta cepa se usa como referencia en la producción de la hormona.

#### 4.7. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 modificados con la adición exógena de $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Una clase de enzima peroxidasa, funciona con un oxidante que es el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , mientras que la otra clase de peroxidasa funciona sin el oxidante más comúnmente conocidas como catalasas. A continuación del experimento 4.6, se evaluó si con el agregado de  $\text{H}_2\text{O}_2$  aumenta la velocidad en la degradación de AIA en E109 a expensas de la actividad de la enzima.

*B. japonicum* E109 se cultivó, se realizó el control de pureza y se obtuvo el sobrenadante del cultivo bajo las condiciones mencionadas en el punto 4.3. Se tomó 5 ml del mismo y se colocó en un tubo estéril, un total de 6 tubos. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. Sobrenadante de E109 con 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA.
2. Sobrenadante de E109 con 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA y 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Luego de analizar los resultados de este primer experimento, se procedió a repetir la metodología incrementando la concentración de la solución de AIA,  $\text{H}_2\text{O}_2$  y utilizando medio EMA (Vincent 1970) como control. Los tratamientos fueron:

1. Medio EMA con 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA y 80  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$
2. Sobrenadante de E109 con 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA y 80  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Los tubos se incubaron en las condiciones antes mencionadas, y luego de 2 h se tomaron muestras periódicas cada 30 minutos en el primer experimento y cada 60 min en el segundo experimento, hasta la finalización del ensayo, donde se cuantificó la concentración de AIA.

#### **4.8. Construcción de una mutante $\Delta$ per de *B. japonicum* E109 (-per).**

La construcción de la mutante deficiente en la enzima peroxidasa (EC.1.11.1.7) se realizó en colaboración con el Dr. Elías Mongiardini del Laboratorio de Interacciones Rizobios y Soja, Instituto de Biotecnología y Biología Molecular, de la Universidad Nacional de La Plata. La secuencia blanco para el procedimiento de mutagénesis se obtuvo sobre la base del análisis genómico de *B. japonicum* E109 a través del sistema RAST en el que se identificaron 2 secuencias codificantes relacionadas con la actividad peroxidasa, la fig|375.26.peg.786 y la fig|375.26.peg.5242. La elección de solo una de ellas para la intervención molecular se fundamentó en los siguientes hechos: (1) debido a las características del género y a la complejidad del procedimiento resulta difícil obtener dobles mutantes para cualquier carácter en *B. japonicum*; (2) la mutación de uno de los genes produciría una disminución de la actividad peroxidativa y (3) la secuencia seleccionada no tenía asociada una actividad catalasa (EC1.11.1.6), como en el caso de la fig|375.26.peg.786. Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de Simon et al. (1989) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1,5 ml se mezclaron 0,5 ml de la cepa donadora que llevaba el plásmido de interés a una  $DO_{620}$  de 0,4-0,5 con 0,9 ml de un cultivo de igual DO de la cepa *B. japonicum* E109. La mezcla fue luego centrifugada a 3.000  $xg$  durante 8 min y el pellet se re suspendió suavemente en aproximadamente 50-75  $\mu$ l de medio de cultivo. Dicha suspensión fue colocada en una placa de Petri con medio sólido PSY sin antibióticos e incubada a 28°C durante 48 h. Finalmente, la mezcla de bacterias donadoras con el plásmido y E109 fue re suspendida en agua bidestilada estéril y plaqueada en medio sólido suplementado con gentamicina y kanamicina para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se agregaron ya sea la bacteria donadora o E109. La selección de los mutantes fue por resistencia a gentamicina y sensible a kanamicina y el chequeo con primers externos. La técnica de PCR, brevemente, consistió de una desnaturalización por calor de la doble hebra de ADN (95°C por 5 a 10 min), luego un enfriamiento para permitir que el cebador se una a su secuencia complementaria en el ADN molde (40-68°C durante 20-40 seg), y la posterior elongación de la cadena por la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del

cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. Así se repitieron los ciclos. Los primers utilizados en la PCR fueron:

1. PerEXT5FW: GGGGAGTATTGCTGCCACTT
2. PerEXT3RV: GCACCGAAGAAAAGCACCTG

#### **4.9. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y E109 -*per*12.**

*B. japonicum* E109 se cultivó como se describió en el punto 4.3. La mutante *B. japonicum* E109 -*per* (Clon 12) se cultivó en las mismas condiciones que la cepa salvaje, pero dado que contiene un plásmido con resistencia a gentamicina, el caldo de cultivo y las placas de EMA contenían gentamicina en una concentración final de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  para mantener la presión de selección. Para evaluar el comportamiento de la mutante -*per*12 frente a la cepa salvaje E109, se procedió a evaluar la capacidad de catabolizar AIA en sistemas controlados. Una vez crecidas ambas cepas hasta principios de la fase exponencial, se tomaron 50 ml de cultivo y se centrifugó. Los sobrenadantes de cada una de las cepas se fraccionaron en tubos de borosilicato estériles un total de 6 tubos. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos fueron:

1. Sobrenadante de E109 con 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA.
2. Sobrenadante de E109 -*per*12 con 10  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA.

La incubación fue idéntica a las antes mencionadas y se tomaron muestras cada 2 h hasta final del ensayo, donde se evaluó en cada punto la concentración de AIA.

Además, se evaluaron concentraciones crecientes de AIA razón por lo cual se utilizó un solución más concentrada de 1  $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$  con el fin de adicionar menor volumen de la hormona. Las concentraciones finales utilizadas fueron de 20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ , 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  y 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### **4.11. Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos de *B. japonicum* E109 y E109 -*per*12.**

Consecuentemente a los experimentos antes descritos, se quiso evaluar el comportamiento de la cepa salvaje y la mutante en los cultivos, dado que hasta el momento solo se había evaluado en los sobrenadante de ambas. E109 se cultivó como se describió en el punto 4.3. La mutante *B. japonicum* E109 -*per*12 se cultivó en las mismas condiciones que la cepa salvaje más la adición de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de gentamicina. Una vez crecidas ambas cepas hasta principios de la fase exponencial, se evaluó el comportamiento catabólico de ambos cultivos puros. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos fueron:

1. Cultivo de E109 con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA.
2. Cultivo de E109 *-per12* con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA.
3. Medio de cultivo EMA con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA

Al igual que en las evaluaciones de catabolismo anteriores, los tubos se colocaron en las mismas condiciones y se evaluaron del mismo modo.

Hasta aquí se describieron los métodos para evaluar si la enzima peroxidasa era responsable del catabolismo del ácido indol-3-acético. Según los datos obtenidos, quisimos probar si la molécula responsable de dicha actividad opera de manera constitutiva.

#### **4.12. Evaluación del catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109, con doble inducción de AIA.**

Ambas bacterias, E109 como *Bradyrhizobium elkanii* 5019, se cultivaron de la misma manera como se mencionó con anterioridad hasta llegar a fase exponencial. Se utilizó la cepa 5019 porque esta tiene la capacidad de sintetizar AIA pero es incapaz de catabolizarlo, motivo por el cual se usa como control. En un tubo cónico estéril se tomaron 50 ml de cada uno de los cultivos y se centrifugó, como se describió previamente. Cuando se obtuvo el sobrenadante, y con el cultivo disponible se tomaron alícuotas de 10 ml en tubos estériles. Los tratamientos fueron:

1. Cultivo de E109 con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA.
2. Cultivo de E109 con agua destilada estéril.
3. Sobrenadante de E109 con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA.
4. Sobrenadante de E109 desnaturalizado con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA.
5. Cultivo de 5019 con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA.
6. Cultivo 5019 con agua destilada estéril.
7. Medio de cultivo EMA con 40  $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$  de AIA.

La desnaturalización se llevó a cabo como se describió previamente. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tubos se incubaron como se describió en los ensayos previos durante 10 h consecutivas para la degradación total de AIA en los tratamientos afines a la degradación. Luego de la incubación, de cada tratamiento y de cada tubo se tomó una alícuota para medir crecimiento ( $\text{DO}_{595}$ ) y cuantificación de AIA, como también se hicieron controles de pureza y recuento de microorganismos. Los tratamientos de cultivos denominados 1, 2, 5 y 6, se centrifugaron, se tomaron alícuotas de 5 ml y se colocaron en tubos de ensayo estériles y se procedió a hacer la segunda inducción (adición de AIA en los tratamientos 1, 2, 5 y 6). Los tratamientos se

incubaron, en las mismas condiciones, tomando muestras cada 2 h hasta el final del ensayo para la cuantificación de AIA en cada tratamiento.

El siguiente procedimiento se realizó para dilucidar si el catabolismo del AIA acompaña al crecimiento de la bacteria, analizando cultivos en diferentes fases de crecimiento.

#### **4.13. Efecto del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 en diferentes fases de crecimiento.**

*B. japonicum* E109 se cultivó de la misma manera como se mencionó con anterioridad hasta llegar a fase exponencial  $DO_{595} \approx 0,6$ . Luego se obtuvieron los sobrenadantes y se realizó los siguientes tratamientos por triplicado para cada condición experimental, considerando dos concentraciones diferentes de AIA:

1. Sobrenadante de E109 con  $30 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de AIA.
2. Sobrenadante de E109 con  $15 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$  de AIA.

El cultivo de E109 se incubó hasta alcanzar la fase exponencial ( $DO_{595} \approx 1,1-1,3$ ). Se hicieron controles de pureza y recuento, el cultivo se centrifugó, como se describió previamente y se realizó el mismo tratamiento experimental en esta fase de crecimiento. Los tubos inducidos de ambos estadios de crecimiento del cultivo se llevaron a agitación a 180 rpm a 30°C, y se tomaron muestras cada 2 h hasta final del ensayo, donde se evaluó en cada punto la concentración de AIA.

El siguiente procedimiento se realizó para determinar si en el genoma de E109 se encuentran disponibles secuencias codificantes correspondientes a un cluster de genes implicados en la degradación de AIA de manera asimilativa como fuente de carbono y energía (Leveau and Gerards 2008).

#### **4.14. Búsqueda bioinformática de alineaciones en el genoma de *B. japonicum* E109 de secuencias codificantes implicados en el catabolismo de AIA.**

Para la búsqueda de los genes *iac* en E109 se utilizó la base de datos NCBI. Se utilizó la cepa modelo *P. putida* 1290, debido a que es la cepa de referencia. El procedimiento de manera generalizada fue el siguiente:

1. Búsqueda de los genes *iac* en NCBI-Protein (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>)
2. Obtención de la secuencias FASTA de las proteínas *iac*
3. Búsqueda de la proteína a través de blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) en el genoma de E109



#### 4. Análisis de las secuencias obtenidas

A las búsquedas de similitud en el genoma de E109 también se agregó el microorganismo *Herbaspirillum seropedicae* SmR1, ya que esta bacteria tiene la capacidad de catabolizar AIA mediante el cluster de genes *iac*. A partir de los resultados obtenidos mediante el análisis bioinformático, se procedió a evaluar si E109 tiene la capacidad de asimilar AIA como única fuente de C y N para su crecimiento.

##### 4.15. Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en cultivo de *B. japonicum* E109.

Se obtuvo un cultivo de E109 con una  $DO_{595} \approx 1$ , se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó 10 min a 10000 rpm y se resuspendió la bacteria en medio EMA (Vincent 1970) como control, como así también el mismo medio de cultivo modificado en la fuente de carbono como por ejemplo EMA disminuyendo el contenido de manitol y reemplazando el extracto de levadura (dado que ambos aportan carbono al medio) por glutamato, y en la otra formulación se reemplaza ambos componentes del medio original por AIA y glutamato. Se tomó de cada medio 25  $\mu$ l y se inoculó en tubos de borosilicato conteniendo 5 ml de caldo de cultivo EMA con sus correspondientes composiciones. Los tubos se incubaron en estufa a 30°C y con una agitación de 180 rpm hasta alcanzar una  $DO_{595} \approx 0,6$  (aproximadamente 72 h). Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. Cultivo de E109 en medio EMA.
2. Cultivo de E109 en medio EMA-Glutamato-AIA.

Los tratamientos luego se incubaron 96 hs bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Se evaluaron los mismos parámetros que para los anteriores experimentos. Según los resultados obtenidos del análisis bioinformático obtenido del genoma de E109, se probó el catabolismo de AIA en *B. japonicum* con una mutación en el gen *iacA*, que sería el gen responsable de iniciar la actividad de la degradación de la hormona.

##### 4.16. Evaluación del catabolismo de AIA en *B. japonicum* cepa E109, 110 sp4 y 8620.

Para hacer una evaluación rápida, se realizó un análisis filogenético utilizando bases de datos de búsquedas de homología indicando que *iacA* (acil-CoA deshidrogenasa) está estrechamente relacionada con *idoA* de *Pseudomonas alcaligenes* PA-10 y el gen *nrgC* de *B. japonicum* 110 (Alemayehu et al. 2004). El producto del gen, *nrgC*, se menciona en varios estudios como que está regulada por el regulador de la fijación de nitrógeno NifA (Nienaber et al. 2000). Gracias a la colaboración del Dr. Hans-Martin Fischer pudimos evaluar el

comportamiento de la cepa con la mutación en el homólogo del gen *iacA* en el catabolismo de AIA. *B. japonicum* cepa 110 *spc4* fue mutado en el gen *nrgC* y se denominó *B. japonicum* 8620 (Nienaber et al. 2000). Se cultivó en las mismas condiciones que la cepa E109, más el agregado de 100  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de espectinomicina y kanamicina. Para el ensayo se utilizó además la cepa salvaje *B. japonicum* cepa 110 *spc4*, y las tres cepas se cultivaron como se describió en el punto 4.3. Una vez que las cepas llegaron a la fase exponencial, se fraccionaron los cultivos en tubos de borosilicato estériles, un total de 9 tubos. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos fueron:

1. Cultivo de *B. japonicum* E109 con 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA.
2. Cultivo de *B. japonicum* 110 *spc4* con 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA.
3. Cultivo de *B. japonicum* 8620 con 30  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA.

Los tubos se incubaron a 180 rpm a 30°C, y se tomaron muestras cada 2 h hasta final del ensayo, donde se evaluó en cada punto la concentración de AIA.

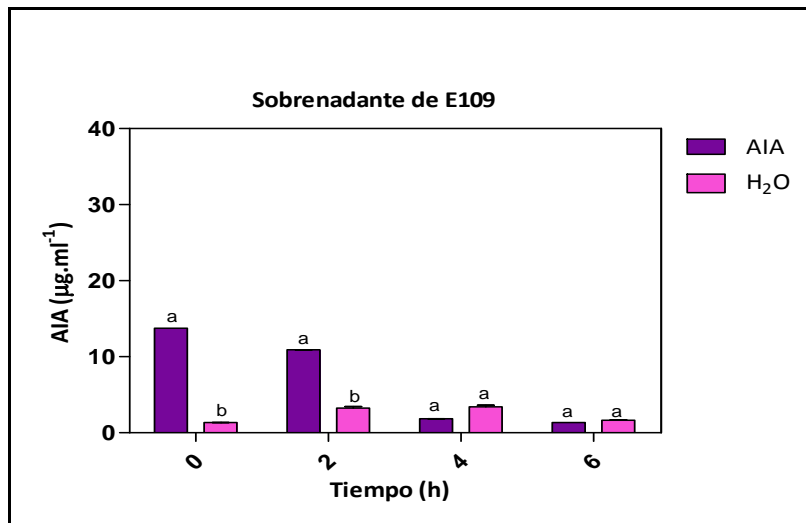
#### 4.17. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó a través del software *InfoStat*, versión 2008, Grupo InfoStat. (Di Rienzo et al. 2008).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Evaluación del catabolismo en sobrenadantes de *B. japonicum* E109.

En ensayos previos en nuestro laboratorio, pudimos observar que se producía una reducción del 50% en la concentración de AIA añadida a E109, y como la desaparición de la hormona ocurrió en un tiempo considerablemente rápido podemos suponer que el mecanismo catabólico es pre-existente a la adición de la hormona en el medio de cultivo y de carácter enzimático (Torres et al. 2014). Con esta idea de trabajo probamos con el sobrenadante del cultivo de E109. Los resultados se detallan a continuación:



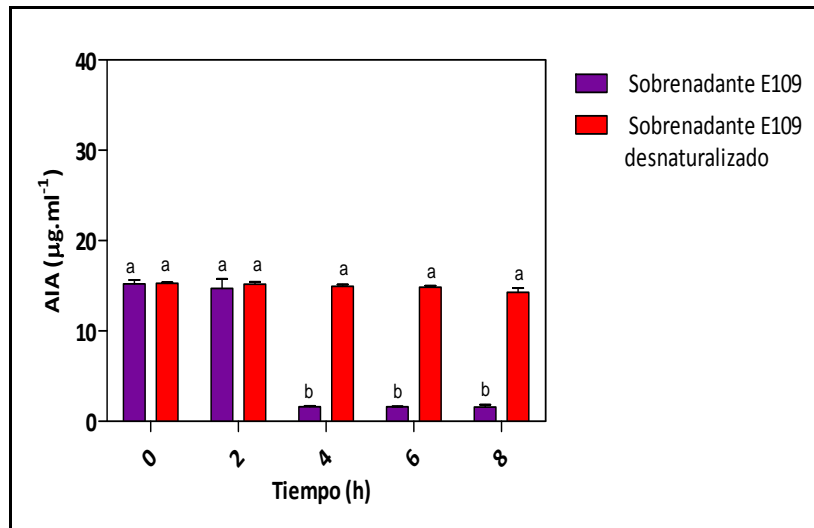
**Figura 5.** Sobrenadante de *B. japonicum* E109, modificado por la adición exógena de 10 µg.ml<sup>-1</sup> de AIA en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas mediante por el test de Tukey con un p <0,05.

En la **Figura 5** se puede observar que el AIA cuando se encuentra en contacto con el sobrenadante de E109 disminuye un 90% a las 4 h de la inducción y a las 6 h se observan solo trazas del compuesto mientras que para el tratamiento control no se produjeron cambios. Estos resultados nos hicieron suponer que existía un compuesto producido y liberado por la bacteria al medio de cultivo, el cual sería el responsable de la degradación de AIA en el corto periodo de tiempo.

### 5.2. Evaluación de actividad catabólica del AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 desnaturalizados mediante calor.

Las enzimas son proteínas biológicas que catalizan las reacciones bioquímicas del metabolismo celular. Actúan sobre moléculas específicas, como sustratos y permiten el desarrollo de diversos procesos celulares. La desnaturalización de las enzimas puede realizarse mediante calor, químicos o por clivaje con otras enzimas. Según los datos obtenidos

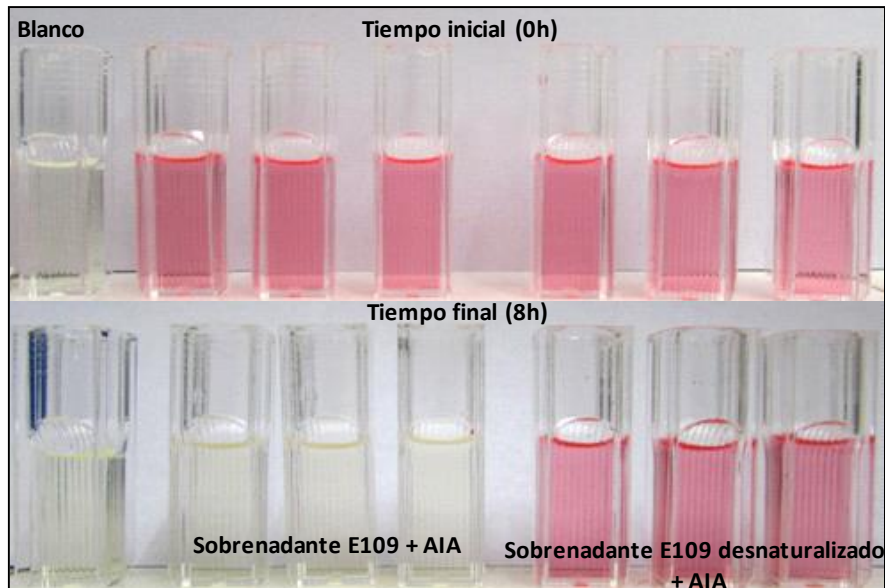
en el primer experimento, pudimos observar que la actividad se encuentra en el sobrenadante del cultivo y mediante este ensayo se evaluó si el agente responsable de catabolizar la fitohormona presente en el sobrenadante de *B. japonicum* E109, pierde actividad cuando el sobrenadante se somete a desnaturalización por calor. Los resultados se muestran a continuación:



**Figura 6.** Contenido de AIA agregado exógenamente ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) empleando sobrenadante y sobrenadante desnaturalizado de *B. japonicum* E109, en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD ( $n=3$ ). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un  $p < 0,05$ .

En la **Figura 6** se puede observar que el contenido de AIA a las 4 horas disminuye un 90% en el tratamiento del sobrenadante de E109, y a las 24 h ya no hay trazas del compuesto (datos no mostrados). Para el tratamiento con el sobrenadante de E109 desnaturalizado, los niveles de AIA se mantienen constantes en el tiempo. Esto hace suponer que el componente que es producido y excretado al medio por la cepa E109 presentaría carácter enzimático dado que es inactivado por el calor, y como consecuencia pierde la capacidad de degradar la hormona.

A continuación en la **Figura 7** se muestra a modo ilustrativo las reacciones llevadas a cabo bajo el tratamiento de desnaturalización sobre el sobrenadante de E109.



**Figura 7.** Reacción de Salkowski mostrando la coloración de AIA a tiempo inicial y tiempo final en tratamientos con sobrenadante y sobrenadante desnaturalizado de *B. japonicum* E109.

Para continuar con la investigación acerca de la actividad catabólica de AIA en *B. japonicum* E109, se buscó una posible enzima responsable de tal actividad. Según los reportes de otros autores y de la presencia de secuencias codificantes para la enzima peroxidasa en el genoma de E109 se probó con los siguientes experimentos.

### 5.3. Detección de actividad peroxidasa en sobrenadantes de E109.

A través de este ensayo se intentó determinar si en los sobrenadantes de *B. japonicum* E109 era posible comprobar la actividad de una posible enzima del tipo peroxidasa. Teniendo en cuenta que en la bibliografía no encontramos protocolos para la determinación de la actividad peroxidasa en bacterias PGPR, se usó como protocolo base un método para evaluar la cinética de la actividad de peroxidasa presentes en extractos vegetales, empleando *o*-dianisidina como sustrato.

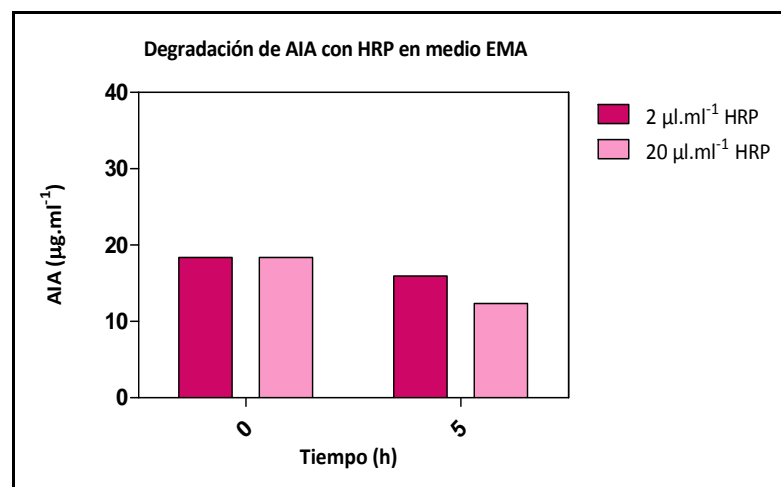
Al evaluar la actividad peroxidasa en sobrenadante de E109 en las condiciones descritas en el punto 4.5, no fue posible detectar dicha actividad, por lo que decidimos concentrar el sobrenadante por liofilización y utilizar cultivo de E109, por si la cantidad de enzima secretada fuese escasa y esa pudiera ser la razón de la nula actividad observada. Sin embargo, con estas variantes y modificando parámetros como el volumen de muestra (de 100 a 500  $\mu$ l), el pH de la mezcla de reacción (pH 5 y 7) empleando diferentes buffers y el aumento del tiempo de incubación, no fue posible la detección de actividad peroxidasa (datos no mostrados). En base a los resultados obtenidos, se utilizó isopropanol como sustrato para la detección de peroxidasa, dado que es utilizado para la determinación de esta enzima en

*Pseudomonas* (Kalyani et al. 2001). Sin embargo, la cepa E109 tampoco mostró actividad peroxidasa en estas condiciones.

Como lo hemos mencionado previamente, detectamos la presencia de dos secuencias codificantes para enzimas del tipo peroxidasa en el análisis funcional del genoma de E109, pero bajo las condiciones evaluadas en estos ensayos preliminares no pudimos cuantificar actividad biológica del tipo peroxidasa, motivo por el cual decidimos utilizar una nueva estrategia que se detalla a continuación.

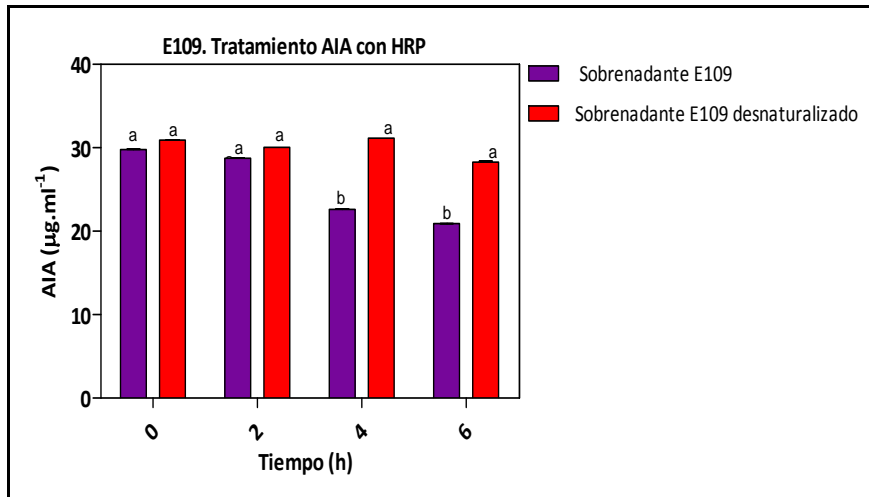
#### 5.4. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 modificados con la adición exógena de peroxidasa de rábano picante (HRP).

Existen reportes que demuestran que enzimas del tipo peroxidasa podrían ser responsables del catabolismo de AIA en células vegetales (Savitsky et al. 1999; Mathesius, 2001), por ello quisimos evaluar si la adición de peroxidasa modificaba la velocidad de degradación de AIA en sobrenadante de *B. japonicum* E109. En primera instancia se realizó un control de la mezcla de reacción empleando dos isoenzimas de peroxidasa vegetales, una extraída de raíces transformadas de nabo denominada Extracto Crudo de Nabo (ECN) y una peroxidasa comercial (HRP). Se determinó que el ECN presentó 14.150 U/ml de actividad peroxidasa, mientras que la HRP mostró valores superiores (47.350 U/ml). Estos valores nos permitieron corroborar que las condiciones de medida de cinética enzimática fuesen apropiadas y decidir que la HRP era la más adecuada para evaluar el catabolismo de AIA. En primera instancia se llevó a cabo una estandarización con dos concentraciones diferentes de HRP, en medio de cultivo EMA con la adición de AIA y se midió en función del tiempo. En la Figura 8 se muestran tales resultados.



**Figura 8.** Contenido de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en medio EMA (Vincent, 1970) con el agregado de dos concentraciones de HRP (2 y 20  $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y AIA (20  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}$ ) agregado exógenamente.

A partir de los resultados obtenidos en la **Figura 8**, pudimos observar que 20  $\mu\text{l}$  de HRP tiene más actividad de degradación de AIA comparadas con el tratamiento de 2  $\mu\text{l}$ , razón por la cual se decidió trabajar con esta concentración en sobrenadante de E109. A continuación, en la figura 9, se muestran los valores obtenidos.

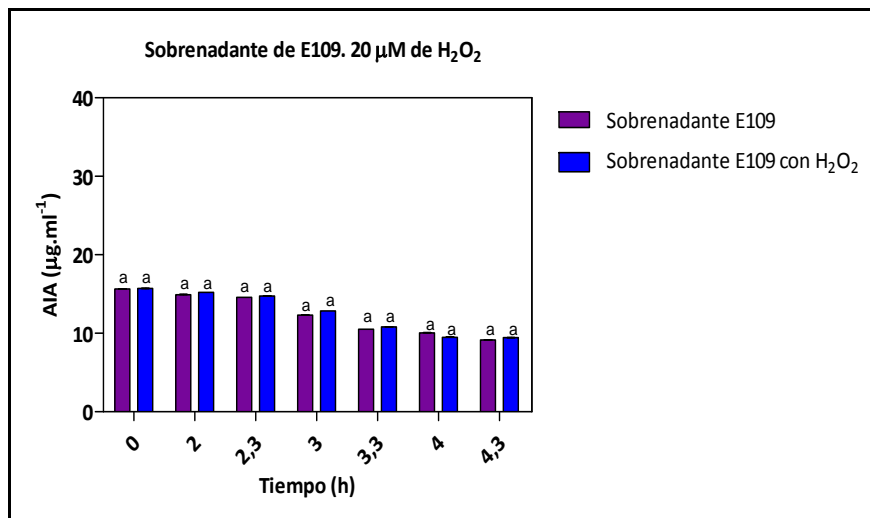


**Figura 9.** Contenido de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en sobrenadantes de E109 modificados por la adición exógena de AIA ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y HRP ( $20 \mu\text{l}$ ). Las barras representan el promedio y su SD ( $n=3$ ). Las letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un  $p < 0,05$ .

En la **Figura 9** se observa que en el sobrenadante de E109, hubo una disminución del 30% aproximadamente de la concentración de la hormona luego de las 6 h. Este valor coincide con el porcentaje de degradación que se muestra en la **Figura 8**. En ensayos donde se adiciona la misma concentración de AIA a sobrenadantes de E109 (datos no mostrados) podemos observar un 70% de degradación de la hormona en el mismo tiempo, con lo que estaríamos en condiciones de decir que la presencia de HRP exógena no influye considerablemente en la velocidad de degradación de AIA. En cuanto al sobrenadante desnaturalizado de E109, lo esperado era que la adición de HRP hiciera posible la degradación de AIA, aun cuando el agente biológico implicado perdiera su actividad por la desnaturalización. En su lugar podemos ver que la concentración de AIA se mantiene constante a lo largo del tiempo con respecto a la concentración inicial aunque hubo una disminución de la concentración de la hormona pero no significativa luego de las 5 h.

### 5.5. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 modificados con la adición exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

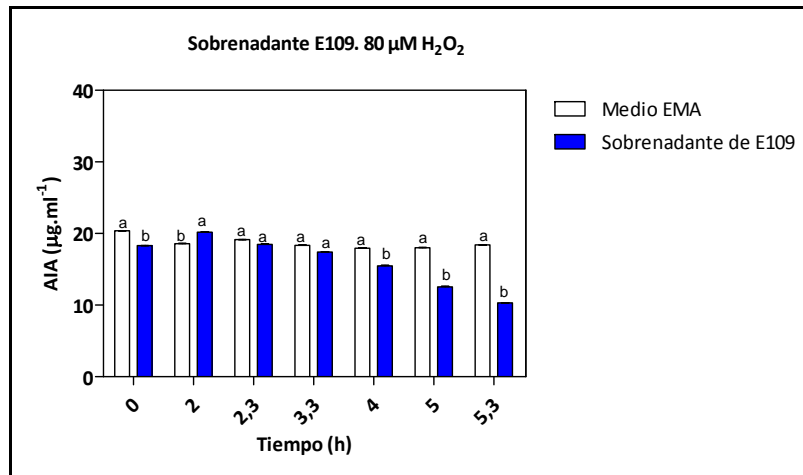
En los experimentos presentados a continuación, evaluamos la adición de dos concentraciones no letales de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.02 y 0.08 mM) a sobrenadantes obtenidos de E109, con el objetivo de comprobar si el agregado adicional de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> incrementa la velocidad de degradación de AIA, suponiendo que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno de la bacteria no estaría en cantidad necesaria para ser empleado por la peroxidasa, ya que es el sustrato de la enzima. A continuación en la Figura 10, se muestra uno de los resultados.



**Figura 10.** Concentración de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 modificados por la adición exógena de AIA ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y  $20 \mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Las barras representan el promedio y su SD (n=2). Letras diferentes representan diferencias significativas por test de de Tukey con un  $p < 0,05$ .

En la **Figura 10** se puede observar que no hay diferencias significativas entre el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $20 \mu\text{M}$ ) y el tratamiento control, es decir no se observa un aumento o retraso en la velocidad de degradación de AIA. A continuación, en la Figura 11, se muestra el catabolismo de AIA cuando se aumentó la concentración de peróxido y AIA a un medio sin inocular y al sobrenadante de E109.





**Figura 11.** Concentración de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y medio EMA sin inocular, modificados por la adición exógena de AIA ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) y  $80 \mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Las barras representan el promedio y su SD ( $n=2$ ). Las letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un  $p < 0,05$ .

Como se puede observar en la **Figura 11**, la concentración de AIA en el tratamiento control, se mantuvo constante hasta el final del experimento indicando que el peróxido no sería capaz de degradar *per se* la hormona en estas condiciones experimentales. En el caso del sobrenadante de E109 con  $\text{H}_2\text{O}_2$ , la concentración de AIA se degradó un 50% en las primeras 5 h. Estos resultados sugieren que al no observarse considerables cambios en la degradación de AIA, podrían no ser las peroxidasas dependientes de  $\text{H}_2\text{O}_2$  las enzimas implicadas y ser otras oxidasas no dependientes de este sustrato que participen del catabolismo de la hormona.

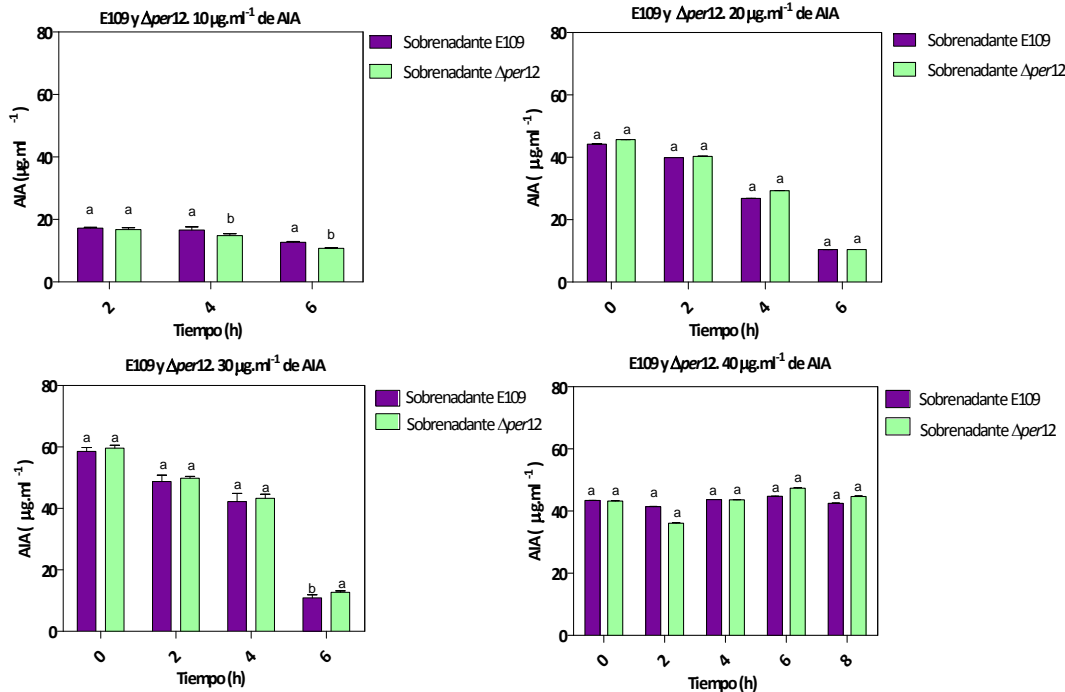
### 5.6. Construcción de una mutante $\Delta\text{per}$ de *B. japonicum* E109.

Se llevó a cabo una mutación con delección en el gen que codifica para una peroxidasa (EC.1.11.1.7) ubicada en la [fig|375.26.pcg.5242](#) del genoma de E109. Como resultado del proceso de mutagénesis se obtuvieron cuatro clones de la mutante ( $\Delta\text{per}$ ) de *B. japonicum* E109, denominados clones *-per 8*, *-per 9*, *-per 10* y *-per 12*.

Se realizaron ensayos de *screening* de los cuatro clones de *B. japonicum* E109 *-per* y debido a que todos tuvieron un comportamiento similar entre sí, se seleccionó el clon *-per12* para los ensayos detallados a continuación.

**5.7. Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109-*per12*.**

A continuación se muestra la degradación de AIA de la bacteria E109 en comparación con la cepa mutante *-per12*.



**Figura 12.** Concentración de AIA (μg.ml<sup>-1</sup>) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y la mutante E109 - *per12*, modificados por la adición exógena de 10, 20, 30 y 40 μg.ml<sup>-1</sup> de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un p < 0,05.

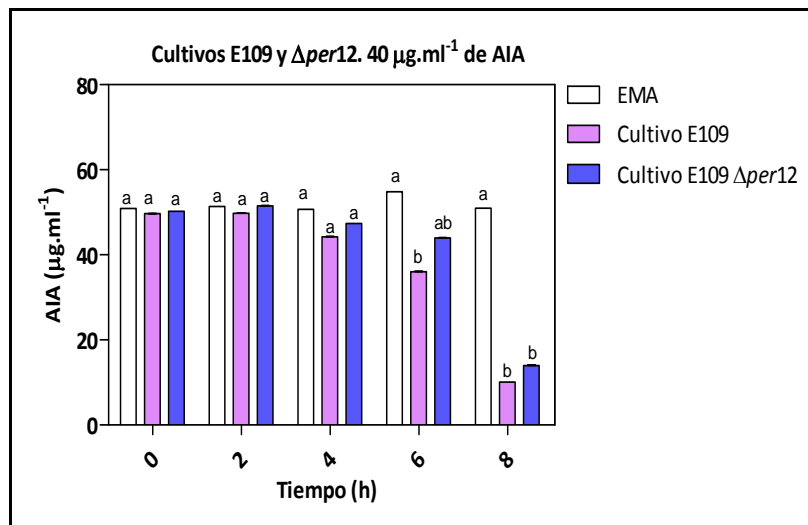
En la **Figura 12** se puede observar que ambas cepas fueron capaces de degradar AIA. En este ensayo se evaluaron los sobrenadantes, debido a que en experimentos anteriores se comprobó que en tales fracciones se obtenía actividad catalítica sobre la hormona. La mutante demostró que aun deficiente en la enzima peroxidasa, es capaz de catabolizar la hormona en el sobrenadante de cultivos bacterianos. Como se observó una tendencia catabólica positiva luego de 6 horas de incubación, en el gráfico con la concentración de 10 μg.ml<sup>-1</sup> de AIA, desde el agregado de la hormona a favor del mutante y aún teniendo en cuenta que este resultado era absolutamente opuesto al esperado, decidimos aumentar la concentración de AIA adicionada para verificar si la capacidad catabólica del mutante era mayor que la cepa salvaje.

En los gráficos de 20 y 30 μg.ml<sup>-1</sup> de AIA adicionado, ambos microorganismos tuvieron un comportamiento similar en relación a la velocidad con la que ocurrió este proceso, aunque el contenido de la hormona fue menor pero sin diferencias significativas en el sobrenadante

de E109 comparado con E109-*per12* tanto a las 4 h como a las 6 h del ensayo. Otro resultado inesperado de este experimento se observó en el gráfico de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA en cuyo caso no se observó degradación de la hormona luego de 8 h post-inducción en ninguno de los dos tratamientos evaluados. Esto despertó nuestra curiosidad en saber qué es lo que ocurriría más allá de las 8 h. Entonces se repitió el ensayo dejándolo hasta ver la desaparición de la hormona observándose que los sobrenadantes de E109 y E109 -*per12* con  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA tardaron al menos 48 h en degradar el 90% de la hormona adicionada exógenamente (datos no mostrados).

### 5.9. Evaluación del catabolismo de AIA empleando células puras de *B. japonicum* E109 y E109-*per*.

Según el último experimento del punto 5.8, se puso observar que el catabolismo de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA en sobrenadante de E109 y -*per*, no se produjo hasta las 48 horas luego de la inducción con la hormona por lo que en el próximo experimento decidimos evaluar la misma concentración de la hormona pero utilizando el cultivo puro de cada cepa.



**Figura 13.** Concentración de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y la mutante  $\Delta\text{per}$ , modificados por la adición exógena de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA. Las barras representan el promedio y su el SD ( $n=3$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un  $p < 0,05$ .

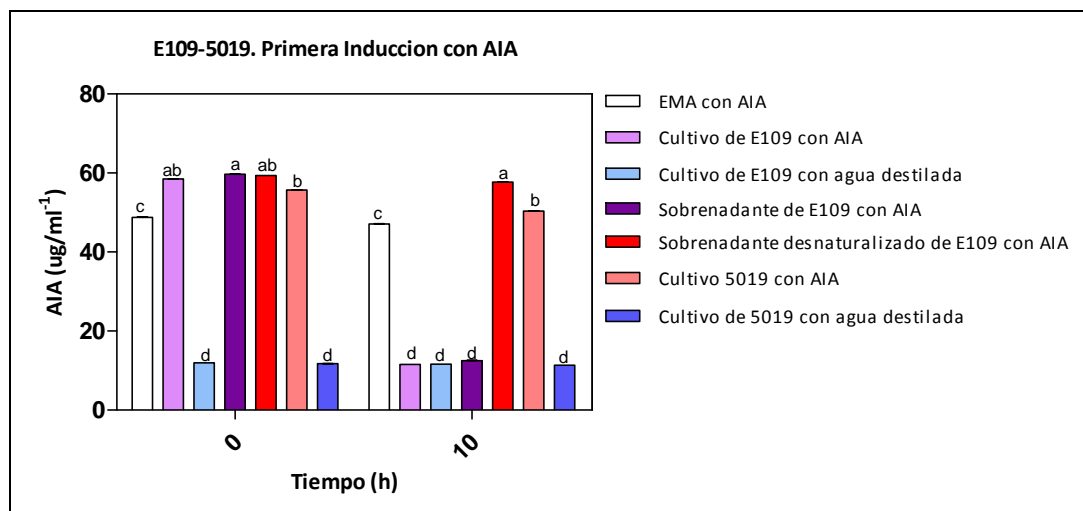
En la **Figura 13** se puede observar que en ambos cultivos, E109 y la mutante  $\Delta\text{per12}$ , ocurre la degradación de la hormona a las 8 h de de la inducción en un 90% para E109 y un 80% aproximadamente para  $\Delta\text{per12}$ . Aunque, sin diferencias significativas, sería mayor la velocidad de degradación de la cepa salvaje en comparación con la mutante. En base a estos resultados y bajo las condiciones evaluadas se podría pensar que la degradación de AIA estaría

dada por algún compuesto que se encuentra en las células bacterianas y que no se encuentra en cantidad suficiente en los sobrenadantes para degradar el AIA en 8 como ocurre con los cultivos.

El siguiente experimento muestra el catabolismo de AIA de E109, con una segunda inducción luego de 8 h de degradación de la hormona con el objetivo de observar si la posible acumulación de los compuestos responsables son capaces de degradar el agregado exógeno de AIA en el sobrenadante de la bacteria.

### 5.10. Evaluación del catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109, con doble inducción de AIA.

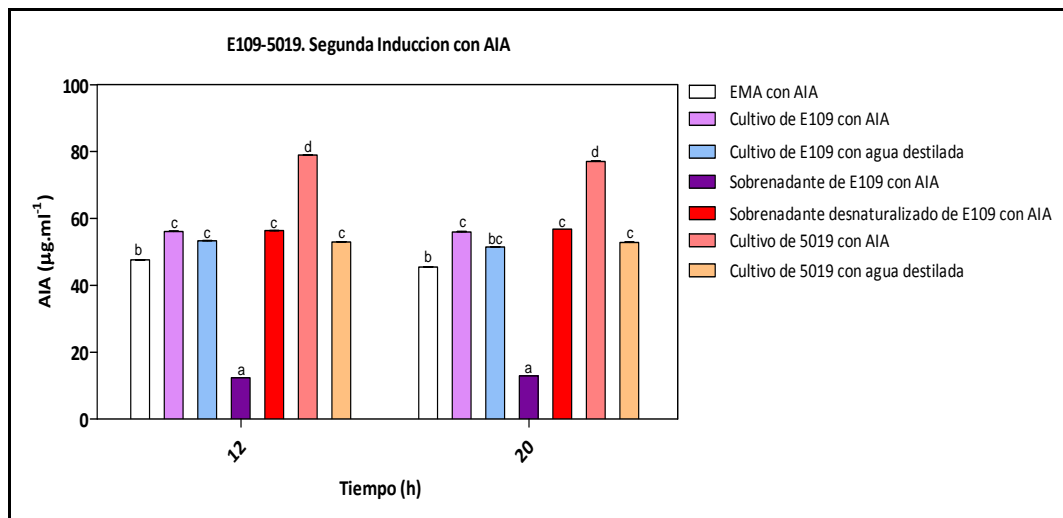
A continuación se muestra la **Figura 15** donde se grafican los resultados de la primera inducción de AIA, luego de 10 h de incubación. Se utilizó como control positivo la cepa *B. elkanii* 5019 ya que esta es capaz de producir AIA pero no de degradarlo.



**Figura 14.** Concentración de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en cultivos y sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y cultivos de *B. elkanii* 5019, modificados por la adición exógena de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ( $n=3$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un  $p < 0,05$ .

En la **Figura 14** podemos observar que tanto el cultivo como el sobrenadante de E109 se comportaron acorde a los resultados reportados previamente, dado que degradaron el 90% del AIA exógeno. El sobrenadante desnaturalizado mantuvo constante el contenido de la fitohormona, mostrando una vez más que con calor se inactiva el o los componentes responsables de la degradación de AIA. En cuanto al cultivo y sobrenadante de la cepa 5019 se mantuvieron constantes los valores de la hormona. Luego de esta primera inducción se

procedió a realizar una segunda inducción con AIA en los sobrenadantes de todos los tratamientos.



**Figura 15.** Concentración de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y *B. elkanii* 5019, modificados por la adición exógena de  $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ( $n=3$ ). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un  $p<0,05$ .

En la **Figura 15** se puede observar que en una segunda inducción con AIA las células de E109 no fueron capaces de degradar el AIA agregado exógenamente. Para el caso de los demás tratamientos, se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo. Una de las posibles explicación a este fenómeno, es que durante la primer inducción la o las molécula/s responsables de la degradación de la hormona catabolizan la fitohormona y que luego ya no estarían disponibles para degradar el AIA agregado durante la segunda inducción como consecuencia de una posible saturación. Esto despierta nuestro interés en seguir investigando sobre el comportamiento del catabolismo de AIA en diferentes fases del crecimiento de E109, teniendo como base la hipótesis de que habría un comportamiento diferencial frente a la degradación.

**5.11. Efecto del catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109 en fases de crecimiento.**

A continuación se muestra la curva de crecimiento de E109, donde se observan las diferentes fases del cultivo donde se tomaron las muestras para los ensayos a continuación (Figura 17).

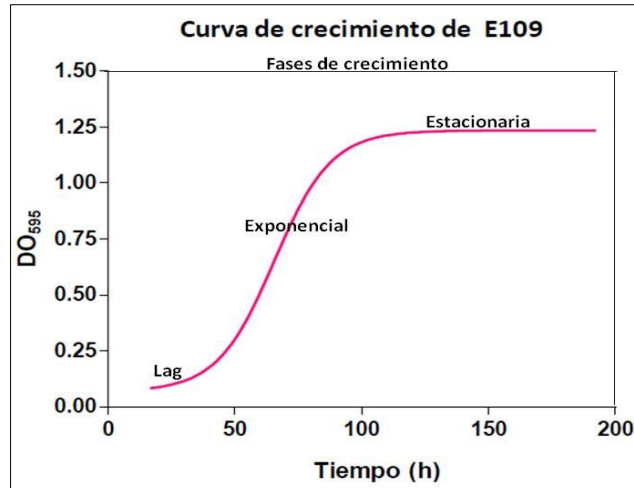


Figura 16. Curva de crecimiento de *B. japonicum* E109 expresada en crecimiento (DO<sub>595</sub>) vs tiempo (h).

En base a los resultados mostrados, la o las molécula/s responsables de degradar el AIA se excreta al medio de cultivo, razón por la cual evaluamos la degradación en dos estadios del crecimiento de E109, para determinar si el o los agente/s responsable/s de la degradación de la hormona acompañan al crecimiento de la bacteria. A continuación se muestra la degradación de 15 µg.ml<sup>-1</sup> de AIA en fase exponencial y estacionaria de E109.

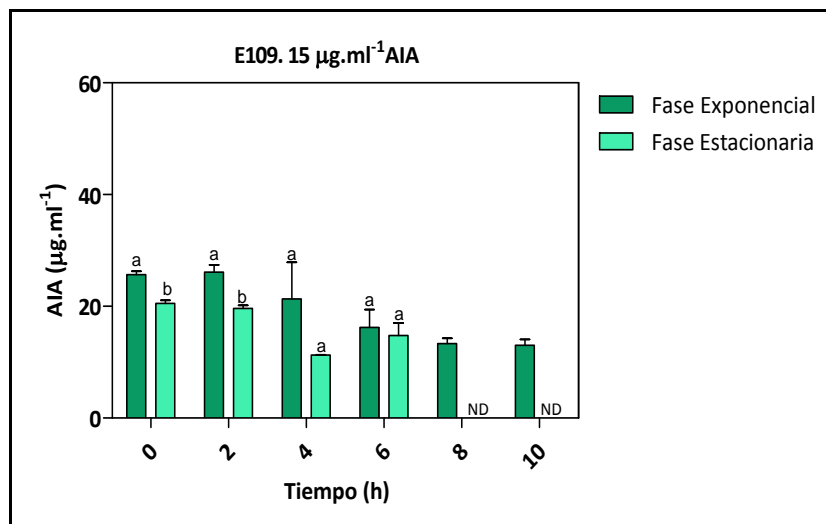
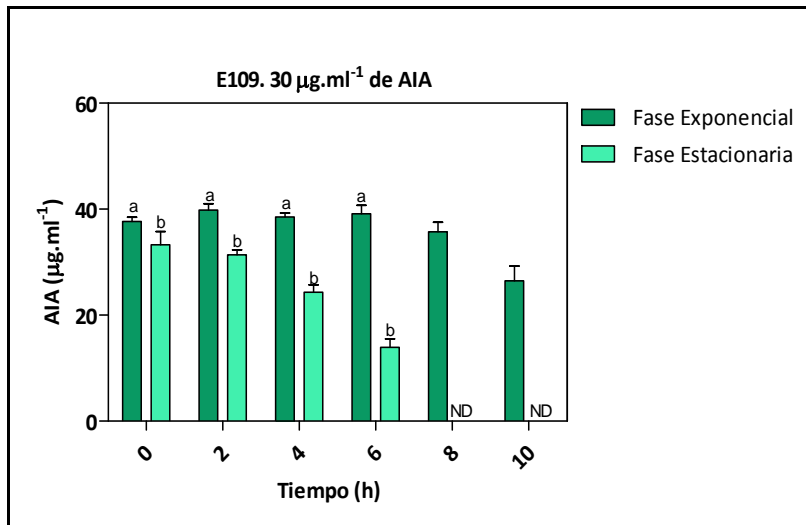


Figura 17. Concentración de AIA (µg.ml<sup>-1</sup>) en sobrenadantes en fase exponencial y estacionaria de *B. japonicum* E109 con la adición exógena de 15 µg.ml<sup>-1</sup> de AIA. Las barras representan el promedio y su SD (n=3) y ND (no detectable). Letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un p<0,05.

En la Figura 17 se puede observar que la degradación de AIA hasta la 6 h post-inducción no mostró diferencias significativas entre ambos sobrenadantes. Luego de las 8 h el

sobrenadante de fase estacionaria degrada el 100% de la hormona, mientras que el sobrenadante de fase exponencial degradó el 50% del AIA en 10 h.



**Figura 18.** Concentración de AIA ( $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) en sobrenadantes en fase exponencial y estacionaria de *B. japonicum* E109 por la adición exógena de  $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD ( $n=3$ ) y ND (no detectable). Letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un  $p<0,05$ .

En la **Figura 18** se puede observar que en el sobrenadante de fase exponencial, la degradación de la hormona fue más lenta, ya que luego de las 10 h solo se degradó el 20% de la hormona, mientras que empleando el sobrenadante de células en fase estacionaria se degrada la totalidad del AIA en 8 h. Según los datos expresados, podemos observar que el o los componentes responsables de la degradación de AIA acompañan el crecimiento de E109 y que pueden degradar mayor cantidad de AIA exógeno cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria.

Según los experimentos realizados pudimos observar que la mutación en la enzima peroxidasa de la cepa E109, no produjo cambios en la actividad de degradación de AIA con lo cual podemos inferir que no sería la enzima responsable de tal actividad. Frente a este desafío, se hizo un búsqueda bioinformática en el genoma de E109 publicado por Torres et al. (2014) de las enzimas reportadas como responsables del catabolismo de AIA en otros microorganismo (Marianne et al. 1996; Johan and Gerards 2008). A continuación se presentan los resultados de la búsqueda.

### 5.12. Búsqueda bioinformática en el genoma de *B. japonicum* E109 de secuencias codificantes implicados en el catabolismo de AIA.

Según la investigación de Olesen and Jochimsen (1996) reportaron que dos de las enzimas responsables del catabolismo de AIA hasta ácido antranílico serían la isatina reductasa que reduce el dioxindol a isatina, y este compuesto se convierte a ácido isatínico por acción de la isatina amidohidrolasa. Previamente Egebo et al. (1991) sugirieron que la molécula de AIA se degradaría por una abertura oxidativa del anillo de indol en una reacción análoga a la catalizada por la triptófano 2,3-dioxigenasa. Se realizó la búsqueda de estas enzimas en el genoma de E109 a través de la base de datos NCBI y no hubo secuencias homólogas, como así tampoco en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA110 (datos no mostrados). Dado los resultados obtenidos, se procedió a buscar las secuencias codificantes del cluster compuesto por 10 genes reportados para *P. putida* 1290, dado que *B. diazoefficiens* USDA110 posee una secuencia con alta homología para *iacA* (Leveau and Gerards 2008). A continuación se detallan los resultados del análisis bioinformático en NCBI utilizando la herramienta p-BLAST en el genoma de *B. japonicum* E109. También se realizó el mismo análisis en *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 porque esta bacteria tiene la capacidad de catabolizar el AIA, pero como fuente de C y N.

**Tabla 2.** Secuencias codificantes del cluster *iac* en E109 y *Herbaspirillum seropedicae* SmR1.

Microorganismo	Proteína Identificada	Score	E-value	% ID
<b><i>iacA</i>: Acil-CoA deshidrogenasa</b>				
E109	Proteína pigmento	370	E-127	51%
SmR1	Acil-CoA deshidrogenasa	385	5,00E-132	53%
<b><i>iacB</i>: Proteína hipotética conservada</b>				
E109	Dolicol-fosfato manosiltransferasa	27	0,7	36%
SmR1	Proteína hipotética conservada	146	3,00E-46	58%
<b><i>iacC</i>: Dioxigenasa hidroxilante anillo aromático, subunidad <math>\alpha</math></b>				
E109	3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad $\alpha$	149	4,00E-41	40%
SmR1	Fenilpropionato dioxigenasa subunidad de proteína terminal	539	0	64%
<b><i>iacD</i>: Dioxigenasa hidroxilante anillo aromático, subunidad <math>\beta</math></b>				
E109	3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad $\beta$	65	1,00E-14	27%
SmR1	Proteína de la subunidad pequeña dioxigenasa fenilpropionato	128	4,00E-38	41%



<b><i>iacE</i>: Deshidrogenasa de cadena corta</b>				
E109	3-oxoacyl- (acil-proteína portadora) reductasa	137	1,00E-40	33%
SmR1	3-oxoacyl- (acil-proteína portadora)reductasa	254	1,00E-84	51%
<b><i>iacF</i>: Ferredoxina. Reductasa componente de vanillato-O-demetilasa</b>				
E109	Flavodoxina reductasa vanillato-O-demetilasa	212	9,00E-68	39%
SmR1	Flavodoxina reductasa	259	8,00E-85	45%
<b><i>iacG</i>: Flavin proteína de dominio reductasa, unido FMN</b>				
E109	4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa, reductasa	115	1,00E-33	36%
SmR1	4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa, cadena pequeña	153	2,00E-47	49%
<b><i>iacR</i>: Regulador transcripcional, familia MarR</b>				
E109	Regulador transcripcional Familia MarR	49	4,00E-08	28%
SmR1	Proteína reguladora transcripcional	40	2,00E-05	32%
<b><i>iacH</i>: Glu-tRNA amidotransferasa/amidasa</b>				
E109	Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln amidotransferasa	137	3,00E-37	32%
SmR1	Proteína de la familia amidasa	252	2,00E-80	52%
<b><i>iacI</i>: Proteína hipotética conservada</b>				
E109	Espermidina tipo ABC/Sistema de transporte putrescina, permeasa	27	0,7	36%
SmR1	Proteína hipotética conservada	114	4,00E-32	39%

**Referencias:** ID; porcentaje de identidad, E-value; E-valor y Score; puntuación a las secuencias homólogas.

En la **Tabla 2** podemos observar que en el genoma de E109 se encuentran secuencias codificantes con homología a las del cluster *iac* de *P. putida* 1290 (Leveau and Gerards, 2008). La secuencia con mayor homología es la *iacA*, que codifica para una Acil-CoA deshidrogenasa, y en el genoma de E109 esta anotada como una proteína de pigmento. Cuando a esta secuencia se hizo un blast contra USDA110, arrojó una alta homología para Acil-CoA deshidrogenasa (score=370; e-value=7e-126; %ID=52%) confirmando que se trata de la misma proteína. Se sugiere que la enzima Acil-CoA deshidrogenasa sería una de las responsables en iniciar la degradación de AIA para convertirlo en fuente de C y N. Mediante este análisis bioinformático se pudo determinar que E109 posee secuencias codificantes relacionadas al cluster de

asimilación de AIA. A continuación se evaluó si E109 es capaz de crecer con AIA como única fuente de carbono y nitrógeno, avalando el hallazgo bioinformático.

### 5.13. Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en cultivo de *B. japonicum* E109.

Leveau and Lindow (2005) hallaron en *P. putida* 129 la capacidad utilizar el AIA como única fuente de C, N y energía. El alto valor nutritivo y la fácil digestibilidad del compuesto indólico, permite ser un potente selector para la presencia y expansión de poblaciones de *P. putida* 1290 en lugares donde este compuesto este presente. A continuación en la Tabla 3 se detallan los resultados obtenidos del crecimiento de *B. japonicum* E109 medios de cultivos con AIA como fuente de C.

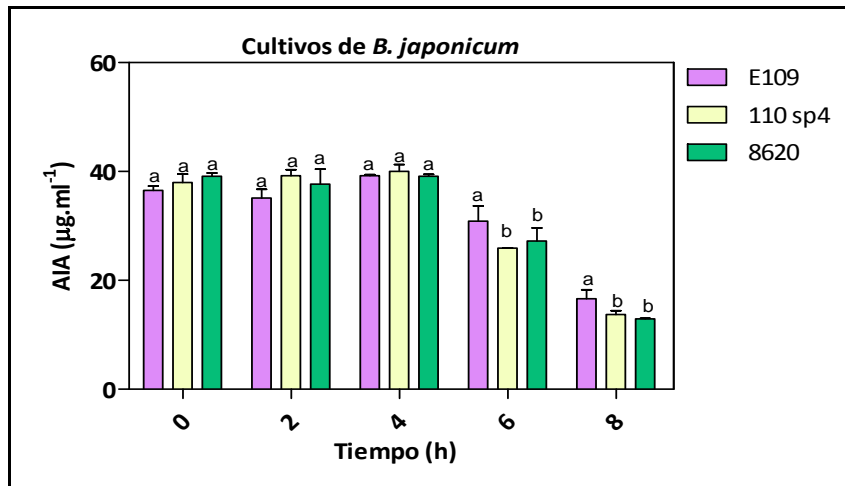
**Tabla 3:** Valores de la producción de biomasa ( $DO_{595}$ ) y el número de células ( $ufc.ml^{-1}$ ) por *B. japonicum* E109 en el medio EMA o EMA modificados por la adición de AIA como fuentes de carbono. Las letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un  $p < 0,05$ .

E109	$DO_{595}$		$ufc.ml^{-1}$	
	72h	96h	72h	96h
EMA	0,5600 <sup>a</sup>	1,546 <sup>a</sup>	$7,37 \times 10^8$	$2,33 \times 10^9$
EMA-Glutamato-AIA	0,0000 <sup>c</sup>	0,053 <sup>b</sup>	$6,12 \times 10^6$	$7,03 \times 10^6$

En base a los resultados obtenidos en la **Tabla 3**, podemos ver que E109 creció en el medio EMA con la formulación original pero no es capaz de crecer en EMA-AIA donde se reemplaza la fuente carbonada por la hormona. Se necesitan otros ensayos para corroborar que E109 utiliza AIA como fuente de carbono y energía. A partir de esto, se pensó en producir una mutante de E109 deficiente en *iacA* pero por razones de limitaciones laborales eso llevaría varios meses de trabajo entonces como prueba adicional se utilizó una mutante de *B. japonicum* 110 sp4 mutada en el gen *ngrC* homóloga al *iacA*.

### 5.14. Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos de *B. japonicum* E109, 110 sp4 y 8620.

A continuación se presentan los resultados del catabolismo de AIA con la cepa E109, la cepa *B. japonicum* 110 sp4 y la mutante en el gen *ngrC* denominada 8620.



**Figura 19.** Contenido de AIA agregado exógenamente ( $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ) empleando cultivos de *B. japonicum* E109, 110 sp4 y 8620 en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD ( $n=3$ ). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un  $p < 0,05$ .

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede observar que la cepa mutante fue capaz de catabolizar el AIA. No se observaron diferencias significativas de degradación con respecto a cepas 110 sp4 y E109. *B. japonicum* 110 sp4 podrían dar indicios de que el gen *nrgC* (homólogo a *iacA*) no sería el único responsable en el catabolismo de AIA o que no sería el gen implicado en la degradación de la especie *B. japonicum*.

Estos resultados amplían las hipótesis acerca de las enzimas responsables y/o de las vías que podrían estar operando en la degradación de la fitohormona en *B. japonicum* E109.

## 6. DISCUSIÓN

El catabolismo se define como un proceso catalítico irreversible que implica la pérdida de la actividad biológica de la hormona como consecuencia de su oxidación, conjugación o su asimilación como fuente de C o N por parte de otro organismo. Dentro del catabolismo oxidativo, se consideran las siguientes reacciones químicas: (I) oxidación por alteración de la cadena lateral de la molécula de AIA; (II) oxidación resultante de la producción de oxindol o compuestos del tipo dioxindol (III) apertura del anillo pirrol y otras reacciones químicas y (IV) la conjugación con aminoácidos, carbohidratos u otras moléculas pequeñas para su posterior oxidación. Las reacciones del tipo I, II y IV se han caracterizado en bacterias (Egebo et al. 1991). Dentro del catabolismo asimilativo podemos mencionar el ejemplo de *Pseudomonas putida* cepa 1290 donde el AIA degradado sirve como sustrato para el crecimiento de la bacteria por su alto valor nutritivo y la fácil digestibilidad, permitiendo la presencia y la expansión de las poblaciones de *P. putida* 1290 en los lugares donde el AIA está presente. La vía de degradación utilizada por esta bacteria todavía no se conoce, pero se sabe que la presencia de abundantes concentraciones de azúcares tales como glucosa y fructosa disminuyen la capacidad que poseen las cepas de *P. putida* para utilizar AIA (Jaeger et al. 1999; Leveau et al. 2001).

Jensen et al. (1995) observaron que el AIA, el 4-cloro-AIA (4-Cl-AIA) y el 5-cloro-AIA (5-Cl-AIA) se metabolizan en diferentes grados por cepas de *Bradyrhizobium japonicum*. Estos autores indicarían una nueva vía metabólica en la que AIA se metabolizaría a través de ácido dioxindol-3-acético luego a dioxindol, este compuesto se oxidaría a isatina, la que posteriormente se hidrolizaría a través del ácido glioxílico-2-aminofenil (ácido isatínico) a ácido antranílico pudiéndose metabolizar aún más. La degradación de 4-Cl-AIA aparentemente se detiene en el paso 4-Cl-dioxindol en contraste con 5-Cl-IAA que se metaboliza a ácido 5-Cl-antranílico. En ensayos llevados a cabo por el Dr. Cassán, no se logró identificar este compuesto en los medios (datos no mostrados). Nielsen et al. (1988) observaron *in vivo* actividad de degradación de AIA en *B. japonicum*.

En el cultivo de *B. japonicum* E109 con la adición de AIA, hay una disminución de la concentración de la hormona en función del tiempo (h). Luego de 6 h de la adición de la hormona en el medio de cultivo se puede observar una disminución de aprox. un 50 % de la concentración y luego de 24 h no se detecta el compuesto en el medio de cultivo, lo que supone que el mecanismo catabólico es pre-existente a la adición de la hormona. Al aplicar calor en el sobrenadante de *B. japonicum* E109 no se puede llevar a cabo la degradación del AIA. Estos resultados sugerirían que el catabolismo de AIA por E109, sería proveniente de una

molécula con actividad biológica que al aplicarle calor la desnaturalizaría con pérdida de su actividad. El AIA exógeno es catabolizado eficientemente por *B. japonicum* E109 en medio de cultivo, generando cambios importantes en la fisiología de la bacteria en el medio, lo que permite especular sobre un nuevo papel de la hormona como una señal de la planta para regular el desarrollo bacteriano durante la interacción. Ghosh et al. (2013) observó en los nódulos de *C. cajan* altos niveles de AIA lo que puede deberse a la menor cantidad de enzimas involucradas en el catabolismo de esta hormona tales como oxidasa y peroxidasa. Asimismo, observaron un mayor nivel de fenoles en los nódulos lo que puede ser el resultado de la menor actividad peroxidasa y polifenol oxidasa. El perfil de transcripción del genoma completo de *Bradyrhizobium japonicum*, reveló la expresión diferencial de aproximadamente un 15% del genoma luego del tratamiento de 1mM con AIA. Los genes de respuesta al estrés general fueron inducidos, como los involucrados en la respuesta al frío, calor, estrés oxidativo, estrés osmótico, desecación y biosíntesis de exopolisacárido. Esto sugiere que AIA es efectivo activando la respuesta de estrés generalizado en *B. japonicum*. El tratamiento de AIA también estimuló la formación de biofilm y la producción de EPS (Donati et al. 2013),

Las peroxidasas se encuentran distribuidas en diversos ambientes y están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos. Tienen como función primaria catalizar la reducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mediante la adopción de electrones a diversas moléculas donantes, tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina y entre ellas las auxinas (Hiraga et al. 2001). De aquí el interés, por esta enzima en nuestro modelo de catabolismo de AIA. En *Ensifer meliloti* (ex-*Sinorhizobium meliloti*), una peroxidasa se expresa en la interacción con *Medicago truncatula* (Cook et al. 1995) y se cree que esta enzima podría controlar el nivel de auxinas en las raíces de plantas noduladas o en raíces de manera general, ya que ciertas peroxidasas oxidan auxinas y de esta manera controlan indirectamente la organogénesis de nódulos a través de su catabolismo (Savitsky et al. 1999; Mathesius, 2001). También, se ha informado de la existencia de otras enzimas con capacidad de metabolizar el AIA, tales como AIA oxidasas, o poli fenol oxidasas de raíces y nódulos que poseen algún papel en el metabolismo de AIA en la simbiosis (Ghosh and Basu, 2006).

Previo a la construcción de la mutante para una peroxidasa en *B. japonicum* E109 se llevaron a cabo varios experimentos para determinar la posible actividad de la enzima en el medio de cultivo o sobrenadante de la bacteria o ensayos por la adición exógena de HRP o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las mismas muestras. En estos experimentos no pudimos confirmar la actividad de una enzima del tipo peroxidasa en las condiciones evaluadas. El agregado exógeno de HRP o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, no aumento la velocidad de degradación de AIA en cultivos de E109. La mutante de *B.*

*japonicum* E109 *-per12*, construida con una delección en el gen que codifica para una peroxidasa presente en el genoma de esta bacteria, se ensayó junto con la cepa salvaje a nivel de su capacidad de catabolizar el AIA en concentraciones crecientes de la molécula (10 a 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). La cepa mutante no presentó diferencias significativas en la degradación de la hormona respecto de la cepa salvaje. En base a estos resultados podemos decir que esta enzima no estaría involucrada en el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109.

Se reportaron dos enzimas hipotéticas responsables del catabolismo de AIA hasta ácido antranílico. La isatina reductasa que reduce el dioxindol a isatina, y la isatina amidohidrolasa que convierte la isatina a ácido isatinico (Olesen and Jochimsen 1996). Previamente Egebo et al. (1991) sugirieron que la molécula de AIA se degradaría por una apertura oxidativa del anillo de indol en una reacción análoga a la catalizada por la triptófano 2,3-dioxigenasa. Se realizó la búsqueda de estas enzimas en el genoma de E109 a través de la base de datos NCBI y no hubo secuencias homólogas, como así tampoco en el genoma de *B. diazoefficiens* USDA110. Dado los resultados obtenidos, se procedió a buscar las secuencias codificantes de un cluster compuesto por 10 genes reportados para *P. putida* 1290, estos participan en la degradación asimilativa del ácido indol-3-acético utilizando este compuesto indólico como fuente de C, N y energía permitiendo así el crecimiento y desarrollo en ambientes donde se encuentra disponible. Uno de los genes implicados en la degradación de AIA es el gen *iacA*. Este participa en el primer paso de la vía catabólica de *Pseudomonas*. *B. diazoefficiens* USDA110, carece de genes *iac*, a excepción de una alta homología para *iacA* (Leveau and Gerards 2008). Mediante un análisis bioinformático utilizando la base de datos NCBI, en el genoma de E109 se encuentran disponibles secuencias codificantes homólogas a las del cluster *iac* de *P. putida* 1290 (**Tabla 2**). Scott et al. (2013) propusieron una vía catabólica para la degradación AIA en *P. putida* 1290 donde los productos intermediarios identificados mediante análisis GC-MS fueron: 2-OH-IAA(2-hidroindol 3- ácido acético), dioxIAA (dioxindol 3-ácido acético), y catecol, el segundo componente mencionado ha sido propuesto como un intermediario del catabolismo de AIA en *Bradyrhizobium japonicum* (Jensen et al. 1995).

## 7. CONCLUSIÓN

Nuestro resultados indican que *B. japonicum* E109 es capaz de catabolizar AIA muy rápidamente después de la adición exógena de la hormona en el medio de cultivo. Esto permitiría conjeturar que el mecanismo catabólico es pre-existente a la adición de la hormona. La desnaturalización del medio de cultivo por calor, suprime la degradación de la hormona, por lo que suponemos que la capacidad catabólica reside en un compuesto de origen enzimático. Además se trataría de un compuesto que acompaña al crecimiento de E109 y que puede degradar en menor tiempo el AIA exógeno. Luego de varios experimentos para determinar la presencia de la actividad peroxidasa a nivel del catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109, junto con la construcción de una mutante deficiente en la mencionada actividad enzimática, estaríamos en condiciones de afirmar que esta enzima no estaría involucrada en la degradación de AIA. A través de búsqueda de secuencias homólogas en el genoma de E109 se pudo establecer que presenta una alta homología con el gen *iacA* presente en *P.putida* 1290 implicado en la primera etapa de degradación de la hormona y bajo las condiciones evaluadas no es capaz de utilizar el AIA como única fuente de C y N. La cepa E109 mostró la capacidad de catabolizar el ácido indol-acético bajo distintas condiciones pero no se pudo determinar que enzimas son las responsables y/o de las vías que podrían estar operando en la degradación de la fitohormona.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

1. **Alemayehu, D., Gordon, L. M., O'Mahony, M. M., O'Leary, N. D., and Dobson, A. D. W.** (2004). Cloning and functional analysis by gene disruption of a novel gene involved in indigo production and fluoranthene metabolism in *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. *FEMS Microbiology Letters*, *239*(2), 285–93.
2. **Antoun, H., Beauchamp, C. J., Goussard, N., Chabot, R., and Lalande, R.** (1998). Potential of Rhizobium and Bradyrhizobium species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: Effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant and Soil*, *204*(1), 57–67.
3. **Bartel, B., and Fink, G. R.** (1994). Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(14), 6649–6653.
4. **Bartling, D., Seedorf, M., Mithofer, A., and Weiler, E. W.** (1992). Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3-acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid. *European Journal of Biochemistry*, *205*(1), 417–424.
5. **Bartling, D., Seedorf, M., Schmidt, R. C., and Weiler, E. W.** (1994). Molecular characterization of two cloned nitrilases from *Arabidopsis thaliana*: key enzymes in biosynthesis of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *91*(13), 6021–6025.
6. **Biswas, J. C., Ladha, J. K., Dazzo, F. B., Yanni, Y. G., and Rolfe, B. G.** (2000). Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice. *Agron J*, *92*, 880–886.
7. **Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., and Luna, V.** (2007). Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *74*(4), 874–880.
8. **Carlson, R. W., Sanjuan, J., Bhat, U. R., Glushka, J., Spaink, H. P., Wijfjes, A. H. M., and Stacey, G.** (1993). The structures and biological activities of the lipooligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(24), 18372–18381.
9. **Cartieaux, F., Contesto, C., Gallou, A., Desbrosses, G., Kopka, J., Taconnat, L., and Touraine, B.** (2008). Simultaneous interaction of *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* Sp. strain ORS278 and *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 leads to complex transcriptome changes. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, *21*(2), 244–259.



10. Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., and Luna, V. (2009). Azospirillum brasilense Az39 and Bradyrhizobium japonicum E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology*, 45(1), 28–35.
11. Cassán, F., Spaepen, S., Pierantonelli, B., Molina, R., and Vanderleyden, J. (2011). Hydrolysis and catabolism of Indole-3-acetic-amino acids (IAA-aa) and other related auxins by *Bradyrhizobium japonicum*. XXV Reunión Latinoamericana de Rizobiología (XXV RELAR) y I Congreso Nacional de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (I MIPCV).
12. Chabot, R., Antoun, H., and Cescas, M. P. (1996). Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. phaseoli. *Plant and Soil*, 184(2), 311-321.
13. Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., and VandenBosch, K. (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *The Plant Cell*, 7(1), 43–55.
14. Costacurta, A., and Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 21(1), 1–18.
15. De Luca, V., Marineau, C., and Brisson, N. (1989). Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: comparison with animal dopa decarboxylases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(8), 2582–2586.
16. Delamuta, J. R. M., Ribeiro, R. A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I. S., Martínez-Romero, E., and Hungria, M. (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 9), 3342–51.
17. Denarie, J., Debelle, F., and Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 497-531.
18. Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo, C.W (2011). InfoStat version 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Cordoba, Argentina. [http:// www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
19. Dobereiner, J., and Pedrosa, F. O. (1987). Nitrogen-fixing bacteria in nonleguminous crop plants. *Brock/Springer Series in Contemporary Bioscience (USA)*.
20. Donati, A. J., Lee, H. I., Leveau, J. H. J., and Chang, W. S. (2013). Effects of Indole-3-acetic acid on the transcriptional activities and stress tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS ONE*, 8(10), 1–11.
21. Dullaart, J. (1970). The bioproduction of indole-3-acetic acid and related compounds in

- root nodules and roots of *Lupinus luteus* L. and by its rhizobial symbiont. *Acta Botanica Neerlandica*, 19(5), 573–615.
22. Egebo, L. a., Nielsen, S. V. S., and Jochimsen, B. U. (1991). Oxygen-dependent catabolism of indole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of Bacteriology*, 173(15), 4897–4901.
  23. Ernstsens, A., Sandberg, G., Crozier, A., and Wheeler, C. T. (1987). Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. *Planta*, 171(3), 422–428.
  24. Euzéby, J. (2007). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. *Int J Syst Evol Microbiol*, 57(Pt 5), 893-897.
  25. Gárate Ormaechea, A., and Bonilla Mangas, I. (2008). Nutrición mineral y producción vegetal. *Fundamentos de fisiología vegetal*. Servicio de Publicaciones.
  26. Garrity, G.M., Bell, J.A. and Lilburn, T. (2005). Family VII. *Bradyrhizobiaceae* fam. nov. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds). *Bergey's manual of systematic bacteriology, volume two the proteobacteria, part C the alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria*. Springer, New York, pp 438–476.
  27. Gazaryan, I. G., Lagrimini, L. M., Ashby, G. A., & Thorneley, R. N. (1996). Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. *Biochemical Journal*, 313(3), 841-847.
  28. Ghosh, S., and Basu, P. S. (2006). Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. *Microbiological research*, 161(4), 362–366.
  29. Ghosh, P.K., Saha, P., Mayilraj, S., and Maiti, T. K. (2013). Role of IAA metabolizing enzymes on production of IAA in root, nodule of *Cajanus cajan* and its PRP *Rhizobium* sp. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2(3), 234–239.
  30. Glick, B. R., Patten, C. L., Holguin, G., and Penrose, D. M. (1999). *Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria*. World Scientific.
  31. Grambow, H. J., and Langenbeck-Schwich, B. (1983). The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid in vitro. *Planta*, 157(2), 132–7.
  32. Halder, A. K., Mishra, A. K., and Chakrabarty, P. K. (1991). Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 29(1), 28–31.
  33. Hinman, R. L., and Lang, J. (1965). Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic Acid. *Biochemistry*, 4(1), 144–158.
  34. Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., and Matsui, H. (2001). A large family of class

- III plant peroxidases. *Plant & Cell Physiology*, 42(5), 462–468.
35. **Hungria, M., and Mendes, I. C.** (2014). Nitrogen fixation with soybean: The perfect symbiosis?. *Biological Nitrogen Fixation*, 1009–1024.
  36. **Hunter, W. J.** (1987). Influence of 5-methyltryptophan-resistant *Bradyrhizobium japonicum* on soybean root nodule indole-3-acetic acid content. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(5), 1051–1055.
  37. **Hunter, W. J.** (1989). Indole-3-acetic acid production by bacteroids from soybean root nodules. *Physiologia Plantarum*, 76(1), 31–36.
  38. **Hutzinger, O., and Kosuge, T.** (1968). 3-Indoleacetic-L-lysine, a new conjugate of 3-indoleacetic acid produced by *Pseudomonas savastanoi*. *Biochemistry and physiology of plant growth substances*, 183-94.
  39. **Jaeger, C. H., Lindow, S. E., Miller, W., Clark, E., and Firestone, M. K.** (1999). Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(6), 2685–2690.
  40. **Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona, R., Vega-Hernandez, M., Trujillo, J., and Leon-Barrios, M.** (1998). Indole-3-acetic acid catabolism by bacteria belonging to the *Bradyrhizobium* genus. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* pp. 484-484). Springer Netherlands.
  41. **Jensen, J. B., Egsgaard, H., Onckelen, H. Van, and Jochimsen, B. U.** (1995). Catabolism of Indole-3-Acetic Acid and 4-and 5-Chloroindole- 3-Acetic Acid in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal Of Bacteriology*, 177(20), 5762–5766.
  42. **Jordan, D. C.** (1982). NOTES: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *International Journal of Systematic Bacteriology*.
  43. **Kalyani, D. C., Phugare, S. S., Shedbalkar, U. U., & Jadhav, J. P.** (2011). Purification and characterization of a bacterial peroxidase from the isolated strain *Pseudomonas* sp. SUK1 and its application for textile dye decolorization. *Annals of microbiology*, 61(3), 483-491.
  44. **Kaneshiro, T., Slodki, M. E., and Plattner, R. D.** (1983). Tryptophan catabolism to indolepyruvic and indoleacetic acids by *Rhizobium japonicum* L-259 mutants. *Current Microbiology*, 8(5), 301–306.
  45. **Kaufman, P. B., Wu, L. L., Brock, T. G., and Kim, D.** (1995). Hormones and the orientation of growth. In *Plant hormones* pp. 547-571. Springer Netherlands.
  46. **Kende, H., and Zeevaart, J.** (1997). The Five “Classical” Plant Hormones. *The Plant Cell*, 9(7), 1197.

47. Kinashi, H., Suzuki, Y., Takeuchi, S., and Kawarada, A. (1976). Possible metabolic intermediates from IAA to  $\beta$ -acid in rice bran. *Agricultural and Biological Chemistry*, 40(12), 2465-2470.
48. Kloepper, J. W., Lifshitz, R., and Zablutowicz, R. M. (1989). Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. *Trends in biotechnology*, 7(2), 39-44.
49. Kloepper, J. W., and Metting Jr, F. B. (1992). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management.*, 255-274.
50. Kuykendall, L. (2005). Bradyrhizobium Jordan 1982, 137 VP. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 438-443.
51. Kuykendall, L. D., and Elkan, G. H. (1987). Isolation and identification of genetically marked strains of nitrogen-fixing microsymbionts of soybeans. *Symbiotic Nitrogen Fixation Technology*, 205-220.
52. Kuykendall, L. D., Roy, M. a., O'Neill, J. J., and Devine, T. E. (1988). Fatty Acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(4), 358–361.
53. Lambrecht, M., and Okon, Y. (2000). Indole-3-acetic acid: a reciprocal signalling molecule in bacteria–plant interactions.
54. Leveau, J. H. J., and Gerards, S. (2008). Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. *FEMS Microbiology Ecology*, 65(2), 238–250.
55. Leveau, J. H. J., and Lindow, S. E. (2005). Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(5), 2365–2371.
56. Leveau, J. H., & Lindow, S. E. (2001). Appetite of an epiphyte: quantitative monitoring of bacterial sugar consumption in the phyllosphere. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 3446-3453.
57. Malamy, J. E., and Benfey, P. N. (1997). Down and out in arabidopsis: The formation of lateral roots. *Trends in Plant Science*.
58. Marcondes de Souza, J. A., Carrareto Alves, L. M., de Mello Varani, A., and de Macedo Lemos, E. G. (2014). The Family *Bradyrhizobiaceae*. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 135–154.
59. Mathesius, U. (2001). Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *Journal of Experimental*

- Botany*, 52(Spec Issue), 419–426.
60. **Mathesius, U., Schlaman, H. R., Spalink, H. P., Of Sautter, C., Rolfe, B. G., and Djordjevic, M. A.** (1998). Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 14(1), 23–34.
  61. **Minamisawa, K., and Fukai, K.** (1991). Production of indole-3-acetic acid by *Bradyrhizobium japonicum*: a correlation with genotype grouping and rhizobitoxine production. *Plant and cell physiology*, 32(1), 1-9.
  62. **Mino, Y.** (1970). Studies on the destruction of indole-3-acetic acid by a species of *Arthrobacter* IV. Decomposition products. *Plant and Cell Physiology*, 11(1). Retrieved from
  63. **Molina, R.,** (2009). Factores bióticos y abióticos que regulan la síntesis de ácido indol-3-acético y otras fitohormonas en *Azospirillum brasilense* AZ39: Aspectos básicos y biotecnológicos. Desarrollado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal de la UNRC
  64. **Monteiro, A. M., Crozier, A., and Sandberg, G.** (1988). The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid in germinating seed and seedlings of *Dalbergia dolichopetala*. *Planta*, 174(4), 561–8.
  65. **Nielsen, S. V. S., Egebo, L. A., and Jochimsen, B.** (1988). *Bradyrhizobial* indoleacetic acid metabolism and its significance for root nodule development, p. 151-152. In R. Palacios and D. P. S. Verma (ed.), *Molecular genetics of plant-microbe interactions*. APS Press, St. Paul, Minn.
  66. **Nienaber, A., Huber, A., Göttfert, M., Hennecke, H., and Fischer, H. M.** (2000). Three new NifA-regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization. *Journal of Bacteriology*, 182(6), 1472–1480.
  67. **Nonhebel, H. M., and Bandurski, R. S.** (1984). Oxidation of Indole-3-acetic Acid and Oxindole-3-acetic Acid to 2,3-Dihydro-7-hydroxy-2-oxo-1H Indole-3-acetic Acid-7'-O-D-Glucopyranoside in *Zea mays* Seedlings. *Plant Physiology*, 76(4), 979–983.
  68. **Nonhebel, H. M., Kruse, L. I., and Bandurski, R. S.** (1985). Indole-3-acetic acid catabolism in *Zea mays* seedlings. Metabolic conversion of oxindole-3-acetic acid to 7-hydroxy-2-oxindole-3-acetic acid 7'-O-??-D-glucopyranoside. *Journal of Biological Chemistry*, 260(23), 12685–12689.
  69. **Olesen, M. R., and Jochimsen, B. U.** (1996). Identification of enzymes involved in indole-3-acetic acid degradation. *Plant and Soil*, 186, 143–149.
  70. **Patten, C. L., and Glick, B. R.** (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid.

- Canadian Journal of Microbiology*, 42(3), 207–220.
71. Penmetsa, R. V, Frugoli, J. A., Smith, L. S., Long, S. R., and Cook, D. R. (2003). Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 131(3), 998–1008.
72. Peticari, A., Parra, R., Balatti, P., Fiqueni, M., and Rodriguez Caceres, E. (1996). Selección de cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* y *Sinorhizobium fredii* para la inoculación de soja. *Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Santa Cruz de La Sierra, Bolivia*, 103–104.
73. Piccinetti C., Arias N., Ventimiglia L., Díaz Zorita M., Murua L., Sánchez H., Ferraris G., Mousegne F., Fontanetto H., Sá Pereira E., Capurro J., Enrico J. M., López C., Carrizo A.S., Salvaggiotti F., Collino D., and Peticari A. (2013). Positive effects of inoculation of soybean on nodulation BNF and the parameters of crop production, p 283–297. In: Albanesi AS (ed), *Microbiología agrícola: un aporte de la investigación en Argentina*, 2nd ed. Magna Publicaciones, Tucumán, Argentina.
74. Pierantonelli, M. B. (2012). Factores bióticos y abióticos que regulan el catabolismo del ácido indol-3-acético en *Bradyrhizobium japonicum* cepa E109. Tesis para la obtención del título de grado.
75. Pini, F., Galardini, M., Bazzicalupo, M., and Mengoni, A. (2011). Plant-bacteria association and symbiosis: Are there common genomic traits in alphaproteobacteria? *Genes*, 2(4), 1017–1032.
76. Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., and Vanonckelen, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic-acid biosynthesis - evidence for A nontryptophan dependent pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6(5), 609–615.
77. Proctor, M. H. (1958). Bacterial dissimilation of indoleacetic Acid: a New Route of Breakdown of the Indole Nucleus. *Nature*, 181(4619), 1345–1345.
78. Qiu, L.-J., Chen, P.-Y., Liu, Z.-X., Li, Y.-H., Guan, R.-X., Wang, L.-H., and Chang, R.-Z. (2011). The worldwide utilization of the Chinese soybean germplasm collection. *Plant Genetic Resources*, 9(01), 109–122.
79. Ramírez-Bahena, M. H., Chahboune, R., Peix, A., and Velázquez, E. (2013). Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(PART3), 1013–1016.
80. Ramírez-Bahena, M. H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D. N., Mateos, P. F., and Velázquez, E. (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and

- Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(8), 1929–1934.
81. Reinecke, D. M., and Bandurski, R. S. (1983). Oxindole-3-acetic acid, an indole-3-acetic acid catabolite in *Zea mays*. *Plant Physiology*, 71(1), 211–213.
  82. Ross, J. J., O'Neill, D. P., Smith, J. J., Kerckhoffs, L. H. J., and Elliott, R. C. (2000). Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant Journal*, 21(6), 547–552.
  83. Salkowski. (1885). Ueber das Verhalten der Skatolcarbonsäure im Organismus.: *Zeitschrift für physiologische Chemie*.
  84. Salzwedel, J. L., and Dazzo, F. B. (1993). pSYM nod gene influence on elicitation of peroxidase-activity from white clover and pea roots by Rhizobia and their cell-free supernatants. *Mol Plant-Microbe Interact*, 6, 127–134.
  85. Sandberg, G., Crozier, A., and Ernstsen, A. (1987). Indole-3-acetic acid and related compounds. *Principles and practice of plant hormone analysis*, 2, 169–301.
  86. Savitsky, P., Gazaryan, I., and Tishkov, V. (1999). Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochem. J.*
  87. Scott, J. C., Greenhut, I. V, and Leveau, J. H. J. (2013). Functional characterization of the bacterial iac genes for degradation of the plant hormone indole-3-acetic acid. *Journal of Chemical Ecology*, 39(7), 942–51.
  88. Simon, R., Quandt, J., and Klipp, W. (1989). New derivatives of transposon Tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in gram-negative bacteria. *Gene*, 80(1), 161–169.
  89. Stacey, G., Sanjuan, J., Luka, S., Dockendorff, T., and Carlson, R. W. (1995). Signal exchange in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. *Soil Biology and Biochemistry*.
  90. Suslow, T., Kloepper, J., Schroth, M., and Burr, T. (1979). Beneficial bacteria enhance plant growth. *California agriculture*, 33(11), 15-17.
  91. Thimann, K. V. (1936). On the physiology of the formation of nodules on legume roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 22(8), 511–4.
  92. Torres D., Benavidez I., Obando M., Gualpa J., and Cassán, F. (2014). Metabolismo del ácido indol-3-acético (AIA) y otras auxinas por *Bradyrhizobium japonicum* E109. La Falda, Córdoba. 2do Taller Latinoamericano sobre Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de Plantas.



93. Torres, D., Peticari, A., Revale, S., Vazquez, M., and Cassán, F. (2013). Análisis genómico de *Bradyrhizobium japonicum* E109, una cepa simbiótica de soja que muestra un amplio repertorio PGPR. Argentina. Santiago del Estero. IX Reunión científica técnica de Biología de suelos. REBIOS.
94. Torres, D., Revale, S., Obando, M., Maroniche, G., Paris, G., Peticari, A., and Cassán, F. (2015). Genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109, one of the most agronomically used nitrogen-fixing Rhizobacteria in Argentina. *Genome Announc*, 3(1), 1566–14.
95. Tsubokura, S., Sakamoto, Y., and Ichihara, K. (1961). The bacterial decomposition of indoleacetic acid. *The Journal of Biochemistry*, 49(1), 38-42.
96. Tsunoda, H., and Yamaguchi, K. (1995). The cDNA sequence of an auxinproducing nitrilase homologue in tobacco. *Plant Physiology*, 109, 339.
97. Turner, S. L., and Young, J. P. (2000). The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. *Molecular Biology and Evolution*, 17(2), 309–319.
98. van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F., Marchal, K., Vanderleyden, J., and Spaepen, S. (2011). Transcriptome analysis of the rhizosphere bacterium *Azospirillum brasilense* reveals an extensive auxin response. *Microbial Ecology*, 61(4), 723–728.
99. Vincent, J. M. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*.
100. Welinder, K. G. (1992). Plant peroxidases: structure-function relationships. *Plant peroxidases. University of Geneva, Geneva, Switzerland*, 1-24.
101. Zolman, B. K., Nyberg, M., & Bartel, B. (2007). IBR3, a novel peroxisomal acyl-CoA dehydrogenase-like protein required for indole-3-butyric acid response. *Plant molecular biology*, 64(1-2), 59-72.



## 9. ANEXO

### Preparación de Soluciones y Medios de Cultivos

#### 9.1. Preparación de Solución de Triptófano

Solución Madre de Triptófano	
Componente	Cantidad
Triptófano	0,1 g
Agua Destilada	10 ml

#### 9.2. Preparación de Reactivo de Salkowski

Solución de reactivo de Salkowski	
Componente	Cantidad
$\text{Cl}_2\text{Fe}_3$ (7,5 M)	6,25 g.
Agua destilada	290 ml
$\text{H}_2\text{SO}_4$ (7,5 M) al 95%	210 ml

#### 9.3. Preparación de Solución de AIA

Solución Stock de AIA ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	
Componente	Cantidad
AIA	0,001 g
Agua destilada	10 ml

Solución Stock de AIA ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ )	
Componente	Cantidad
AIA	0,01 g
Agua destilada	10 ml

#### 9.4. Preparación de Medio EMA (Extracto de Levadura-Manitol-Agar)

Según Vincent (1970).

Medio EMA	
Componente	Cantidad
Manitol	10 g
Extracto de levadura	0,5 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5 g

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O 10% P/V	100 µl
SO <sub>4</sub> Mn 10% P/V	100 µl
Rojo congo	5 ml
Agar-agar	15 gr
Agua destilada	1 litro

El pH se ajusta a 6.8, con NaOH o HCl.

Nota: para la preparación de caldo, se omite el agregado de agar-agar e indicador rojo congo.

#### 9.5. Preparación de Medio TSA (Trypteína de Soya)

Medio TSA	
Cantidad	Cantidad
Medio comercial	30 g
Agar-agar	15 g
Agua Destilada	1000 ml

El pH se ajusta a 6.8, con NaOH o HCl.

#### 9.6. Preparación de Buffer Acetato de Sodio-Ácido Acético

Acetato de Sodio 0,1 M	
Componente	Cantidad
Acetato de Na	1,36 gr
Agua destilada	100 ml

Ácido Acético 0,1 M	
Componente	Cantidad
Ácido Acético	0,29 ml
Agua destilada	50 ml

Para preparar el buffer se colocan proporciones 8:2, hasta llegar al pH deseado.

#### 9.7. Preparación de Solución de Orto-dianisidina

<b>Solución de Orto-dianisidina 9 mM</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Orto-dianisidina	28,24 mg
Agua destilada	10 ml

#### 9.8. Preparación de Peróxido de Hidrogeno

<b>Solución de Peróxido de hidrogeno</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	100 µl
Agua destilada	10 ml

#### 9.9. Preparación de Solución madre de Gentamicina

<b>Solución madre de Gentamicina</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Gentamicina	10 mg
Agua destilada	1 ml

#### 9.10. Preparación de Medio EMA modificado

<b>Medio EMA-GLUTAMATO-AIA</b>	
<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Ácido Indol-3-acético	1 g
Glutamato de sodio	0,05 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O 10% P/V	100 µl
SO <sub>4</sub> Mn 10% P/V	100 µl
Agua destilada	1000 ml

El pH se ajusta a 6.8, con NaOH o HCl.