



74747

**MUNOZ, VANINA LAURA**

*Pol. de las ciencias exactas del campo de la botánica: sscel - biofisiología.*



**2015 74747**



El presente trabajo fue realizado en la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto bajo la dirección de la Dra. Adriana Fabra, para optar al título de Doctora en Ciencias Biológicas.

Directora: Dra. Adriana Fabra



Aprobado por el Tribunal de Tesis:

Dra. Elizabeth Agostini

Dr. Mario Orlando Aguilar

Dra. María Patricia Benavides

74747

Río Cuarto, 8 de Junio de 2015



24747

24747

MFN
C
T. 997

*...Amo el mar, amo la tierra y todo lo que la rodea, soy neosensible, y si no se me quema ningún fusible resolveré el teorema de lo imposible...*

*A mi nono con todo el amor...*

..Y una vez más me encuentro escribiendo los agradecimientos, una vez más pienso en las pocas líneas con las que cuento que me resulta difícil expresar todos los sentimientos y pensamientos que navegan en esta marea de recuerdos de estos 5 años, así que una vez más correré el riesgo de resumirlos pero asumiré el compromiso en el día a día de demostrarlo...

- A Dios por hacerme sentir viva, por darme su mano, en cada mano amiga, por darme su abrazo, en cada abrazo dado, por darme su guía, en cada palabra, por darme su compañía, en cada ser amado, por hacerme feliz, con cada sonrisa de mi gente querida, por hacerme fuerte, en cada tropezón, por enseñarme a valorar, con cada experiencia mala, y por sobre todo por pertenecer a la familia que pertenezco, a la que se ha ido formando y por poner en mi camino los amigos que tengo.
- A mis padres, Hugo y Marta, a quienes amo y admiro, de quienes estoy más que orgullosa, mis guías, los que han hecho que sea lo que soy y lo que no también. Por darme las herramientas necesarias para salir al mundo y buscar la felicidad, los que me abrieron la puerta para que vuele y no la cerraron para que regrese. Porque son los grandes pilares en los que me puedo apoyar. Por legarme valores, amor y respeto. Por ser mis ángeles en la tierra. Por ser padres y abuelos, y de los mejores! Por su confianza, su amor, su dedicación. Por ser ese Abu y esa Yaya que todo lo pueden...por eso, y mucho, mucho más.
- A mis hermanos, Vero y Diegui, mis amigos, mis confidentes, mis ejemplos a seguir. Personas únicas e incomparables, ejemplos de luchadores, de soñadores, de profesionales, pero por sobre todo de personas. Si me perdiera no dudaría un segundo que ellos me encontrarían, hacen que el día a día sea mucho más fácil, que el camino a seguir sea digno de transitar, me hacen feliz. Por ser los tíos que son, únicos e indescriptibles. A ellos le debo más de lo que pueda algún día devolverles. A ellos, el amor, las sonrisas, la niñez y la adultez, a ellos las

decisiones, a ellos los sueños, a ellos la fé y la esperanza, a ellos mi familia, y mucho más. Por la ayuda en cuestiones de escritura, Vero, y en diseño, Diegui.

- A Javi, mi esposo, mi novio, mi mejor amigo, mi compañero, a quien amo. Por ser ese Padre maravilloso, ejemplar, ese padre presente día a día, por darnos su amor. Por tomarme la mano un invierno y no haberla soltado jamás. Porque las cosas son más simples cuando las hacemos juntos. Por su gran y enorme paciencia. Por toda su ayuda. Porque no camina delante de mí y tampoco detrás, porque siempre lo hace a mi lado. Porque proyectamos siempre juntos. Por dejarme cumplir con mis propias metas, mis sueños, por ser parte de ellos. Por estar. Por ser un referente para mí. Por luchar a mi lado y porque siempre existirán las 3T.
- A Locha, mi cuñada, mi hermana, mi amiga. Por estar siempre, desde lo invisible a lo visible, con la palabra o el silencio, con una mirada cómplice, con un abrazo, con una sonrisa, por no fallarnos jamás. Por ser esa gran mamá y tía. Por que se que en ella puedo confiar. Por su gran apoyo. Por ser un ser tan especial, una persona ejemplar, a quien quiero y respeto mucho. Por enseñarme y brindarme tanto amor. Por escucharme. Por ser esa gran persona que siempre estará.
- A Bauti, mi pequeño y gran milagro, quien hace que mis días sean mejores, que mi vida sea mejor. Mi bebé, mi angelito, mi príncipe. El motivo de dar gracias a Dios todos los días. Mi musa inspiradora. La fuerza interior que hace que me levante día a día a luchar por un lugar mejor, a tratar de conseguir mis sueños, a pelear por su felicidad. Por el que por muchas veces seguramente no duermo, pero por el que seguramente vivo!! A él más que gracias...porque aprendí que el amor no tiene límites, que vale la pena soñar y luchar por esos sueños, que Dios es grande, y que la familia vale más que cualquier lingote de oro. Por darme paz en tanto estrés, por su mami, por sus ojitos, por su manita, por su sonrisa, por sus abracitos, por su amor.

- A Pedrito, mi sobrino, mi principito, el que hace que lo esencial deje de ser invisible a los ojos, el que hizo del invierno el verano, el enano que amo con locura, el que ha ganado gran parte de mi corazón. Mi gran pedacito de mundo, por hacer que los días tengan un motivo más para sonreír, por dar salud a mi corazón, por recordarnos lo importante de ser niños. A él gracias y mucho más...por ser un gran maestro con sus 2 añitos, él me enseña que se puede reír aún después de llorar. Por sus travesuras. Y por sobre todo por sus cuestionamientos, hace que recuerde por qué elegí lo que elegí.
- A mi familia política, María, Carlos, Carli, Ale, Mari, Sonia, por hacer que las distancias sean cortas, por la ayuda recibida, por las sonrisas diarias, por el apoyo incondicional, por las enseñanzas, por la confianza, por la guía, por el amor. Por acompañarme en mis sueños, por valorarlos, y hacer lo imposible para que se hagan posible. Gracias.
- A Pauli, Martín y Lucía, mis bellos y pequeños españoles con alma de argentinos, mis sobrinos, gracias por dejar que quien escriba sea su tía, por llenarme el corazón de amor y el alma de energía, por ayudarme a sonreír y a creer en mí, por mantenerme cerquita aún estando tan lejos, por tanto amor, por permitirme ser partícipe de sus logros y sus tropezones. Los amo con toda el alma.
- A mi familia de corazón, Roberto, Miriam, Romina, Gustavo, Simoncito, Nona Gladys, Yeyé, Marta, Glin, Gordo, gracias! Si supieran lo importante que es tenerlos presente. A ellos, una mano, un ratito de su tiempo, un llamado, un mate, una comida, un espacio, un lugar, un oído. Por su confianza depositada en mí, por su ayuda, por su apoyo en los buenos y no tan buenos momentos, por ser una gran familia e incondicional. Por dejarme entrar en sus corazones y darme amor.

- A Luna y Sol, por ser fieles, por compartir su pelotita con mi tesis, porque ahora tengo una en los pies y una en upa, dándome su apoyo para que sean más cálidos los momentos cruciales de la escritura. Por su amor, sus ladridos de alegría al verme regresar a casa de la universidad, por esperarme con sus besos y recordarme que ellas siempre están.
- A los “microbios”, mis amigos de la carrera, los de para toda la vida, por apoyarme en mis decisiones, por ser parte de mis sueños, por respetar mis prioridades, por aconsejarme cuando se los pido, por estar aún estando repartidos por todo el mundo. Por quererlos como los quiero. Por la complicidad. Porque en ellos puedo refugiarme y con ellos puedo escapar. Por ser adultos con alma de niños, disfrutando el milagro de la vida. Por las sobremesas. Por tanto, a ellos gracias. Porque más que amigos son parte de mi familia. Porque los logros de uno son los logros de todos.
- A los chicos del lab, mis amigos del lab, con quienes comparto risas, lágrimas, nuestras familias. Por ser un gran grupo de personas, por su buen humor, por su buena predisposición, por pensar en un futuro mejor como grupo. Por permitirme crecer, formarme a su lado. Por acompañarme, por estar, independientemente de lo laboral, nunca voy a olvidar cuando más los necesité ahí estuvieron, y eso habla más que de un grupo de trabajo, habla de un excelente grupo humano, con diferencias, con discrepancias, pero con los mismos valores. Porque los espacios físicos ya no son los mismos pero el almuerzo sigue siendo uno, una sobremesa, un grupo de amigos, trabajando distinto, compartiendo lo mismo. Por ser y dejarme ser parte de esta gran familia, porque este grupo sale del laborotario y sigue siendo un grupo! Gracias!
- A las mujeres del cyber, Sole F., Lili, Sole A. y Lau, con quienes comparto la mayor parte del día, que decirles amigas! Gracias, suena a poco... me han dado mucho en lo personal, han estado siempre ahí, firmes. Gracias por las largas charlas, por los ensayos compartidos, por los mates, por la comida, por los

mejores viernes, por darme varios empujoncitos, por el aguantar mis rayetas, por sacarme más de una vez una sonrisa, por ser un motivo para ir y ponerle ganas a los lunes, martes...Gracias!

- A María y Fran, mi familia de España, esas almas que gracias al doctorado conocí y con quienes me encariñe. Esos amigos únicos que en una estancia en Sevilla me los gané, dos seres maravillosos e incondicionales, personas que estando “del otro lado del charco” no han faltado un día. Aquellos que hacen que el teléfono suene por cualquier motivo. Dos amigos que la vida me regaló a los que agradezco, simplemente les agradezco...los quiero...
- A Ale, un gran amigo que los pasillos de la universidad hicieron que conozca y que hoy esté entre las personas que quiero agradecer. Un ser especial. Gracias por ser tan buen amigo, amigo con todas las letras, por estar, por ayudarme, por ser partícipe de la vida diaria y de la académica, por darme más de una vez una mano, un tiempito y escucharme. Por los WA a cualquier hora haciendo las cosas más llevaderas. Por ser ese amigo de hoy pero de años. Gracias.
- A mis ángeles, por las cicatrices que han marcado en mí por su paso por la tierra. Cicatrices repletas de enseñanzas, de felicidad, de amor, de risas, de valores. Por la mano que me extienden desde el cielo. A un ángel en particular, mi Yaya, mi vieja hermosa, mi alma, darle gracias porque los ensayos que se llevaron y que aún se llevaran a cabo se hicieron y se harán en frascos que “por las dudas petisa mía” los guardó...72 frascos, y con eso digo gracias! Quien pudiera hoy tenerla en la defensa y que viera lo útil que fueron esos frascos!
- A Gloria y Norberto, por compartir ese corazón enorme, por estar siempre, por ser grandes personas, por todo lo que me han brindado. Gracias!

- A Adriana, mi directora, por permitirme hacer el doctorado en este maravilloso grupo de trabajo, por dejarme ser parte de él. Gracias por su compromiso diario, el cual valoro y aprecio, por la gran dedicación que me brindó. Por permitirme aprender de su experiencia. Por encontrar soluciones, resolver problemas, y hacer que esta tesis tenga un buen final. Por haberme acompañado y apoyado a lo largo de estos 5 años. Por seguir apostando en mí y solicitar una posdoc. Gracias!
- A Stella, por estar siempre dispuesta a ayudar, por los mates, por las charlas.
- A Rosita, formalmente la señora decana de la facultad, por darme un lugarcito, por dejarme ser como soy, por permitir que piense lo que piense, por escuchar lo que digo, y por sobre todo respetar mis ideologías. Porque podemos ser muy distintas y sentarnos con un mate y pasar largas horas. Por tenerme en cuenta en proyectos, en tutorías, en ArtExactas, por pensar en mí como una participante activa de la UNRC. Y por luchar por nuestros amigos los animales. Por salvarme más de una vez “las papas” en lo académico y lo personal. Gracias!
- A los chicos, y cito a uno de ellos, del laboratorio de al lado, Walter, Fer, Dani, Agus, MariCruz, Juan Pablo, Edgardo y Sonia por la gran ayuda diaria, por compartir teoría y práctica, por colaborar para que algo salga, por la buena predisposición.
- Al lab 23, Pablo, Ceci, Anita, Ale, Fabri, Diego, Flor, Vir, por estar siempre ahí, por escucharme, aún sin tener ni una milésima que ver nuestras investigaciones, por estar siempre dispuestos a compartir, por los momentos gratos, por el tiempo brindado, por ser parte de esta experiencia, de mi formación como persona por sobre todo.

- A Eli, Patricia y Mario, por aceptar formar parte de la comisión evaluadora y ser miembros del jurado de esta tesis. Por llevar a cabo su rol con compromiso, dedicación y seriedad. Por haberme acompañado en este proyecto.
- A la Universidad Nacional de Río Cuarto, por darme el espacio físico para crecer y formarme tanto en lo profesional como en lo personal. A todo el pueblo argentino que con sus aportes hacen que esta universidad sea posible, que mantenga sus puertas abiertas y que el sueño de varios aún sea alcanzable.
- Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por brindarme la beca de posgrado para llevar a cabo la carrera de posgrado, el doctorado en Cs. Biológicas.

...Gracias a todos los que de seguro peco en no nombrarlos porque probablemente la memoria me jugó una mala pasada, pero que han hecho que este doctorado sea posible, a quienes con poco o mucho han colaborado en el día a día, a todos...

Gracias, Muchas Gracias!



En la actualidad, está ampliamente aceptado el rol de las especies reactivas del oxígeno (EROs), la participación de los factores de nodulación (FN) en la modulación de la generación de dichas especies, así como también la importancia del sistema antioxidante vegetal y bacteriano en los procesos de señalización durante las primeras etapas de la interacción entre rizobios y leguminosas invadidas a través de la formación de hilos de infección (HI). Sin embargo, en leguminosas infectadas de manera intercelular, sin formación de HI, la existencia de dichos procesos no ha sido aún reportada. En estas leguminosas, la colonización rizobiana ocurre en los puntos de emergencia de las raíces laterales o adventicias, y los rizobios invaden directamente las células de la corteza radical. Este tipo de infección ocurre en maní (*Arachis hypogaea* L.), una especie vegetal de gran importancia agroeconómica para la provincia de Córdoba. Esta leguminosa es capaz de establecer una asociación simbiótica fijadora de nitrógeno con bacterias del género *Bradyrhizobium*. El objetivo principal de esta tesis fue elucidar, en la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp., la existencia y el requerimiento de un estallido oxidativo, la participación de los FN en la modulación de esta respuesta de defensa, así como la importancia del sistema antioxidante de la planta y bacteriano para el establecimiento de dicha interacción. La evaluación de la generación de EROs permitió demostrar que en las etapas tempranas de dicha simbiosis se produce un estallido oxidativo independiente de la actividad de la enzima NADPH oxidasa, el que es requerido para el normal fenotipo simbiótico. Además, la activación del sistema antioxidante de la planta, en particular, de la actividad de las enzimas peroxidasas (PX) y catalasa (CAT), modularía el estallido oxidativo, permitiendo así el establecimiento de la interacción. Por otra parte, los FN sintetizados por *Bradyrhizobium* sp. participarían no sólo en la inducción de la cascada de señalización simbiótica, sino que además contribuirían a contrarrestar el estallido oxidativo, incrementando la actividad de enzimas del sistema antioxidante de la planta de maní y, en el caso de las PX, aumentando incluso los niveles de expresión del gen *prx1*. Por último, el sistema antioxidante de bradirizobios simbiotes de maní, particularmente la actividad de las enzimas PX, es importante para contrarrestar el estallido oxidativo producido durante las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. La comparación de la información obtenida en esta tesis con la disponible para leguminosas infectadas vía HI revela que, en contraste con lo que ocurre en las leguminosas infectadas de manera intracelular, en maní la respuesta mediada por EROs que se activa frente al microorganismo está representada sólo por un pico de incremento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y es independiente de la actividad NADPH oxidasa. Tomados en conjunto, nuestros resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre el mecanismo implicado en el desarrollo de la interacción simbiótica que establecen las leguminosas infectadas de manera intercelular.





There is now compelling evidence about the role of reactive oxygen species (ROS), the participation of Nod Factors (NF) in the generation modulation of these species as well as the importance of the antioxidant and bacterial system in signaling processes during the early stages of the symbiotic interaction between rhizobia and legumes invaded by the formation of intracellular infection threads (IT). However, the existence of these processes has not been reported in legumes infected intercellularly, with no formation of IT. In these legumes rhizobia colonization occurs at emergence points of lateral and adventitious roots, and rhizobia directly invade the cells of root cortex. This mode of infection is observed in peanut (*Arachis hypogaea* L.), a plant species of great economic and agricultural importance in Córdoba. This legume is capable of establishing a nitrogen-fixing symbiotic association with bacteria of the genus *Bradyrhizobium*. The main purpose of this thesis was to determine, in the peanut-*Bradyrhizobium* sp. symbiosis, the existence and requirement of oxidative burst, the participation of NF in the modulation of this defense response, and the importance of the plant's antioxidant and bacterial system in the development of the interaction. The evaluation of ROS generation allowed us to demonstrate that in the early stages of the nitrogen-fixing symbiosis an oxidative burst is produced, independent of the NADPH-oxidase enzyme activity, which is required for the normal symbiotic phenotype. In addition, the activation of the plant's antioxidant system, in particular the activity of peroxidase (PX) and catalase (CAT) enzymes, may modulate the oxidative burst, thus enabling the establishment of the interaction. Furthermore, NF synthesized by *Bradyrhizobium* sp. not only participate in the induction of the symbiotic signaling cascade but also contribute to counteract the oxidative burst, increasing the activity of enzymes of the peanut plant's antioxidant system and, in the case of PX, increasing even the expression levels of the gene *prx1*. Finally, the antioxidant system of peanut bradirizobios symbionts, particularly the activity of PX enzymes, is important to counteract the oxidative burst produced during the early stages of peanut-*Bradyrhizobium* sp. interaction. A comparison of the results obtained in this thesis with those previously reported in relation to legumes infected via IT reveals that, in contrast to what occurs in legumes infected in intercellular manner, in peanut the response mediated by ROS, which is activated against the microorganism, is represented only by a peak increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and is independent of NADPH-oxidase activity. In synthesis, our results provide new knowledge about the mechanism involved in the development of the symbiotic interaction established by legumes infected in an intercellular manner.



# Índice

	Página
<b>Capítulo I: Introducción</b>	<b>1- 45</b>
<b>La fijación biológica de Nitrógeno.</b>	<b>1-25</b>
Fuentes de nitrógeno para el crecimiento de la planta	2
Fijación Biológica de Nitrógeno	3
Fijación Biológica de Nitrógeno en simbiosis. Interacción leguminosas-rizobios	5
Etapas del proceso de FBN en simbiosis	7
1) Intercambio de señales químicas entre la planta y el microorganismo	7
2) Infección rizobiana de los tejidos vegetales	10
a) <i>Mediante hilos de infección</i>	10
b) <i>Crack entry</i>	15
c) <i>Intercelular</i>	16
3) Proceso de fijación de nitrógeno	18
Asociación simbiótica <i>Arachis hypogaea</i> L.-rizobios	21
- <i>El macrosimbionte: Arachis hypogaea</i> L.	21
- <i>El microsimbionte: Bradyrhizobium sp.</i>	24
<b>Las especies reactivas del oxígeno en la interacción planta-microorganismos</b>	<b>26-45</b>
Especies reactivas del oxígeno (EROs): Generación y detoxificación en plantas	27
- <i>Características generales de las EROs</i>	27
- <i>Características generales del sistema antioxidante</i>	28
- <i>Mecanismos de generación de EROs</i>	32
Producción de EROs durante las interacciones plantas-microorganismos	33
Importancia de las EROs en la simbiosis rizobios-leguminosas	35
- <i>Rol de la enzima NADPH oxidasa en la simbiosis rizobios-leguminosas</i>	39

- <i>Importancia del sistema antioxidante de la leguminosa huésped en la simbiosis rizobios-leguminosas</i>	41
- <i>Importancia del sistema antioxidante del microsimbionte en la simbiosis rizobios-leguminosas</i>	42
- <i>La enzima SOD</i>	43
- <i>La enzima CAT</i>	43
- <i>Glutaredoxinas</i>	44
- <i>Glutathion sintetasa</i>	45
<b>Capítulo II: Hipótesis y Objetivos</b>	46
<b>Hipótesis</b>	46
<b>Objetivo General</b>	46
<b>Objetivos Específicos</b>	46
<b>Capítulo III: Materiales y Métodos</b>	47-59
<b>Cepas bacterianas</b>	47
<b>Medios de cultivo</b>	47
<b>Conservación de las cepas bacterianas</b>	48
<b>Obtención y análisis de FN</b>	49
<b>Esterilización superficial y germinación de semillas de maní</b>	49
<b>Obtención de raíces inoculadas</b>	50
<b>Evaluación de la actividad biológica de los FN de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144</b>	50
<b>Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nódulos o raíces de plantas de maní</b>	51
<b>Cuantificación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en raíces de plantas de maní</b>	51
<b>Detección histoquímica de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup></b>	52
<b>Extracción de proteínas de raíces de plantas de maní</b>	52
<b>Determinación de la actividad de las enzimas SOD, CAT, PX y NADPH oxidasa en raíces de plantas de maní</b>	53
<b>Cuantificación de proteínas</b>	54

<b>Evaluación del estallido oxidativo en la interacción maní- <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en presencia de nitrógeno asimilable</b>	<b>54</b>
<b>Evaluación del rol de las EROs en la interacción maní-<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144</b>	<b>55</b>
- <i>Evaluación de la interacción simbiótica en presencia de CAT exógena</i>	<b>55</b>
- <i>Evaluación de la interacción simbiótica en presencia de KI</i>	<b>55</b>
- <i>Evaluación de la ultraestructura de nódulos mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)</i>	<b>56</b>
- <i>Técnica de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR)</i>	<b>56</b>
<b>Evaluación de la expresión del gen <i>prx1</i> en plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 o <i>Bradyrhizobium</i> sp. V<sub>2</sub></b>	<b>57</b>
- <i>Obtención de raíces de plantas de maní</i>	<b>57</b>
- <i>Extracción de ARN total</i>	<b>57</b>
- <i>Obtención de Cdna</i>	<b>57</b>
- <i>Ensayo de real time PCR (qReal-Time PCR)</i>	<b>57</b>
<b>Inhibición de la actividad de peroxidasas bacteriana mediante la adición de Ácido Salicilhidroxámico (SHAM)</b>	<b>58</b>
- <i>Determinación de la viabilidad de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia de SHAM</i>	<b>58</b>
- <i>Determinación de la actividad PX en <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia de SHAM (0,2 mM)</i>	<b>58</b>
- <i>Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia de SHAM</i>	<b>59</b>
- <i>Evaluación del fenotipo simbiótico</i>	<b>59</b>
<b>Análisis de datos</b>	<b>59</b>
<b>Capítulo IV: Resultados y Discusión. Objetivo 1</b>	<b>60-70</b>
<b>Generación de EROs y rol del sistema antioxidante vegetal en las etapas tempranas de la interacción maní-<i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	<b>60</b>

- <i>Determinación de la producción cuantitativa y cualitativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> en las etapas tempranas de la interacción maní-Bradyrhizobium sp.</i>	60
- <i>Evaluación del estallido oxidativo en la interacción maní-Bradyrhizobium sp. en presencia de nitrógeno asimilable</i>	64
- <i>Determinación de la participación de la NADPH oxidasa en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la interacción maní-Bradyrhizobium sp.</i>	66
- <i>Rol del sistema antioxidante de maní en la interacción simbiótica con Bradyrhizobium sp.</i>	68
<b>Capítulo V: Resultados y Discusión. Objetivo 2</b>	<b>71-85</b>
<b>Rol de los FN sintetizados por <i>Bradyrhizobium sp.</i> en la modulación del estallido oxidativo y del sistema antioxidante en maní durante las etapas tempranas de la interacción</b>	<b>71</b>
- <i>Análisis de la composición química y actividad biológica de los FN producidos por Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144</i>	71
- <i>Determinación de la participación de los FN en la producción del estallido oxidativo durante las etapas tempranas de la interacción maní-Bradyrhizobium sp.</i>	75
- <i>Determinación de la participación de la NADPH oxidasa en la generación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> en plantas de maní inoculadas con Bradyrhizobium sp. V<sub>2</sub></i>	80
- <i>Evaluación de la participación de los FN en la modulación del estallido oxidativo en la interacción maní-Bradyrhizobium sp.</i>	81
<b>Capítulo VI: Resultados y Discusión. Objetivo 3</b>	<b>86-95</b>
<b>Determinación del requerimiento de la producción de EROs para la nodulación de plantas de maní.</b>	<b>86</b>
- <i>Evaluación de la disminución de los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con el agregado de KI o de la enzima CAT</i>	86
- <i>Evaluación del fenotipo simbiótico en presencia de KI o CAT</i>	88

<b>Capítulo VII: Resultados y Discusión. Objetivo 4</b>	<b>96-101</b>
<b>Evaluación del rol del sistema antioxidante bacteriano en la interacción maní-<i>Bradyrhizobium</i> sp.</b>	<b>96</b>
- <i>Evaluación de la inhibición de la actividad de enzimas peroxidasas de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 con el agregado de SHAM</i>	<b>96</b>
- <i>Evaluación de la importancia del sistema antioxidante de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 para el establecimiento de la interacción simbiótica</i>	<b>98</b>
<b>Capítulo VIII: Conclusiones</b>	<b>102-107</b>
<b>Capítulo IX: Bibliografía</b>	<b>108-131</b>

## Índice de Figuras

	Página
<b>Figura 1.</b> Organismos que fijan el nitrógeno en vida libre o en asociación con otros organismos.	4
<b>Figura 2.</b> Clasificación taxonómica de rizobios.	6
<b>Figura 3.</b> Diálogo molecular entre el microsimbionte y el macrosimbionte que culmina con la formación del nódulo.	7
<b>Figura 4.</b> Estructura molecular básica de los flavonoides.	8
<b>Figura 5.</b> Modelo esquemático de la estructura de los factores Nod.	10
<b>Figura 6.</b> Infección de las raíces mediante la formación de hilo de infección.	11
<b>Figura 7.</b> Eventos moleculares asociados a las etapas tempranas de la interacción.	14
<b>Figura 8.</b> Infección por crack entry de las raíces de <i>Sesbania rostrata</i> y <i>Neptunia</i> spp.	16
<b>Figura 9.</b> Infección de las raíces de <i>Arachis</i> .	18
<b>Figura 10.</b> Intercambio de moléculas entre la planta huésped y el bacteroide en el proceso de FBN.	20
<b>Figura 11.</b> Planta de Maní.	22
<b>Figura 12.</b> Reducción univalente del oxígeno.	27
<b>Figura 13.</b> Daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN inducido por EROs.	29
<b>Figura 14.</b> Representación esquemática de la generación de EROs en las plantas.	32
<b>Figura 15.</b> Sitios de producción de EROs en las plantas.	33
<b>Figura 16.</b> Representación esquemática de la cinética de producción y acumulación de EROs en la interacción planta- patógeno.	34
<b>Figura 17.</b> Determinación cualitativa de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con <i>Bradryrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	62
<b>Figura 18.</b> Determinación cualitativa de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en raíces de maní inoculadas con <i>Bradryrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	63

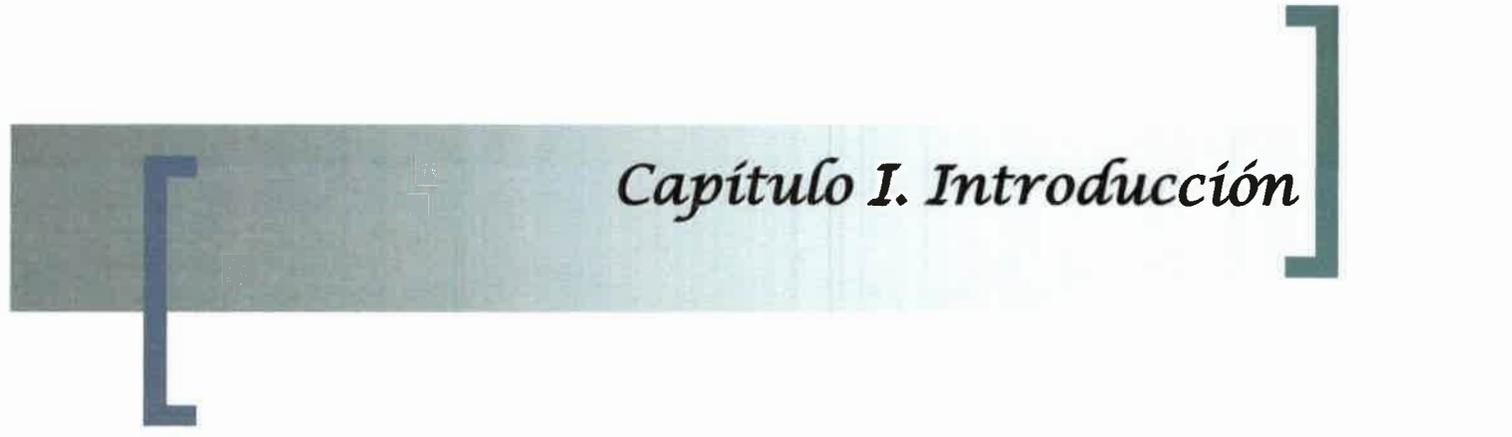
<b>Figura 19.</b> Variaciones entre los niveles de actividad CAT y la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	<b>69</b>
<b>Figura 20.</b> Factor Nod producido por <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 (simbionte de maní) en presencia de genisteína.	<b>72</b>
<b>Figura 21.</b> Evaluación de la actividad biológica de los FN de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	<b>73</b>
<b>Figura 22.</b> Determinación cualitativa de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 o con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> .	<b>76</b>
<b>Figura 23.</b> Determinación cualitativa de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en raíces de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 o con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> .	<b>77</b>
<b>Figura 24.</b> Variaciones de los niveles de actividad PX y de la concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>	<b>83</b>
<b>Figura 25.</b> Niveles relativos de transcritos de <i>prx1</i> en raíces de plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	<b>84</b>
<b>Figura 26.</b> Niveles relativos de transcritos de <i>prx1</i> en raíces de plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> .	<b>85</b>
<b>Figura 27.</b> Evaluación de cortes semifinos (± 0,25 μm) de nódulos radicales de plantas de maní. Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR).	<b>91</b>
<b>Figura 28.</b> Evaluación de cortes semifinos (± 0,25 μm) de nódulos radicales de plantas de maní. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).	<b>92</b>
<b>Figura 29.</b> Crecimiento de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en medio YEM suplementado con 0,2, 0,5, 1 o 2 mM de SHAM.	<b>97</b>
<b>Figura 30.</b> Determinación de la actividad PX de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM.	<b>98</b>
<b>Figura 31.</b> Modelo propuesto del rol de EROs, la participación de los FN en su producción y la importancia del sistema antioxidante de la planta y bacteriano en la simbiosis maní- <i>Bradyrhizobium</i> sp.	<b>106</b>

## Índice de Tablas

	Página
<i>Tabla 1.</i> Principales enzimas y compuestos no enzimáticos del sistema antioxidante, su localización y función en las células vegetales.	30
<i>Tabla 2.</i> Caracterización funcional de genes involucrados en la expresión de la enzima NADPH oxidasa durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.	40
<i>Tabla 3.</i> Cepas bacterianas utilizadas.	47
<i>Tabla 4.</i> Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	61
<i>Tabla 5.</i> Concentración de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	61
<i>Tabla 6.</i> Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de plantas de maní creciendo en presencia o ausencia de KNO <sub>3</sub> 5 mM e inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	66
<i>Tabla 7.</i> Actividad NADPH oxidasa en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	67
<i>Tabla 8.</i> Actividad CAT en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	68
<i>Tabla 9.</i> Actividad PX en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	69
<i>Tabla 10.</i> Actividad SOD en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.	70
<i>Tabla 11.</i> Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144, co-inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 y <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> , o con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> y FN.	74
<i>Tabla 12.</i> Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> .	78
<i>Tabla 13.</i> Concentración de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> .	78

<i>Tabla 14.</i> Actividad NADPH oxidasa en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> .	80
<i>Tabla 15.</i> Actividad CAT en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> o tratadas con FN purificados.	81
<i>Tabla 16.</i> Actividad SOD en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> .	82
<i>Tabla 17.</i> Actividad PX en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub> o tratadas con FN purificados.	82
<i>Tabla 18.</i> Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní a los 10 min pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de CAT exógena (1.000 U ml <sup>-1</sup> )	87
<i>Tabla 19.</i> Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní a los 10 min pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI.	87
<i>Tabla 20.</i> Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de CAT exógena (1000 U ml <sup>-1</sup> ).	89
<i>Tabla 21.</i> Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI (0,5, 1,5 o 3 mM).	89
<i>Tabla 22.</i> Área de simbiosomas, área de bacteroides y número de bacteroides área celular <sup>-1</sup> de nódulos de planta de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI (0,5 ó 1,5 mM).	90
<i>Tabla 23.</i> Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en nódulos de plantas de maní inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI (0,5 ó 1,5 mM).	94
<i>Tabla 24.</i> Viabilidad de <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 cultivada en medio YEM con diferentes concentraciones de Ácido Salicilhidroxámico (SHAM) a las 120 h de crecimiento.	97
<i>Tabla 25.</i> Producción de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en raíces de maní a los 5, 10 y 15 min pos-inoculación con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM.	99

*Tabla 26.* Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM.

A decorative horizontal bar with a light blue gradient background. On the left side, there is a large, dark blue left square bracket '['. On the right side, there is a large, dark blue right square bracket ']' that partially overlaps the bar. The text 'Capítulo I. Introducción' is centered within the bar in a black, italicized serif font.

*Capítulo I. Introducción*

## La fijación biológica del nitrógeno



## Fuentes de nitrógeno para el crecimiento de las plantas

El nitrógeno es uno de los nutrientes más importantes para el desarrollo, crecimiento y supervivencia de las plantas ya que es indispensable para la síntesis de biomoléculas tales como proteínas, ácidos nucleicos, hormonas, clorofila, enzimas, entre otros.

En el suelo, el nitrógeno se encuentra en diferentes formas, siendo predominante el nitrógeno orgánico (presente en proteínas, ácidos nucleicos y azúcares) ya que representa entre el 85 y el 95% del nitrógeno total. En cambio, el nitrógeno inorgánico constituye sólo el 2% del contenido total e incluye las formas utilizables por las plantas como amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). El contenido de nitrógeno en el suelo varía según las condiciones de drenaje, vegetación, topografía, cantidad de materia orgánica, textura, y actividad agrícola realizada. Cuando se laborea un suelo, aumenta la aireación y la tasa de mineralización de la materia orgánica. Sin embargo, ocurre una pérdida de las fracciones más finas de los primeros centímetros del suelo, las cuales son las más ricas en materia orgánica. Por otra parte, con la cosecha del producto agrícola aumenta la extracción del nitrógeno del suelo. Todo esto ocasiona que el contenido de dicho nutriente disminuya con el manejo intensivo del suelo.

Otra reserva importante de nitrógeno es la atmósfera, ya que constituye alrededor del 78% del aire atmosférico. Sin embargo, en su estado gaseoso dicho nutriente no es incorporado por las plantas. Esto se debe a que se encuentra formando un gas diatómico ( $\text{N}_2$ ) con un triple enlace entre los dos átomos, que convierte a la molécula en un compuesto estable relativamente inerte.

La fijación del  $\text{N}_2$ , proceso que lo convierte en una forma química asimilable por las plantas, puede ser llevada a cabo por *procesos abióticos* (naturales) como la oxidación que se produce por los efectos de las radiaciones ultravioleta, descargas eléctricas o por combustión, mediante *síntesis química* de fertilizantes en la industria, lo cual requiere de presión y temperatura elevadas, o bien por un *proceso biológico*, conocido como Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN). Del total del nitrógeno fijado, el 10% es obtenido mediante fenómenos naturales, el 25% es aportado por la industria de fertilizantes a través de la reacción de Haber-Bosch, mientras que la contribución de la FBN representa aproximadamente el 65% del aporte global de este elemento (Baca y col., 2000).



En términos agronómicos, la deficiencia del nitrógeno reduce y retrasa el crecimiento de la planta, disminuyendo el número y peso de semillas, lo que se traduce en un menor rendimiento (Rubio-Wilhelmi y col., 2012). Para subsanar el déficit de nitrógeno y hacer rentable la actividad agropecuaria, suele recurrirse al suministro de fertilizantes nitrogenados. Entre los aspectos negativos asociados a su uso, se pueden mencionar altos costos en los insumos, simplificación de la estructura de los ecosistemas, alterando drásticamente su dinámica y sustentabilidad, modificando por lo tanto la biodiversidad, lo que afecta su fertilidad natural (López-Mosquera y col., 2011). Además, el empleo indiscriminado de fertilizantes nitrogenados (sin considerar las recomendaciones en cuanto a cantidad, tipo y etapa del cultivo en que se adicionan), puede llevar a la contaminación de aguas subterráneas, acidificación del suelo con la consecuente solubilización de metales tóxicos y efectos adversos en el ecosistema. Es relevante, por lo tanto, profundizar el estudio y maximizar el uso de una fuente alternativa de incorporación de nitrógeno como lo es la FBN.

### **Fijación Biológica de Nitrógeno**

En la actualidad, el proceso de FBN cobra importancia en la agricultura sustentable, ya que reduce el alto costo económico y ecológico que implica el uso de fertilizantes nitrogenados, contribuyendo a mantener la estructura y la materia orgánica de los suelos (Lodeiro y col., 2003). Este proceso constituye una de las vías más importantes de ingreso del nitrógeno al ecosistema, ya que posibilita la asimilación de este elemento por las plantas, las cuales lo acumulan y transfieren luego por la cadena trófica a los animales, pudiendo posteriormente incorporarse al suelo por descomposición de dichos organismos. La FBN es llevada a cabo por un grupo de microorganismos procariontes diazótrofos capaces de reducir el nitrógeno atmosférico a nitrógeno combinado mediante la enzima nitrogenasa, lo que requiere de un alto consumo de energía en forma de ATP.

La FBN, descubierta por Beijerinck en 1901, es llevada a cabo por microorganismos con diferentes estilos de vida y metabolismos (Figura 1) (Young, 1992; Raymond y col., 2004; Wagner, 2011). Entre las bacterias de vida libre pueden encontrarse: anaeróbicas obligadas o facultativas (e.j. *Clostridium pasteurianum*, *Klebsiella* spp., *Desulfovibrio* sp.), aeróbicas obligadas (e.j. *Azotobacter* spp., *Beijerinckia* sp.) y fotosintéticas (bacterias púrpuras sulfurosas y no sulfurosas, y bacterias verdes sulfurosas) (Allan y Graham, 2002). Dichos microorganismos tienen escaso rendimiento fijador ya que para obtener la energía necesaria para convertir el nitrógeno a una forma asimilable, requieren metabolizar



carbohidratos del suelo que son poco abundantes en la biósfera. Si bien la FBN en vida libre está ampliamente representada en la naturaleza, la cantidad de nitrógeno incorporado al suelo por estos microorganismos, y por lo tanto disponible para las plantas, es reducida. Por el contrario, la FBN que realizan microorganismos cuando establecen asociaciones simbióticas con otros organismos constituye una vía importante mediante la cual el nitrógeno ingresa a las redes tróficas (Baca y col., 2000). La FBN en simbiosis puede ser llevada a cabo por distintos organismos procariotas (Martínez-Romero y Phillips, 2000):

1. cianobacterias que ocupan tejidos de hepáticas, helechos, cícadas y dicotiledóneas;
2. actinomicetes representados por *Frankia*, que forman nódulos en muchas plantas no leguminosas de varias familias que incluyen a los géneros *Alnus* y *Purshia*;
3. rizobios, bacterias Gram negativas del suelo, capaces de invadir las raíces o tallos de plantas leguminosas, y excepcionalmente de la no leguminosa *Parasponia*, induciendo la formación de estructuras especializadas llamadas nódulos.

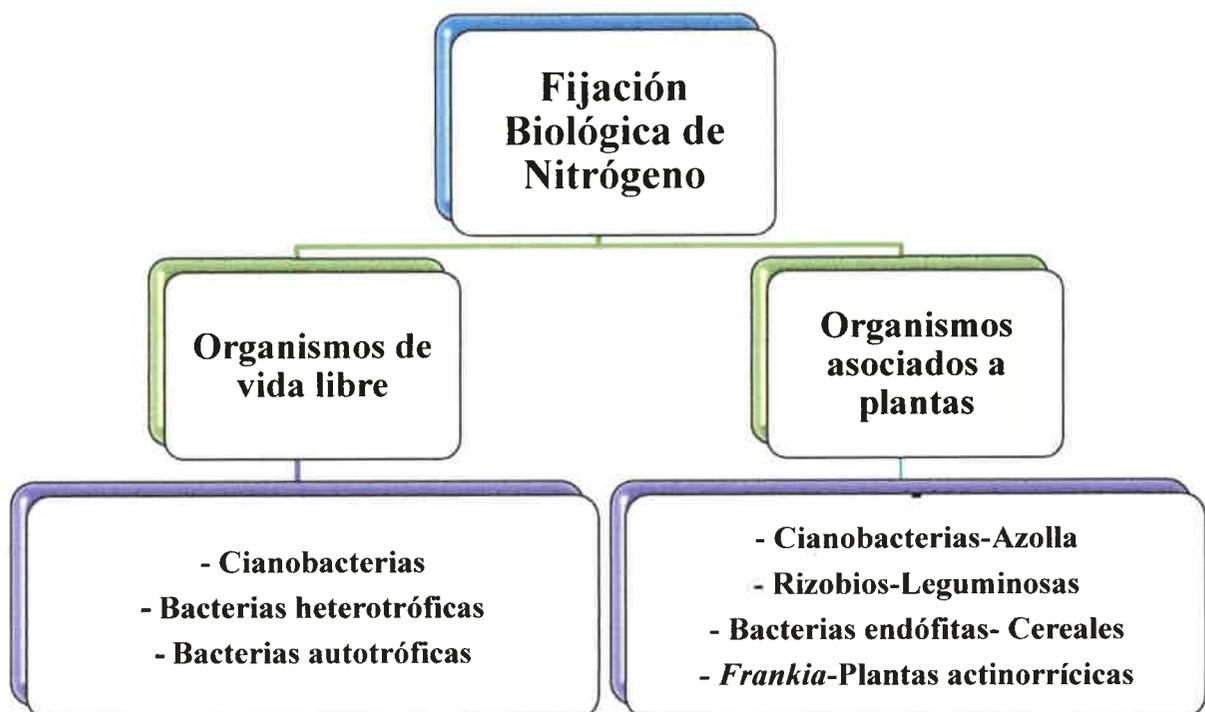


Figura 1. Organismos que fijan el nitrógeno en vida libre o en asociación con otros organismos. Modificado de Wagner, 2011.

## **Fijación Biológica de Nitrógeno en simbiosis. Interacción leguminosas-rizobios**

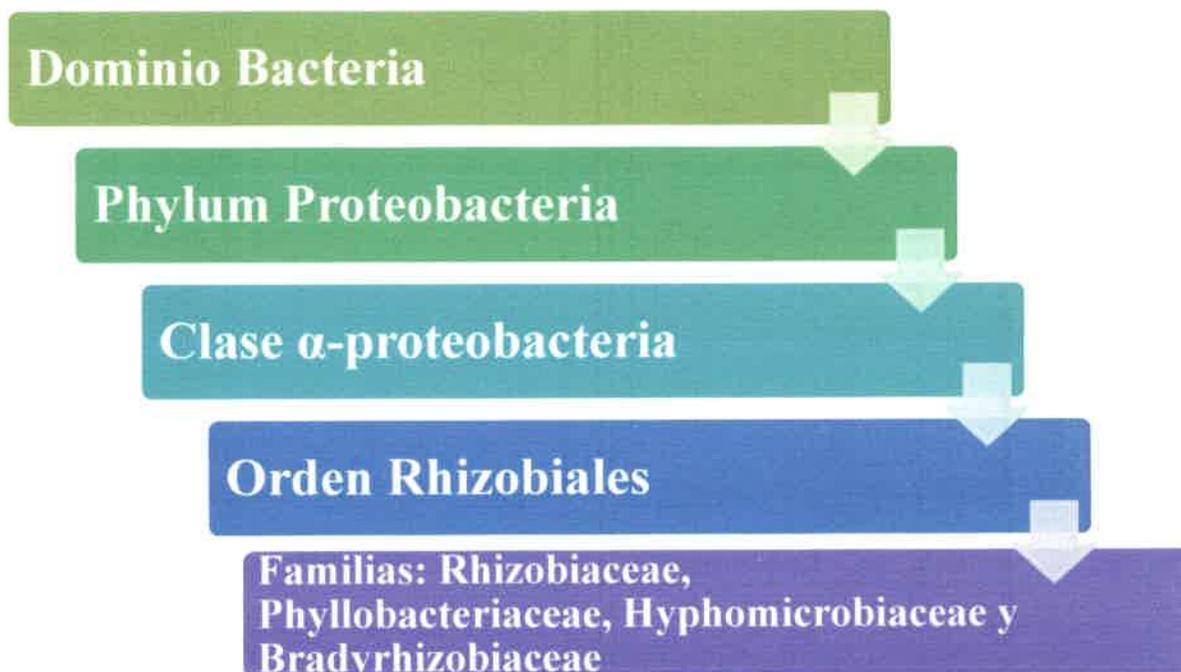
La simbiosis entre plantas de la familia de las leguminosas (Fabaceae) y las bacterias fijadoras de nitrógeno denominadas rizobios parece haber aparecido hace 60 millones de años (Sprent y James, 2008; Doyle, 2011). Dicha simbiosis es de gran importancia ecológica ya que aporta una cuarta parte del nitrógeno fijado anualmente en la tierra (200 millones de toneladas) (Peoples y col., 2009). En esta interacción, las leguminosas adquieren nutrientes nitrogenados mientras que los rizobios obtienen fuentes carbonadas provenientes de la fotosíntesis realizada por la planta huésped.

La interacción simbiótica rizobios-leguminosas resulta en la formación de nódulos en la raíz y excepcionalmente en el tallo como ocurre en *Sesbania rostrata* (Dreyfus y col., 1988) y *Aeschynomene* spp. (Alazard, 1985). Este nuevo órgano, es una estructura especializada ocupada por bacterias diferenciadas llamadas bacteroides, los que, gracias al complejo enzimático nitrogenasa, son capaces de catalizar la reducción de nitrógeno atmosférico a amonio, el cual puede ser utilizado por la planta huésped (Broughton y col., 2000). Los nódulos maduros pueden ser *indeterminados*, los que se diferencian, entre otras características, por su forma alargada y cilíndrica, a menudo ramificados, ya que contienen un meristema apical persistente, o *determinados*, los que carecen de dicho meristema por lo que su crecimiento se basa en la expansión y no en la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica en vez de cilíndrica (Crespi y Gálvez, 2000).

Los rizobios constituyen un grupo filogenéticamente diverso, ubicado en el Phylum Proteobacteria que, dentro del Dominio Bacteria, es hasta ahora el más diverso (Rappé y Giovannoni, 2003). Este Phylum agrupa a 5 clases designadas como  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ . Dentro de las  $\alpha$  Proteobacterias, los rizobios se ubican en el orden *Rhizobiales*, que comprende a las familias Rhizobiaceae, Phyllobacteriaceae, Hyphomicrobiaceae y Bradyrhizobiaceae (Figura 2) (Madigan y col., 2000). Los géneros *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* (actualmente denominado *Ensifer*, (Willems y col., 2003)) se incluyen en la familia Rhizobiaceae (Young, 2010), *Mesorhizobium* y *Phyllobacterium* en Phyllobacteriaceae, *Azorhizobium* se ubica en la familia Hyphomicrobiaceae y el género *Bradyrhizobium* en la familia Bradyrhizobiaceae. Además, se han descrito cepas simbióticas de varias especies de leguminosas, pertenecientes a diversos géneros bacterianos, incluyendo *Devosia neptuniae* (Rivas y col., 2002), *Methylobacterium nodulans* (Sy y col., 2001), *Ochrobactrum lupini* (Trujillo y col., 2005), *Ochrobactrum cytisi* (Zurdo-Pinheiro y col., 2007) y *Shinella*



*kummerowiae* (Lin y col., 2008). Asimismo se han identificado bacterias dentro de la clase  $\beta$  Proteobacteria, de los géneros *Burkholderia* y *Wautersia*, (anteriormente *Ralstonia*) (Vanechoutte y col., 2004; Lammel y col., 2013), que son capaces de ocupar nódulos de leguminosas y fijar nitrógeno, (Chen y col., 2001; Moulin y col., 2001; Chen y col., 2003; Chen y col., 2005; Verstraete y col., 2013). Estudios recientes han demostrado que los  $\beta$ -rizobios son predominantes en las leguminosas tropicales de América del Sur (dos Reis y col., 2010; Gyaneshwar y col. 2011).



**Figura 2.** Clasificación taxonómica de rizobios.

Las leguminosas, por su parte, constituyen una familia numerosa y diversa de plantas dicotiledóneas (Fabaceae) capaces de establecer simbiosis fijadora de nitrógeno con los rizobios. Esta característica les otorga una mayor competencia para su desarrollo en suelos deficientes en nitrógeno mineral. Las leguminosas presentan frutos característicos en forma de vaina en cuyo interior se encuentran las semillas. Esta familia representa el tercer grupo más numeroso de las angiospermas y comprende a su vez a las subfamilias Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoideae (Allen y Allen, 1981), que agrupan a 12.000 especies con capacidad fijadora de nitrógeno. Sin embargo, la asociación simbiótica es especialmente frecuente en las subfamilias Papilionoideae y Mimosoideae (Sprent, 2003).

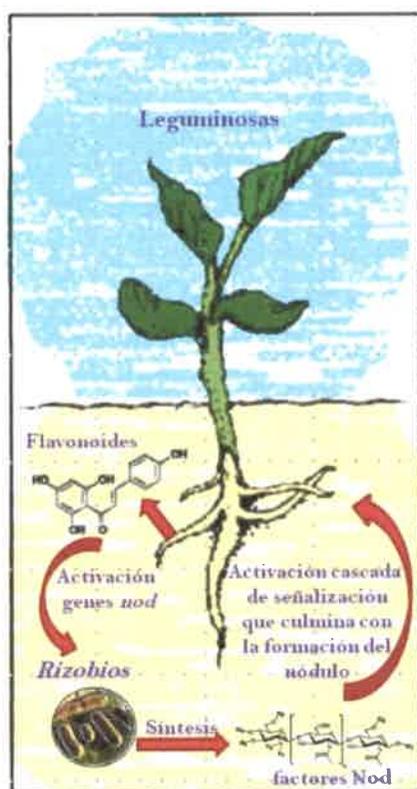
### Etapas del proceso de FBN en simbiosis

El establecimiento de la simbiosis leguminosa-*Rhizobium* que culmina con la formación de nódulos, implica un complejo programa de desarrollo, en el que se pueden distinguir tres etapas independientes pero estrechamente coordinadas:

- 1) Intercambio de señales químicas entre la planta y el microorganismo.
- 2) Infección de la planta por parte de la bacteria.
- 3) Proceso de fijación de nitrógeno.

#### **1) Intercambio de señales químicas entre la planta y el microorganismo.**

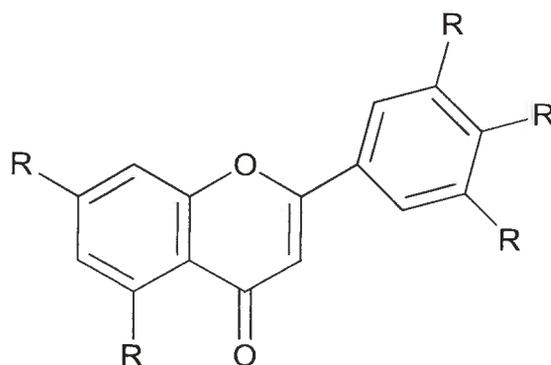
La interacción simbiótica fijadora de nitrógeno entre los microsimbiontes (rizobios) y el macrosimbionte (leguminosa), comienza con un complejo diálogo molecular específico que involucra señales de naturaleza química producidas por ambos socios (Figura 3).



**Figura 3.** Diálogo molecular entre el microsimbionte y el macrosimbionte que culmina con la formación del nódulo. Los rizobios se multiplican en la rizósfera. Las plantas liberan sustancias quimiotácticas como flavonoides, que atraen a los rizobios. Los rizobios liberan factores Nod en repuesta a la percepción de dichas sustancias. Luego estos factores desencadenan una serie de respuestas en las plantas, que culmina con la formación de los nódulos. Dentro de estas estructuras los rizobios, diferenciados en bateroides, fijan nitrógeno.

Entre el 10% y el 30% de los fotosintatos producidos por la planta es translocado a la raíz y liberado, como exudados radicales, a la rizósfera (Bais y col., 2002). Esta es definida como la porción del suelo que está íntimamente asociada a las raíces de plantas en crecimiento, y presenta propiedades físicas, químicas y biológicas particulares.

Los exudados radicales están constituidos por una enorme variedad de compuestos químicos entre los que se incluyen carbohidratos, ácidos orgánicos, vitaminas, aminoácidos y derivados fenólicos (Bowen y Rovira, 1999; Bertin y col., 2003). Entre estos últimos se encuentran los flavonoides (Figura 4), metabolitos secundarios de bajo peso molecular que no contienen nitrógeno y que, a diferencia de los metabolitos primarios, no son indispensables para la supervivencia de la planta. Ellos cumplen diferentes roles en la fisiología de la planta, entre los que se destacan su influencia en el transporte de hormonas vegetales (Peer y Murphy, 2007), en la respuesta de defensa (Treutter, 2005), en la modulación de los niveles de las especies reactivas del oxígeno (Taylor y Grotewold, 2005; Bais y col., 2006; Buer y col., 2010), en la protección frente a la radiación UV (Robson y col., 2014) y en la organogénesis del nódulo (Wasson y col., 2006; Zhang y col., 2009). La estructura base de los flavonoides es un esqueleto C6-C3-C6, el que puede modificarse mediante la adición de grupos funcionales, por lo que constituyen una familia muy diversa de moléculas definidas para cada especie vegetal, conociéndose 9.000 variantes estructurales (Williams y Grayer, 2004). Recientemente, Kováčik y Klejdus (2014) informaron que el desbalance de nitrógeno disponible para la planta desencadena una modificación en la acumulación de los compuestos fenólicos, estimulando la producción de flavonoides específicos.



**Figura 4.** Estructura molecular básica de los flavonoides. Los radicales R indican los posibles sitios de modificaciones y adiciones de grupos funcionales que varían de acuerdo a la especie vegetal que los produce.

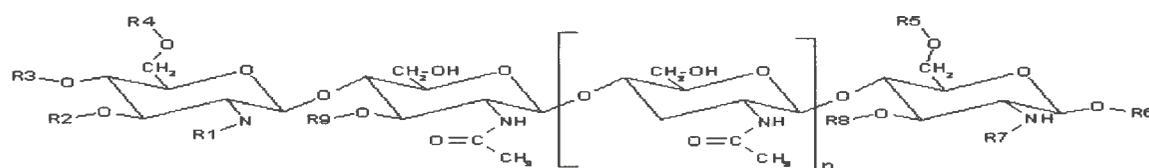
La señalización inicial entre la leguminosa huésped y su simbiote está mediada por los flavonoides. La respuesta de los rizobios a dichas moléculas varía de acuerdo a las concentraciones en que estos compuestos se encuentren. Así, en concentraciones nanomolares, los flavonoides inducen quimiotaxis en los rizobios (Aguilar y col., 1988; Kape y col., 1992; Caetano-Anollés y col., 1992), mientras que en concentraciones micromolares activan en los rizobios la expresión de los “genes *nod*” responsables de la síntesis de FN (Sanchez y col., 1991; Downie, 1998). Además, diversos estudios proponen que diferentes tipos de flavonoides juegan un papel importante en distintas etapas del desarrollo de los nódulos (Wasson y col., 2006; Subramanian y col., 2007; Zhang y col., 2009). Sin embargo, estos compuestos no son requeridos para el desarrollo de otros órganos como por ejemplo raíces laterales (Wasson y col., 2009).

El término “genes *nod*” se aplica de forma genérica a un grupo de genes rizobianos involucrados en la nodulación (*noe*, *nol* y *nod*) (Downie, 1998). En la mayoría de los rizobios de crecimiento rápido (géneros *Rhizobium* y *Sinorhizobium*), los genes de nodulación están localizados en un plásmido simbiótico (pSym). En los rizobios pertenecientes a los géneros *Bradyrhizobium* y *Mesorhizobium*, los genes *nod* son cromosomales y se encuentran agrupados en un fragmento de alrededor de 400 kb, denominado isla simbiótica, que podría ser móvil (Sullivan y Ronson, 1998; Göttfert y col., 2001). Más de 50 genes involucrados en la biosíntesis, modificación, regulación, transporte y secreción de los FN han sido identificados (Lloret y Martínez Romero, 2005).

Los FN son quitoooligosacáridos cortos con sustituciones en los extremos reductores y no reductores, definidos como lipoquitoooligosacáridos de N-acetil-D-glucosamina N-acilados (Denarié y col., 1996). El proceso de síntesis de este esqueleto comienza con el reconocimiento de los flavonoides por la proteína bacteriana NodD, miembro de la familia LysR. Esta interacción resulta en el cambio conformacional de dicha proteína y su unión a la caja *nod*, induciendo de este modo la expresión de los genes *nodABC*, responsables de la síntesis del esqueleto básico y común de los FN rizobianos. El gen *nodA* codifica para una acil-transferasa, *nodB* tiene como producto una desacetilasa, y *nodC* codifica para una enzima que posee actividad de  $\beta$ -glucosiltransferasa (Lloret y Martínez Romero, 2005). Los FN pueden sufrir modificaciones químicas dando como resultado una diversidad estructural de dichas moléculas. Estas modificaciones (metilaciones, acetilaciones, sulfataciones y glucosilaciones) están generadas por la sumatoria de actividades de genes específicos de cada



especie rizobiana como *nodH* (que codifica para una sulfotransferasa que transfiere un grupo sulfato al extremo reductor) y *nodZ* (cuyo producto es una fucosil transferasa que añade fucosa al extremo reductor), entre otros. Las variaciones en la estructura de los FN establecen la especificidad de la planta huésped la cual está determinada por la señal química específica que es producida por el rizobio compatible (Lerouge y col., 1990; Carlson y col., 1993; Staehelin y col., 2000) (Figura 5).



**Figura 5.** Modelo esquemático de la estructura de los factores Nod. *n* es el número variable de moléculas de N-acetil-glucosamina. Los radicales R representan los posibles sitios de sustituciones.

## 2) Infección rizobiana de los tejidos vegetales

Se han descrito diversas vías por las cuales los rizobios pueden infectar las raíces de las leguminosas, entre las que se encuentran:

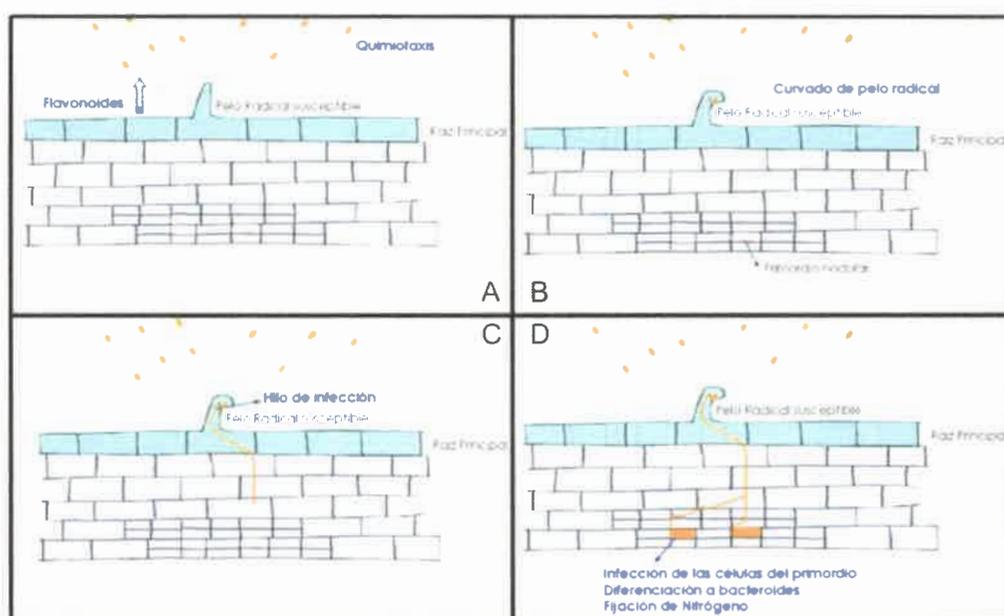
- a) Intracelular, mediante hilos de infección.
- b) Intercelular/Intracelular, mediante “*crack entry*”.
- c) Intercelular.

En todos los casos, el modo por el cual los rizobios penetran en los tejidos de la planta está determinado por el genoma de ésta.

- a) *Mediante hilos de infección.*

Este mecanismo de infección es el más estudiado, ya que ocurre en leguminosas de gran importancia económica y en aquellas que son utilizadas como modelo de estudio de la interacción simbiótica rizobios-leguminosas. Entre las leguminosas en las que se desarrolla este proceso de infección se pueden mencionar aquellas de clima templado que producen nódulos indeterminados (*Vicia*, *Trifolium*, *Pisum*, *Lotus*, *Medicago*, entre otras), y las de clima subtropical que producen nódulos determinados (*Phaseolus*, *Glycine*, *Vigna*, entre

otras). En la zona de emergencia de los pelos radicales se exudan compuestos flavonoides que atraen a los rizobios compatibles e inducen en los mismos la síntesis de FN. La percepción de dichas moléculas por la leguminosa huésped desencadena una serie de cambios morfológicos. Los pelos radicales se curvan formando un bolsillo en el que los rizobios quedan atrapados. Posteriormente se desarrollan los hilos de infección (HI), estructura tubular formada por la invaginación de la membrana celular de la célula epitelial del pelo radical, que actúan como un “canal” por el cual las bacterias viajan desde las células de la epidermis hacia las células corticales de la planta huésped (Gage, 2004; Downie, 2014). Paralelamente se activa la división celular en la corteza lo que conduce a la formación del primordio nodular. Los HI progresan hacia este primordio y liberan los rizobios en el interior de las células corticales, en donde se diferencian en bacteroides (Figura 6).



**Figura 6.** Infección de las raíces mediante la formación de hilo de infección. A) Las bacterias entran en contacto con las raíces de la leguminosa. B) Los rizobios se adhieren a pelos radicales de la zona susceptible de la raíz. El pelo radical se curva y encierra en su interior a las bacterias. Las células corticales retoman la división celular en respuesta a los factores Nod rizobianos y se forma el primordio nodular. C) La pared celular es degradada parcialmente, la membrana plasmática vegetal se invagina formando el hilo de infección. D) El hilo de infección crece y se ramifica a medida que se dirige a la corteza radical. Posteriormente, las bacterias son incorporadas al interior de las células del primordio por endocitosis y comienzan su diferenciación a bacteroides. Tomado de Ibañez, 2009.

En estas leguminosas están ampliamente descritas las respuestas que los FN inducen en la planta y que culminan con la nodulación. El modelo actual postula que el establecimiento de la simbiosis requiere de dos programas de desarrollo separados en el espacio (epidermis y corteza) pero molecularmente coordinados (Ferguson y col., 2010; Downie, 2014). Los FN son reconocidos por receptores que se encuentran en la membrana plasmática vegetal y en la membrana del HI, los cuales son del tipo LysM y LRR, ambos necesarios para iniciar el proceso de nodulación (Soto y col., 2009; Ferguson y col., 2010; Downie, 2014). Los receptores LysM son proteínas compuestas por un dominio quinasa intracelular, un dominio transmembrana y una porción extracelular en la que se encuentran dos o tres dominios LysM. Dichos receptores actúan como un complejo heterodímero desencadenando las primeras respuesta de la planta frente a la percepción de los FN (Parniske y Downie, 2003). El otro receptor que participa en la señalización de los FN es del tipo LRR, el cual presenta repeticiones ricas en leucina y dominios serina / treonina quinasa. Los receptores LRR participan tanto en la percepción de los FN como en la transducción de la señal que desencadena estas moléculas bacterianas en las plantas, ya que se requiere de su activación para las primeras respuestas detectables en el pelo radical (Endre y col., 2002; Stracke y col., 2002). La activación de los receptores LysM es requerida para la activación del receptor LRR (Ferguson y col., 2010).

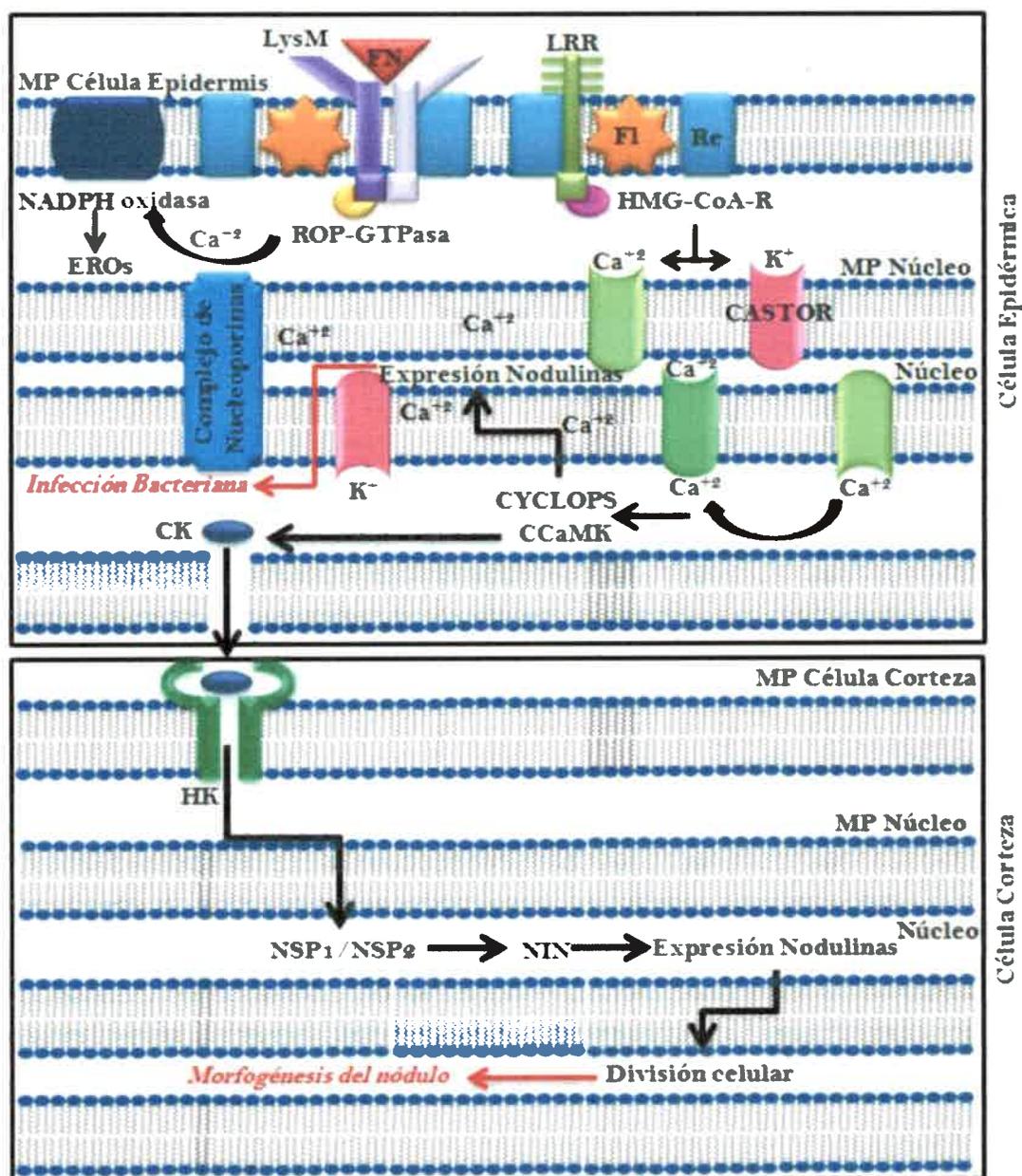
La percepción de los FN por los receptores previamente descriptos activa dos vías de respuestas en la planta huésped, una que conduce a la morfogénesis del nódulo y otra implicada en la infección de la leguminosa por parte del rizobio (Downie, 2014). Como resultado de la unión de los FN al receptor LysM se impulsa su actividad quinasa. Estos receptores interactúan con las proteínas de membrana remorinas (SYMREM1 y VAPYRIN) y flotilinas (FLOT 2 y FLOT 4), las que forman un complejo de señalización que permite el correcto crecimiento del HI. Este crece hacia la base del pelo, pudiendo luego ramificarse a medida que se acerca a las células de la corteza radical (Stougaard, 2000). La infección rizobiana requiere también de la activación de una ROP-GTPasa que se une al receptor LysM. La activación de dicha GTPasa podría contribuir a la activación de la enzima NADPH oxidasa a través de oscilaciones de  $Ca^{+2}$ , resultando en la producción de especies reactivas del oxígeno. Ello provocaría la despolarización y desestabilización de la membrana del pelo radical, contribuyendo con la formación, curvado y crecimiento del HI (Downie, 2014).



Por otra parte, la percepción de los FN en las células epidérmicas por los receptores LysM y LRR desencadena una cascada de señalización en la que participa la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA-reductasa, generando un segundo mensajero aún no identificado, el que induciría la apertura de canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{K}^{+}$  situados en la membrana nuclear de la célula epidérmica (Ferguson y col., 2010). Ello resulta en oscilaciones de  $\text{Ca}^{+2}$  en la región perinuclear, que activan una proteína calcio-calmodulina quinasa (CCaMK). La actividad de dicha quinasa culmina con la fosforilación del factor transcripcional CYCLOPS, que a su vez induce la expresión de genes que codifican para nodulinas tempranas, las que participan tanto en el proceso de infección como en la morfogénesis del nódulo (Ferguson y col., 2010; Oldroyd, 2013; Downie, 2014). La cascada de señalización por  $\text{Ca}^{+2}$  requiere de la activación de tres nucleoporinas específicas denominadas NUP85, NUP133 y NENA. El rol de las mismas aún no se ha establecido aunque se ha propuesto que pueden desempeñar un papel en la selección de los componentes de la vía de señalización a la membrana nuclear (Downie, 2014).

La percepción de los FN en las células epidérmicas se relaciona además con un aumento localizado en la producción de citoquininas. Estas hormonas constituirían la señal móvil que comunica a la corteza radical la percepción de los FN en la epidermis, iniciando el proceso mitótico que da lugar al primordio nodular (Oldroyd y Downie, 2008; Madsen y col., 2010; Plet y col., 2011; Oldroyd, 2013; Downie, 2014). El receptor de citoquininas en las células corticales tiene un dominio histidina quinasa y es codificado por *MtCRE1* (en *Medicago truncatula*) y *LjHK1* (en *Lotus japonicum*) (Gonzalez-Rizzo col., 2006; Tirichine y col., 2007). La percepción de las citoquininas por el receptor induce la expresión de genes que codifican para nodulinas tempranas a través de la activación de factores de transcripción tales como NSP1, NSP2 y NIN (Schauser y col., 1999; Borisov y col., 2003; Smit y col. 2005; Oldroyd y Downie 2008), y finalmente al proceso de morfogénesis del nódulo (Figura 7).



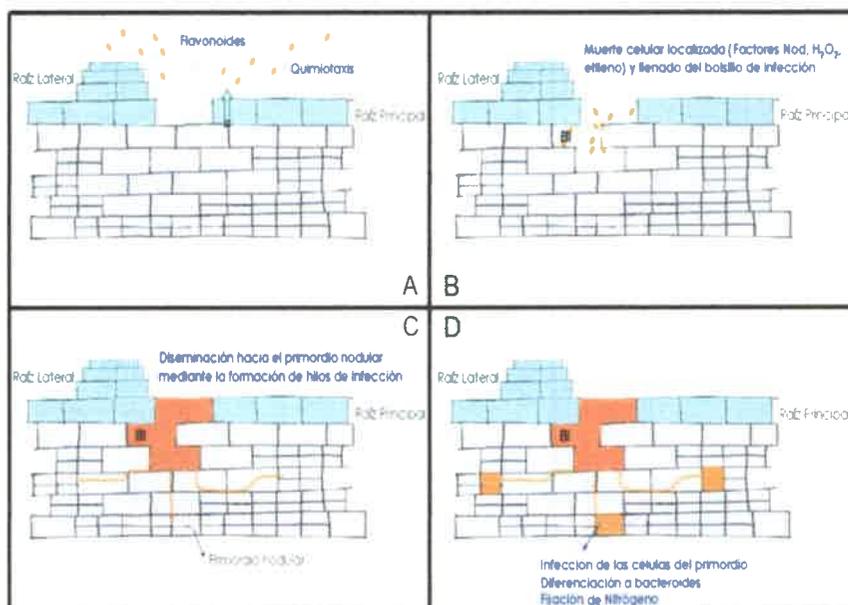


**Figura 7.** Eventos moleculares asociados a las etapas tempranas de la interacción. Los FN se unen al receptor LysM, el cual interactúa con flotilinas (Fl) y remorinas (Re). La percepción de FN desencadena dos programas genéticos que ocurren en paralelo. Por un lado, se reinicia la división de las células de la corteza radical que consecuentemente lleva a la morfogénesis del nódulo, y en simultáneo tiene lugar el proceso de infección bacteriana.

b) *crack entry*.

Este mecanismo de infección bacteriana ocurre en algunas leguminosas subtropicales (*Aeschynomene*, *Neptunia*, *Sesbania*, *Stylosanthes*) (D'Haeze y col., 2003). El proceso se inicia con el ingreso de los rizobios a los tejidos radicales a través de fisuras ocasionadas en la epidermis como consecuencia de la emergencia de las raíces laterales en *Stylosanthes* (Chandler y col., 1982) y en *Neptunia* (Subba Rao y col., 1995), o de las raíces adventicias en *Aeschynomene* (Alazard y Duhoux, 1990), o de ambas como en *Sesbania* (Dreyfus y col., 1984; Duhoux, 1984; Ndoye y col., 1994; Rana y Krishnan, 1995).

En *S. rostrata* y *Neptunia* spp., una vez que los rizobios ingresaron a través de fisuras en la epidermis, se induce en este tejido la muerte celular localizada dando origen a bolsillos de infección que posteriormente van a ser ocupados por los rizobios. Este proceso es inducido por la percepción de los FN y requiere de etileno, giberelinas y  $H_2O_2$  (D'Haeze y col., 2003; Lievens y col., 2005; Capoen y col., 2010). Presumiblemente, el bolsillo de infección es un centro de señalización que proporciona una fuente concentrada de FN que permite el desarrollo de una infección controlada (Goormachtig y col., 2004). Luego se desarrollan HI que se originan en dichos bolsillos cuyo crecimiento progresa primero intercelularmente y luego intracelularmente, hasta alcanzar las células del primordio nodular (Goormachtig y col., 2004; Capoen y col., 2010) (Figura 8).



**Figura 8.** Infección por *crack entry* de las raíces de *Sesbania rostrata* y *Neptunia spp.* A) Las bacterias se adhieren a las raíces de la leguminosa. B) Los rizobios penetran intercelularmente a través de discontinuidades en la epidermis radical originadas por la protrusión de las raíces laterales o adventicias. Posteriormente, inducen la muerte celular localizada, formándose los bolsillos de infección a partir de los cuales se originan hilos de infección intercelulares y, posteriormente, intracelulares que penetran en el primordio nodular. D) Las bacterias penetran en las células del primordio y comienza su diferenciación a bacteroides. Tomado de Ibañez, 2009.

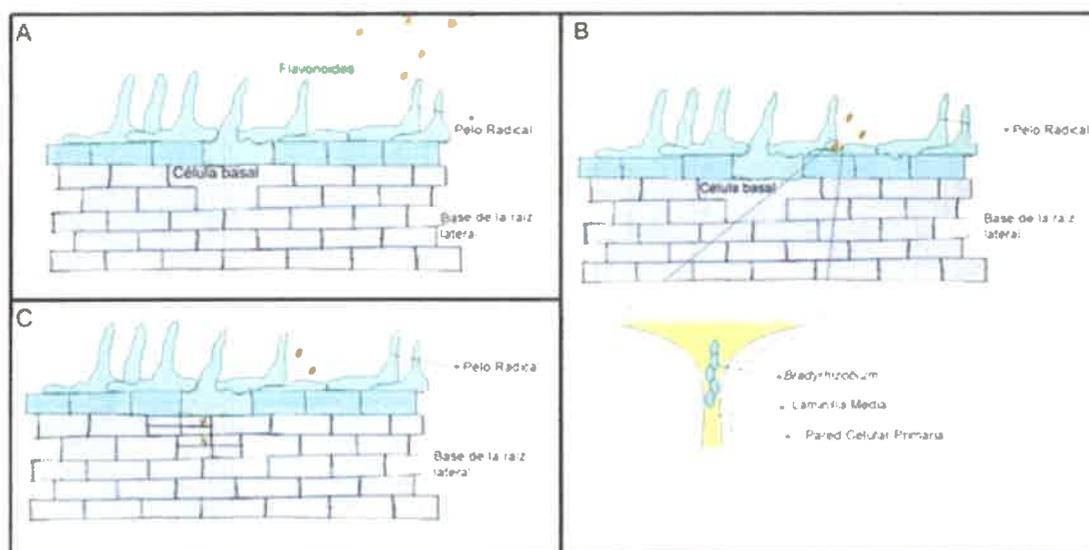
*c) Intercelular.*

Este mecanismo de infección ha sido escasamente estudiado, y ocurre en los géneros *Arachis* (Boogerd y van Rossum, 1997), *Mimosa* (De Faría y col., 1988), *Cytisus* (Vega-Hernandez y col., 2001) y *Lupinus* (Gonzalez-Sama y col., 2004). Los rizobios se diseminan a través de los espacios intercelulares hasta alcanzar una célula cortical basal, que se encuentra en la base del pelo radical, la cual es invadida a través de la pared celular. Su distribución en las células corticales ocurre por divisiones reiteradas de la célula vegetal infectada, sin formación de HI, dando como resultado nódulos del tipo aeschynomenoide (Alazar y Duhoux, 1990; Boogerd y van Rossum, 1997; Klitgaard y Lavín, 2005). Éste se caracteriza por la ausencia de células intersticiales no infectadas (Boogerd y van Rossum, 1997). Dentro del nódulo, los rizobios se diferencian en bacteroides contenidos en simbiosomas de forma esférica (Sen y col., 1986; Bal y col., 1989; Boogerd y van Rossum, 1997) (Figura 9).

Si bien algunos autores indican que las leguminosas del género *Arachis* son infectadas por “*crack entry*” (Chandler, 1978), otros consideran que el uso de dicho término es inadecuado ya que el ingreso de los rizobios a las raíces de esta leguminosa ocurre entre células de pelos radicales, ubicados en la base de una raíz lateral, a través de la laminilla media. En estos sitios, la pared celular posee una organización más laxa, lo que posibilitaría la infección rizobiana (Uheda y col., 2001).

Pocos estudios se han dedicado a dilucidar las señales moleculares que intervienen en el establecimiento de los nódulos en *Arachis hypogaea* (maní). Angelini y col. en el 2003, encontraron que los flavonoides sintéticos crisina, luteolina, apigenina y genisteína son fuertes inductores de los “genes *nod*” de rizobios que nodulan dicha leguminosa. Además, Taurian y col. (2008) reportaron la estructura de los FN producidos por un aislamiento nativo obtenido a partir de nódulos de maní. El análisis por HPLC de estas moléculas reveló que contienen fucosa, metil fucosa y acetyl fucosa como sustituyentes en el extremo reductor. En el extremo no-reductor, se determinó la presencia de ácidos grasos  $C_{18:1}$ ,  $C_{16:1}$ ,  $C_{16:0}$  y  $C_{14:0}$  y grupos N-metilo y carbamilo. Por otra parte, la evaluación del fenotipo simbiótico de una mutante de *Bradyrhizobium* sp., microorganismo simbiote de maní, demostró que los FN son requeridos en el programa de morfogénesis del nódulo en raíces de esta leguminosa (Ibañez y Fabra, 2011). Recientemente, Ibañez y col. (2015) identificaron secuencias correspondientes al dominio extracelular LysM de dos receptores putativos de FN de maní. Además, análisis filogenéticos indicaron que dichos receptores, nombrados AhNFR1 y AhNFP, son homólogos de LjNFR1 y LjNFR5 (receptores LysM de *Lotus japonicum*), respectivamente.





**Figura 9.** Infección de las raíces de *Arachis*. A) Las bacterias se adhieren a las raíces de la leguminosa. B) Los rizobios penetran intercelularmente en el sitio de unión de dos pelos radicales localizados en la base de una raíz lateral. La diseminación intercelular de las bacterias se produce a través de la laminilla media, facilitada por la producción de enzimas por parte del rizobio y sin la formación de hilo de infección. C) Las bacterias penetran en la célula basal, que comienza a dividirse para originar el primordio nodular y se desencadena su diferenciación a bacteroides. Tomado de Ibañez, 2009.

### 3) Proceso de fijación de nitrógeno

La fijación de nitrógeno en simbiosis es llevada a cabo por los bacteroides, que se encuentran en los simbiosomas en el interior de las células del nódulo. El proceso requiere del complejo enzimático nitrogenasa. Para que se produzca la reducción del dinitrógeno a amoníaco, este complejo interactúa con las proteínas ferredoxina y flavodoxina, que participan como donadores de electrones y reductores naturales de la nitrogenasa.

El complejo enzimático nitrogenasa está formado por dos componentes, a) una proteína tetramérica, la dinitrogenasa, compuesta por una subunidad  $\alpha$  (codificada por el gen *nifD*) y una subunidad  $\beta$  (codificada por el gen *nifK*), y b) una proteína homodimérica codificada por *nifH*, llamada dinitrogenasa reductasa. Las dos proteínas tienen como cofactor al hierro y, en la enzima dinitrogenasa, el molibdeno integra el cofactor conocido como FeMo-Co. Es este cofactor el que participa en la reducción del nitrógeno. En la naturaleza existen nitrogenasas alternativas que presentan el elemento vanadio en reemplazo de molibdeno, o solamente tienen hierro. Se propone que estas nitrogenasas alternativas



participarían en un mecanismo suplementario que posibilita la fijación cuando hay bajo contenido de molibdeno en el medio (Merrick, 2005).

La reacción global catalizada por la nitrogenasa es:



La planta transfiere al interior del bacteroide, a través de la membrana peribacteroidal, compuestos carbonados oxidables, entre los que se encuentran intermediarios del ciclo del ácido cítrico como succinato, malato y fumarato. Estos ácidos son utilizados como donadores de electrones para la producción de ATP y, tras su conversión en piruvato, como fuente de electrones para la reducción del  $\text{N}_2$ .

Los electrones provenientes de la oxidación del piruvato a acetyl-CoA y  $\text{CO}_2$  por la piruvato flavodoxina oxidorreductasa, reducen a la flavodoxina, y ésta los transfiere a la dinitrogenasa reductasa. Luego, los electrones son aportados desde la dinitrogenasa reductasa a la enzima dinitrogenasa, y por cada electrón transferido, se hidrolizan 2-3 ATPs. Posteriormente, y una vez reducida la dinitrogenasa, ésta transfiere los electrones al nitrógeno para generar amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), que es el primer producto de la reacción de fijación. Sin embargo, este compuesto es rápidamente protonado, formándose amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), lo que es favorecido por el pK (9,25) de la reacción, de tal manera que amonio es la especie predominante a los valores de pH fisiológicos (Sprent y Sprent, 1990).

En las células del nódulo el amonio es metabolizado a amidas o ureidos, que luego son exportados vía xilema al resto de la planta, donde son utilizados (Figura 10) (Mayz, 1997). Aunque parte del amoníaco es transformado por los bacteroides, éstos cuentan con una maquinaria pobre en enzimas asimiladoras de amoníaco. Por el contrario, en la planta hay altos niveles de glutamina sintetasa, por lo que el 70% del nitrógeno fijado por la bacteria es transportado al citoplasma de la célula vegetal, para luego ser asimilado en forma de glutamina, además de otras amidas y ureidos (Baca y col., 2000).



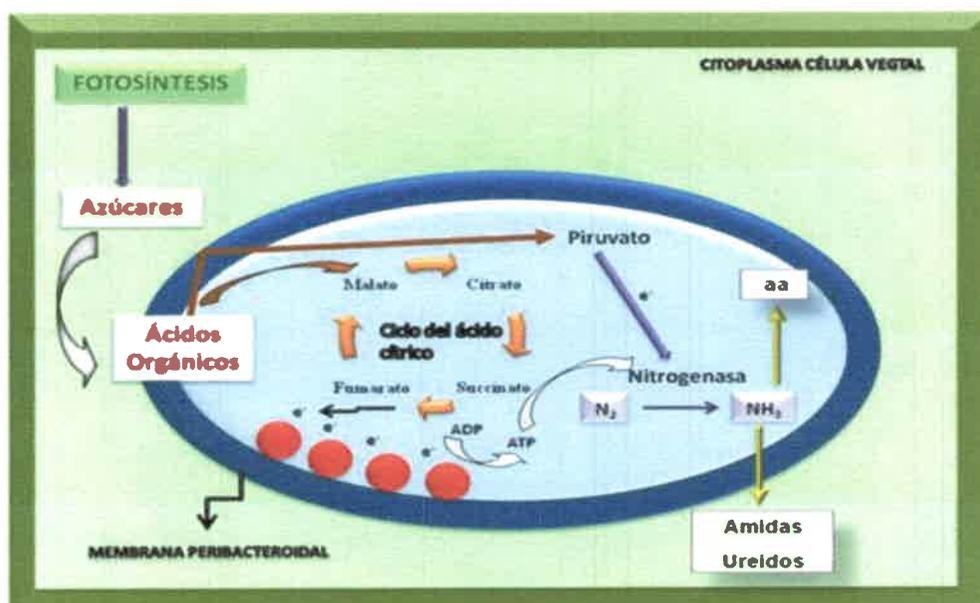
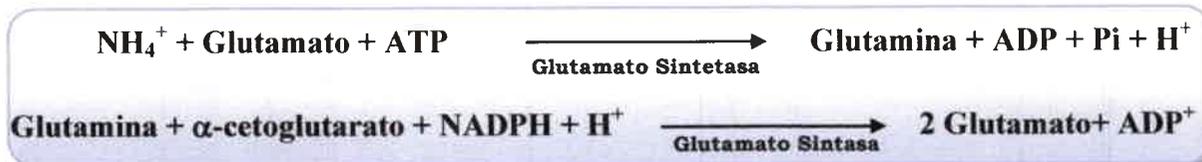


Figura 10. Intercambio de moléculas entre la planta huésped y el bacteroide en el proceso de FBN.

La siguiente es la secuencia de reacciones involucradas en el proceso de asimilación del  $NH_4^+$  mediante el ciclo glutamino sintetasa-glutamato sintasa:



Los rizobios requieren de procesos de oxidación durante la fijación de nitrógeno, por lo que es necesario el oxígeno como fuente de poder reductor, y ATP. Sin embargo el complejo enzimático nitrogenasa, responsable directo de la fijación, demanda un ambiente estrictamente anaerobio ya que el oxígeno inactiva irreversiblemente a la enzima nitrogenasa (Kim y Rees, 1994). Esta aparente paradoja ha sido resuelta mediante una variedad de estrategias que permiten mantener una tensión de oxígeno adecuada para el desarrollo de los microorganismos sin afectar el proceso de fijación. La delgada barrera de difusión en la corteza restringe el acceso de oxígeno al tejido central. Además, la membrana peribacteroidal posee propiedades y sistemas de transporte únicos que le proporcionan al espacio del simbiosoma características especiales para el funcionamiento del bacteroide. Por otra parte,

en el citoplasma de las células infectadas se ubica una proteína de color rojo denominada leghemoglobina que interactúa con el oxígeno de forma homóloga a la hemoglobina animal. Esta proteína sólo se encuentra en los nódulos que llevan a cabo la fijación. Por este motivo, la presencia de un color rojo en el interior de los nódulos es uno de los parámetros utilizados en la práctica para identificar nódulos efectivos. Otros mecanismos que contribuyen a disminuir la presión de oxígeno se basan en la actividad de oxidasas respiratorias con diferente afinidad por el O<sub>2</sub> así como en el papel “protector” de las mitocondrias, al consumir el O<sub>2</sub> en la periferia de las células infectadas (Soto-Urzúa y Baca, 2001).

### **Asociación simbiótica *Arachis hypogaea* L.~ rizobios**

- *El macrosimbionte: Arachis hypogaea* L.

*Arachis hypogaea* L. pertenece a la familia Fabaceae, subfamilia Papilionoideae, género *Arachis*, (Figura 11). Esta leguminosa, originaria de América del Sur y actualmente difundida en todo el mundo, crece en climas cálidos y húmedos, ya que es susceptible a las bajas temperaturas. Su crecimiento requiere de la extracción de grandes cantidades de nutrientes del suelo, por lo que éste debe ser fértil, con alto contenido de calcio, fósforo y potasio, de estructura suelta, textura arenosa a franco arenosa, bien drenado, pH ligeramente ácido o próximo a 7 y con una temperatura óptima de 16°C medidos a 10 cm de profundidad. En suelos que reúnen estas características, se logra un buen desarrollo del sistema radical, de la planta y del fruto (Fernández y Giayetto, 2006). Esta leguminosa es una planta herbácea, anual, fibrosa, erecta, ascendente, que llega a medir de 30 a 50 cm de altura. Las hojas son pinadas con dos pares de folíolos de 4-8 cm de largo, obtusos o ligeramente puntiagudos en el ápice, con márgenes enteros. Presenta flores sésiles en un principio y con tallos que nacen posteriormente en unas cuantas inflorescencias cortas, densas y axilares, con corolas de color amarillo brillante. La floración comienza a los 35-40 días después de la siembra. En la base de la flor se encuentran los ovarios y, luego de la fecundación, el pedicelo verdadero se desarrolla en un tallo o estaquilla de 3-10 cm de longitud que gradualmente empuja el ovario dentro del suelo. Tan pronto como las flores producen la estaquilla que va al suelo, desaparecen. Los frutos crecen y maduran bajo el suelo a 3-10 cm de la superficie, dentro de una vaina (longitud de 1-7 cm) leñosa, redondeada, abultada en su interior, con bordes prominentes reticulados y más o menos deprimidos entre las dos a cinco semillas (color café amarillento) que poseen. La testa de las semillas es de color rojo claro a oscuro. Los frutos



maduran y están listos para la cosecha en un período de 8 a 10 semanas (Fernández y Giayetto, 2006).



Figura 11. Planta de Maní.

*Arachis hypogaea* L. es la única especie del género *Arachis* con relevancia económica, siendo la semilla la parte más importante, la que es empleada como fuente de materia prima para las industrias aceiteras y de confitería (Cholaky y col., 1983).

En nuestro país se concentra el 100 % de la producción de maní en las provincias de La Pampa, San Luis y Córdoba. El total de superficie sembrada con maní en la campaña 2013/2014 fue de 344.041 hectáreas, de las cuales el 92% se ubica en Córdoba (Cámara Argentina del Maní, 2014). En esta provincia, el maní comenzó a cultivarse hacia fines del siglo XIX en los alrededores de la localidad de Río Segundo, desplazándose gradualmente hacia el sur (Oliva, Villa Ascasubi) durante las primeras tres décadas del siglo XX. Recién hacia la década del '50 el núcleo manisero se trasladó hacia General Deheza y General Cabrera. En la actualidad, la siembra de maní se concentra en el centro sur de la provincia. En la campaña 2013/2014 la participación relativa de cada departamento de Córdoba en la producción de maní fue la siguiente: General Roca el 31%, Río Cuarto el 28%, Juárez Celman el 14%, Pte. Roque S. Peña el 8%, Tercero Arriba el 6% y San Martín el 5% (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2014). Dado que el mayor porcentaje de la producción nacional así como la totalidad de los procesos de transformación del grano se concentran en Córdoba, el cultivo de maní se considera de gran importancia para la microeconomía de esta provincia.

El sector agroindustrial manisero de la provincia de Córdoba está compuesto por pequeñas y medianas empresas cooperativas, compañías de capitales nacionales y algunas de capitales extranjeros. Son muchos los pueblos rurales de Córdoba que sostienen sus economías gracias a la agroindustria manisera como única fuente significativa de empleo. Actualmente la cadena agroindustrial involucra cerca de 12.000 puestos de trabajo en más de 30 localidades (Cámara Argentina del Maní, 2014).

La industria manisera exporta el 95% de su producción como maní confitería. Argentina se ha consolidado como el mayor exportador mundial de maní desplazando a China y a Estados Unidos. Este alto porcentaje se explica no sólo por el reducido mercado interno sino también por la excelente calidad del maní argentino, que le permite ingresar a mercados vedados para otros países como Vietnam. Además, se exporta pasta y manteca de maní, y unas 60.000 toneladas de aceite de maní y subproductos, tales como harina y pellets. Desde el 2007, Argentina es el primer exportador mundial de aceite de maní. En 2014 las exportaciones de maní en grano alcanzaron las 400.232 toneladas. El volumen de esta exportación significó el 1.5% del total de las exportaciones argentinas de cereales (Cámara Argentina del Maní, 2014). Las exportaciones argentinas se han realizado a un total de 106 países, distribuyéndose de la siguiente manera: alrededor del 65% se exporta a la Unión Europea (principalmente Holanda, Alemania, Inglaterra, España, Italia, Grecia y Francia), y el resto se reparte entre USA, Canadá, México, Emiratos Arabes, Sudáfrica, Brasil, Australia, Chile, Rusia, Argelia, Ucrania, China, India, Jordania, Taiwan, Japón, Tailandia y otros países (Cámara Argentina del Maní, 2014).

En la región manisera de la provincia de Córdoba, la pérdida de productividad de las tierras agrícolas, y la inestabilidad de los rendimientos de los cultivos asociada a dicha pérdida, ha sido claramente documentada (Bricchi y col., 1996; Cisneros y col., 1998; Giayetto y col., 1998). Entre los indicadores del deterioro del suelo, se destaca la disminución del contenido de materia orgánica en la capa arable y la consecuente pérdida de estabilidad estructural de los agregados que se relacionan con la formación de costras superficiales (sellado) dificultando el ingreso del agua de lluvia (infiltración disminuida y pérdidas de agua por escurrimiento superficial) (Giayetto y col., 1998). Algunos estudios regionales señalan contenidos de materia orgánica del 1% en suelos con uso agrícola continuo (más de 50 años), respecto al contenido original de esos mismos suelos (~3,5%) bajo bosque de algarrobo (Cisneros y col., 1996; Moreno y col., 1996).



Por lo general, el maní no responde a la aplicación directa de fertilizantes nitrogenados excepto en suelos extremadamente pobres en nutrientes. En ensayos realizados en cuatro localidades del sur de la provincia de Córdoba no se han encontrado diferencias significativas en el rendimiento del maní cuando se agrega nitrógeno al suelo en forma de urea (Stalker, 1997; Bonadeo y Moreno, 2006). Es por ello que a fin de lograr mayor sustentabilidad del sistema alimentario manisero, e incrementar los rendimientos y la calidad de sus productos, surge como alternativa la posibilidad de aprovechar más eficientemente la capacidad de la planta de maní para establecer simbiosis con microorganismos fijadores de nitrógeno (Giayetto y col., 1998). La práctica de inoculación, como recurso tecnológico para alcanzar estos objetivos y reducir la extracción de nitrógeno del suelo, contribuiría a mantener el balance nutritivo edáfico e incrementaría la calidad y cantidad de producción. La respuesta a la inoculación de maní en suelos de Córdoba es más variable que la de otros cultivos, siendo en algunos casos positiva (Cholaky y col., 1983; Díaz-Zorita y Baliña, 2004) y en otros neutra (Giayetto y col., 1998, Bogino y col., 2005, y Castro y col., 2006).

- *El microsimbionte: Bradyrhizobium sp.*

La capacidad de la planta de maní de nodular fue observada en 1853 por Poiteau. Si bien algunos estudios señalan que los nódulos pueden ser el resultado de una interacción con rizobios de crecimiento rápido (Taurian y col., 2006; El-Akhal y col., 2008), tradicionalmente se asume que la población rizobiana capaz de establecer asociación simbiótica fijadora de nitrógeno con esta leguminosa está representada por bacterias de crecimiento lento del género *Bradyrhizobium* (Zhang y col., 1999; Chen y col., 2003; Muñoz y col., 2011).

El género *Bradyrhizobium* se caracteriza por agrupar bacterias Gram negativas, de crecimiento lento, con forma bacilar de 0.5-0.9  $\mu\text{m}$  de longitud, móviles por un flagelo polar o subpolar. Son bacterias mesófilas con temperatura óptima de crecimiento que oscila entre 28 y 30°C, crecen a pH próximo a la neutralidad y son productoras de álcali en medio conteniendo extracto de levadura y manitol (YEMA). Las colonias son, en general, circulares, rara vez traslúcidas, blancas y convexas, con un diámetro menor a 1mm después de 5-7 días de crecimiento.

Los microorganismos de este género poseen un amplio rango de estilos de vida: miembros de la comunidad rizosférica, bacterias endofíticas o bien acuáticas oligotróficas. Constituyen un grupo con características fenotípicas muy diversas, particularmente en los patrones de enzimas metabólicas, en la variedad de exopolisacáridos y en su capacidad de



resistencia a antibióticos. Presentan un metabolismo muy variado, siendo algunas cepas capaces de realizar la desnitrificación o de disminuir la actividad de la nitrogenasa en condiciones de vida libre microaeróbicas, y con capacidad de degradar xenobióticos como 2,4-diclorofenoxiacetato (2,4-D) o halobenzoatos (Kurz y LaRue, 1975; So y col., 1994; Saito y col., 1998; Kitagawa y col., 2002; Mesa y col., 2002). Además, este clado monofilético de rizobios incluye algunas cepas con capacidad de fotosintetizar (Fleischman y Kramer, 1998). En simbiosis, la actividad fotosintética desempeña un papel clave mediante el suministro de energía, que puede ser utilizado para la FBN (Fleischman y Kramer, 1998; Giraud y Fleischman, 2004).

Las bacterias del género *Bradyrhizobium* son capaces de nodular diversas leguminosas, así como también plantas no leguminosas del género *Parasponia* (Law y col., 2007). En la actualidad, existen 9 especies reconocidas dentro del género: *Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982) redefinido como *Bradyrhizobium diazoefficiens* (Delamuta y col., 2013), *Bradyrhizobium elkanii* (Kuykendall y col., 1992), *Bradyrhizobium liaoningense* (Xu y col., 1995), *Bradyrhizobium yuanmingense* (Yao y col., 2002), *Bradyrhizobium canariense* (Vinueza y col., 2005), *Bradyrhizobium iriomotense* (Islam y col., 2008), *Bradyrhizobium pachyrizi* (Ramirez-Bahena y col., 2009) y *Bradyrhizobium jicamae* (Ramirez-Bahena y col., 2009).

Los estudios de la diversidad de microsimbiontes de maní aislados de distintas regiones geográficas indican una elevada heterogeneidad. Recientemente, un estudio fenotípico y filogenético de aislamientos bacterianos de nódulos de maní obtenidos de plantas cultivadas en el área manisera de la provincia de Córdoba, reveló que representan variantes localmente adaptadas de *Bradyrhizobium yuanmingense* y *Bradyrhizobium iriomotense*, cuyos genes simbióticos podrían haber sido adquiridos por eventos de transferencia lateral de genes. De manera interesante, las secuencias del gen *nodA* obtenidas en este trabajo se relacionan parcialmente con las ya descriptas para estas especies de bradirizobios, pudiendo representar nuevos clados *nodA* (Muñoz y col., 2011).



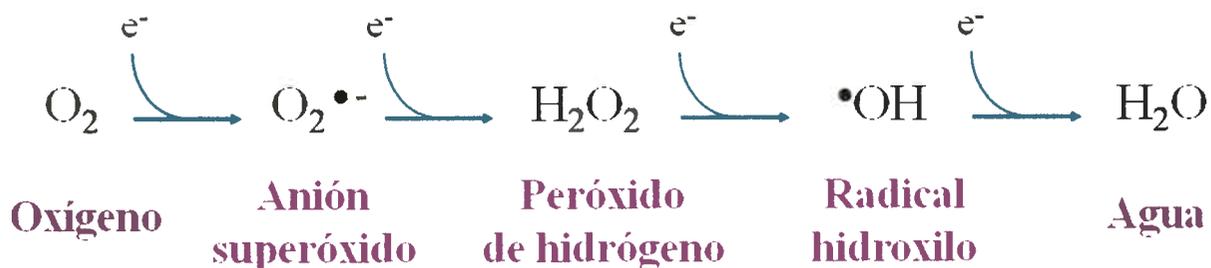
## **Las especies reactivas del oxígeno en la interacción planta-microorganismos**



**Especies reactivas del oxígeno (EROs): Generación y detoxificación en plantas.**

- *Características generales de las EROs*

El oxígeno molecular es esencial para la existencia de organismos aeróbicos. Sin embargo, una de las consecuencias inevitables del metabolismo aeróbico, bajo condiciones fisiológicas normales, es la reducción parcial, univalente y sucesiva del oxígeno a formas reactivas, conocidas como EROs (Figura 12) (Michaelis, 1946; Verma y Dubey, 2003). Las EROs poseen uno o más electrones no apareados, tales como los radicales hidroxilos ( $\cdot\text{OH}$ ) y el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) así como moléculas sin radicales libres como el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (Matamoros y col., 2003). Una característica distintiva de los radicales libres es su elevada reactividad inespecífica, lo que posibilita que reaccionen rápidamente con otras moléculas o átomos. Por otra parte, el  $\text{H}_2\text{O}_2$ , si bien no presenta electrones no apareados, es considerado una ERO por cumplir con la característica distintiva de ser altamente reactivo debido a la presencia de un enlace O-O.



**Figura 12.** Reducción univalente del oxígeno. Cuando el oxígeno molecular acepta un electrón de un agente reductor, el producto primario generado es el  $\text{O}_2^-$  (anión superóxido). La adición de un electrón conduce a la formación del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (peróxido de hidrógeno), el cual se descompone fácilmente por fisión homolítica, luego de ganar otro electrón para formar  $\cdot\text{OH}$  (radical hidroxilo). La incorporación del cuarto electrón da como resultado la formación de agua.

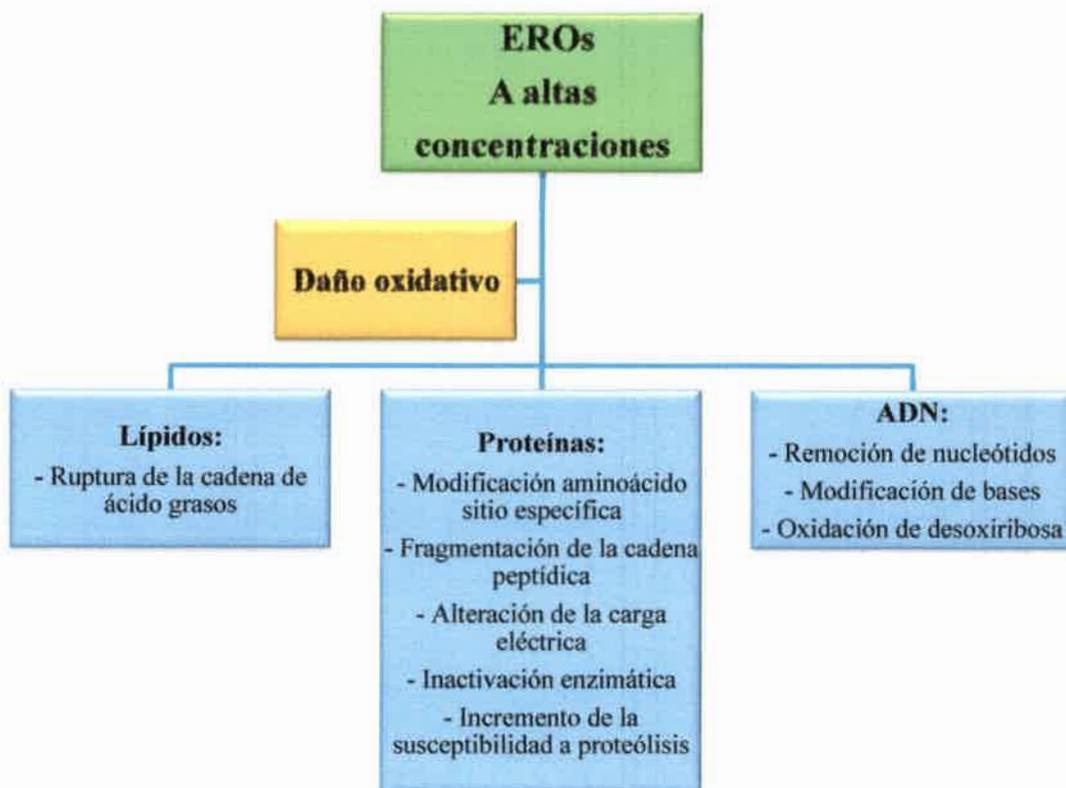
Las EROs han sido ampliamente estudiadas en plantas como indicadores ubicuos de estreses bióticos y abióticos o de moléculas señal en diversos procesos fisiológicos (Mittler y col., 2011). Estos organismos están expuestos a un entorno en constante cambio, por lo cual deben responder rápidamente y de manera eficiente para adaptarse al ambiente (Andrio y col., 2013). Una de las posibles respuestas de las plantas a las fluctuaciones de las

condiciones ambientales involucra la generación y acumulación de EROs (Apel y Hirt, 2004). La regulación estricta de la homeostasis de EROs mediante el equilibrio entre la producción y la dismutación de dichas moléculas establece una línea de base a partir de la cual los incrementos en los niveles de EROs podrían ser identificados como señales en diversos procesos celulares (Mittler y col., 2004; Tognetti y col., 2012). Efectivamente, las EROs han sido involucradas en el cierre estomático (Pei y col., 2000), en la regulación de la expresión génica (Neil y col., 2002), en el crecimiento celular (Foreman y col., 2003), en la respuesta hipersensible que limita y bloquea la penetración y desarrollo de patógenos (Apel y Hirt, 2004; Zaninotto y col., 2006), en la muerte celular programada (Gechev y Hille, 2005), en el crecimiento polar del pelo radical (Carol y Dolan, 2006), en la respuesta a estreses abióticos como salinidad, sequía y metales pesados (Miller y col., 2008), y en las interacciones establecidas entre las plantas y los microorganismos (Nanda y col., 2010; Scheler y col., 2014). Los mecanismos que posibilitan esta exhaustiva regulación de procesos fisiológicos de las plantas ejercida por las EROs han sido ampliamente estudiados y se ha propuesto que estas moléculas participarían en el proceso de sulfenilación (oxidación de residuos de cisteína por el  $H_2O_2$  con la formación de un grupo sulfenico), activando de este modo enzimas, factores de transcripción y proteínas involucradas en la señalización celular (Poole y col., 2000; Leonard y Carroll, 2011; Roos y Messens, 2011; Oger y col., 2012).

- *Características generales del sistema antioxidante*

En altas concentraciones, las EROs son tóxicas y perturban distintas etapas del metabolismo, desencadenando un desbalance del estado redox celular conocido como estallido oxidativo (Implay, 2003). Bajo estas condiciones, las EROs pueden reaccionar con diferentes componentes celulares (lípidos, proteínas y/o ácidos nucleicos) y generar un daño oxidativo que puede llevar a la muerte celular (Figura 13) (Sharma y col., 2012).





**Figura 13.** Daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN inducido por EROs. Modificado de Sharma y col., 2012.

La regulación redox juega un papel importante en el desarrollo de las plantas y en su adaptación a diferentes estreses (Foyer y Noctor, 2013). Para ello, las células poseen un sistema de defensa antioxidante que les permite mantener el estado redox celular en condiciones fisiológicas y atenuar el daño causado por el estrés oxidativo (Tabla 1). Este sistema antioxidante se encuentra distribuido en diferentes compartimentos celulares, tales como cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, y actúa de manera coordinada previniendo la formación de EROs, reparando el daño producido por las mismas o desactivándolas (Pang y Wang, 2008).

Tabla 1. Principales enzimas y compuestos no enzimáticos del sistema antioxidante, su localización y función en las células vegetales.

Antioxidantes enzimáticos	Reacción catalizada	Código de Enzima	Localización subcelular
<b>CAT</b>	$2\text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$	1.11.1.6	Per., Gli. y Mit.
<b>APX</b>	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AA} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{DHA}$	1.11.1.11	Cit., Per., Clo. y Mit.
<b>GPX</b>	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{DHA} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{GSSG}$	1.11.1.7	Clo., Cit., Mit. y ER
<b>SOD</b>	$\text{O}_2^- + \text{O}_2^- + 2\text{H} \longrightarrow 2\text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$	1.15.1.1	Cit., Clo., Per. y Mit.
<b>MDHAR</b>	$2\text{MDHA} + \text{NADH} \longrightarrow 2\text{AA} + \text{NAD}^+$	1.6.5.4	Clo., Mit. y Cit.
<b>DHAR</b>	$\text{DHA} + 2\text{GSH} \longrightarrow \text{AA} + \text{GSSG}$	1.8.5.1	Clo., Mit. y Cit.
<b>GR</b>	$\text{GSSG} + \text{NADPH} \longrightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$	1.6.4.2	Cit., Clo. y Mit.
<b>Antioxidantes no enzimáticos</b>			
<b>AA</b>	Sustrato de APX. Detoxifica $\text{H}_2\text{O}_2$		Clo., Cit., Mit., Per., Vac., y Apo.
<b>GSH</b>	Sustrato de varias PX, GSTs y GR. Detoxifica hidroperóxidos		Clo., Cit., Mit., Per., Vac., y Apo.
<b>TOCs</b>	Protege membranas de la peroxidación lipídica		Membranas
<b>CARs</b>	Detoxifica $^1\text{O}_2$ , precursor de ABA		Plastidios
<b>Flavonoides</b>	Detoxifica $\text{H}_2\text{O}_2$ y OH		Vac.

Abreviaciones:  $^1\text{O}_2$ : oxígeno singlete; OH: radical hidroxilo;  $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno;  $\text{O}_2^-$ : anión superóxido; CAT: catalasa; APX: ascorbato peroxidasa; GPX: guaiacol peroxidasa; PX: peroxidasa; SOD: superóxido dismutasa; MDHAR: monodehidroascorbato reductasa; DHAR: dehidroascorbato reductasa; GR: glutatión reductasa, DHA: dehidroascorbato; GSH: glutatión; GSSG: glutatión oxidado; GSTs: glutatión S-transferasas; MDHA: monodehidroascorbato; AA: ácido ascórbico; CARs: carotenoides; TOCs: tocoferoles; Clo.: cloroplastos; Cit.: citocromo; Mit.: mitocondria; Gli.: glioxisoma; Vac.: vacuola; ER: retículo endoplásmico.; Per.: peroxisomas; Apo.: apoplasto; Cit.: citosol; ABA: ácido absísico. Modificado a partir de: Karuppanandian y col. (2011).

El sistema denominado primario involucra reacciones enzimáticas o no enzimáticas. En estas últimas participan moléculas pequeñas tales como glutatión, ascorbato, fitoquelatinas y flavonoides. Estos antioxidantes interactúan con numerosos componentes celulares y juegan un papel crucial en la defensa como cofactores enzimáticos, en el

crecimiento de las plantas y, en la modulación de la senescencia y muerte celular (De Pinto y De Gara, 2004).

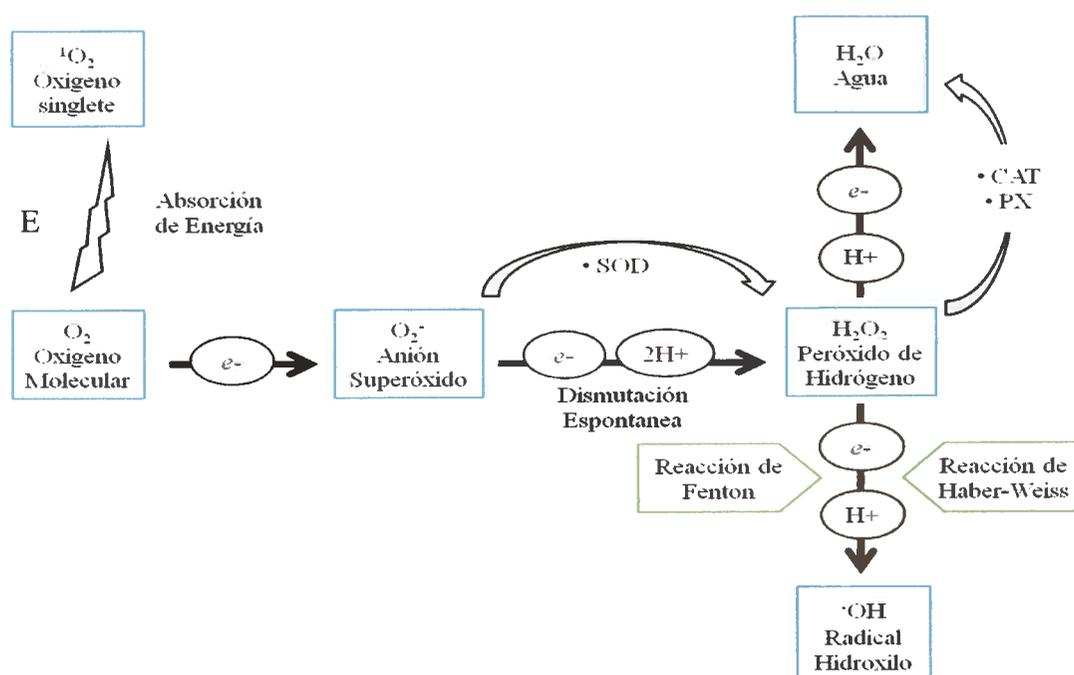
El sistema enzimático comprende metaloenzimas como catalasas (CAT), superóxido dismutasas (SOD) y peroxidasas (PX). SOD juega un papel central en la defensa frente al estallido oxidativo en todos los organismos aeróbicos ya que es la primera enzima involucrada en el proceso antioxidante, y convierte el  $O_2^-$  a  $H_2O_2$  (Scandalios, 1993). Un incremento en la actividad SOD a menudo se correlaciona con un aumento en la tolerancia de la planta al estrés abiótico (Sharma y col., 2012). Las enzimas responsables de dismutar el  $H_2O_2$  son CAT y PX. CAT es la primera enzima descubierta y caracterizada, y es la responsable de descomponer el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno. Diferentes estreses modifican la actividad de dicha enzima, provocando su incremento o disminución, dependiendo del agente estresante, de la duración de la exposición y de la intensidad del estrés (Mallick y Mohn, 2000). Esta enzima posee una alta afinidad por el  $H_2O_2$  pero una baja afinidad frente a peróxidos orgánicos. En cambio, las enzimas PX además de utilizar el  $H_2O_2$  como dador de electrones para metabolizar diferentes sustratos, pueden reducir diversos peróxidos orgánicos generando  $H_2O_2$  en dicho proceso (Sharma y col., 2012). A diferencia de CAT, las PX requieren de un equivalente celular reducido para completar un ciclo de oxido-reducción que le permite detoxificar a la célula de peróxidos (Sharma y col., 2012). Estas enzimas son ubicuas y están involucradas en diversos procesos como el control del crecimiento de la planta y la tolerancia a estreses bióticos y abióticos (Smirnoff, 1993).

Luego de la acción del sistema antioxidante primario, las estructuras celulares pueden ser aún susceptibles a la oxidación, requiriendo de la acción del sistema antioxidante secundario. Este comprende un conjunto de enzimas y proteínas que previenen la formación de EROs como citocromo oxidasa y glutatión transferasa y las proteínas quelantes de Fe y Cu ferritina y transferrina, además de aquellas enzimas que reparan el daño producido por EROs (lipolíticas, proteolíticas, reparadoras de ADN).



- Mecanismos de generación de EROs

Las reacciones que generan  $O_2^-$  incluyen la autooxidación de compuestos de bajo peso molecular, el transporte de electrones a nivel mitocondrial (Complejo I y II) y la actividad de enzimas como NADPH oxidasa y xantina oxidasa. Por otra parte, la generación biológica de  $H_2O_2$  se debe tanto a la dismutación del  $O_2^-$  catalizada principalmente por la enzima SOD, o de enzimas peroxisomales como glicolato oxidasa y peroxidasas, o apoplásticas como oxalato aminasa y amino oxidasa. El proceso espontáneo de doble reducción del oxígeno molecular constituye otra fuente de  $H_2O_2$  (Figura 14) (Bolwell y Wojtaszek, 1997; Hu y col., 2003; Walters, 2003; Torres y Dangl, 2005; Nanda, 2010; Sharma y col., 2012).



**Figura 14.** Representación esquemática de la generación de EROs en las plantas. Modificado de Sharma y col. (2012).

En las plantas se generan constantemente EROs debido a la fuga inevitable de electrones al  $O_2$  desde las cadenas de transporte de electrones que se encuentran asociadas a mitocondrias, cloroplastos, peroxisomas, membrana plasmática y retículo endoplasmático (Figura 15) (Sharma y col., 2012).

Otra fuente importante de generación de EROs en las plantas es de origen enzimático (Figura 15). Una de las principales enzimas involucradas es la NADPH oxidasa (NOX), que se encuentra en la membrana plasmática (Appel y Hirt, 2004; Torres y Dangl, 2005; Nanda, 2010). Las NOXs de plantas son homólogas de la oxidasa del estallido respiratorio (RBOHs), específicamente de la subunidad catalítica (gp91<sup>phox</sup>) de RBOHs de los fagocitos de mamíferos (Keller y col., 1998; Sagi y Fluhr, 2001). El modo de acción de este sistema enzimático está dado por la reducción del oxígeno molecular, para formar anión superóxido utilizando NADPH como dador de electrones (Torres y Dangl, 2005). Dicho producto de la reacción catalizada por la NADPH oxidasa, constituye el sustrato inicial para la síntesis de otros compuestos activados tales como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxinitrito, <sup>1</sup>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup>, entre otros (Men'shchikova y col., 2008).

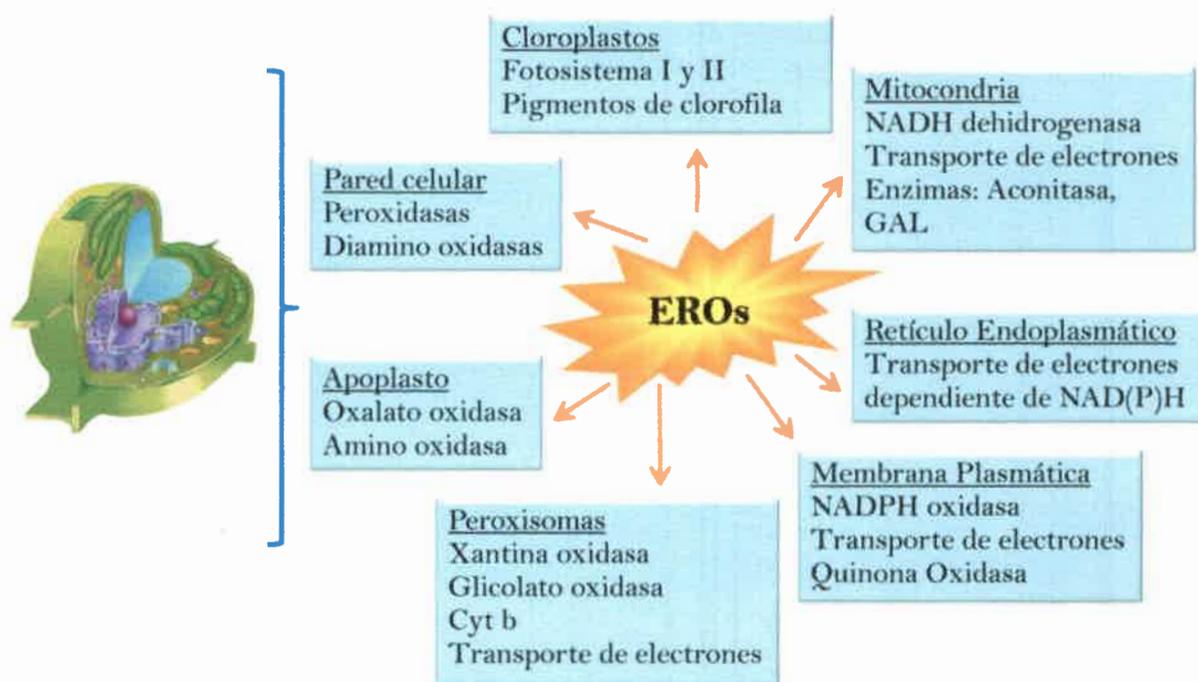


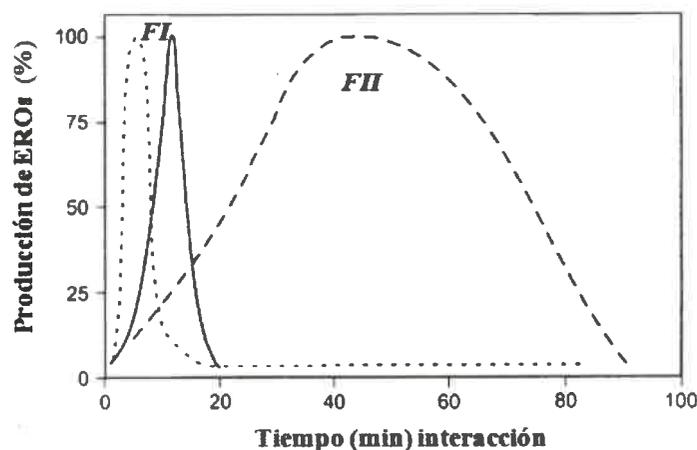
Figura 15. Sitios de producción de EROs en las plantas. Modificado a partir de Sharma y col. (2012).

### Producción de EROs durante las interacciones plantas-microorganismos

Diversos estudios han permitido establecer que el equilibrio oxidativo juega un papel importante en las interacciones plantas-microorganismos (Nanda y col., 2010; Torres, 2010; Puppo y col., 2013). Parte del complejo sistema inmune de la planta es impulsado por una

generación y acumulación de EROs que le permite mediar primero el reconocimiento del microorganismo, y luego el establecimiento de la respuesta de defensa en la planta (Mittler, 2004).

Durante las interacciones incompatibles planta-patógeno, las respuestas de defensa de las plantas se activan y el estallido oxidativo muestra un comportamiento bifásico (Figura 16). Aunque ambas fases involucran sustratos y vías de inducción similares, se regulan de manera independiente (Levine y col., 1994; Wojtaszek, 1997). Se ha observado que la *Fase I* de acumulación de EROs es una reacción biológicamente inespecífica y transitoria que por lo general tiene lugar minutos después del ataque a la planta por el patógeno, mientras que la *Fase II* ocurre más tardíamente y es sostenida en el tiempo. Esta última fase es específica y requiere de la acción de los genes *avr* y *Hrp* o genes de la respuesta hipersensible y de patogenicidad, respectivamente, por lo que se correlaciona con la defensa de la planta huésped frente a una interacción incompatible (Torres y col., 2010). Por el contrario, en una interacción compatible los mecanismos de defensa de la planta son vencidos por el patógeno, induciendo de este modo la enfermedad, por lo que se observa sólo la *Fase I* (Torres y col., 2006).



**Figura 16.** Representación esquemática de la cinética de producción y acumulación de EROs en la interacción planta-patógeno. FI: *Fase I*; FII: *Fase II*. Modificado de Wojtaszek (1997).

### **Importancia de las EROs en la simbiosis rizobios-leguminosas.**

Si bien durante la colonización rizobiana de los tejidos radicales de la leguminosa huésped no se inducen en la planta las reacciones de defensa que se desencadenan frente a microorganismos patógenos, se ha observado que en las etapas tempranas de dicha interacción simbiótica los rizobios serían primeramente reconocidos como patógenos, provocando un estallido oxidativo semejante al descrito para las interacciones patogénicas. Aparentemente estos microorganismos son capaces de superar la segunda fase de generación de EROs lo que les permitiría inactivar la respuesta de defensa de las plantas, inhibiendo las vías de señalización que la activan, lo que posibilita una posterior interacción simbiótica exitosa (Herouart y col., 2002; Gechev y Hille, 2005; Pauly y col., 2006; Lohar y col., 2007; Torres, 2010; Eaton y col., 2011).

Diversos estudios han aportado pruebas convincentes de que las EROs juegan un papel importante en los procesos de señalización durante el establecimiento de la simbiosis leguminosas-rizobios (Bueno y col., 2001; Santos y col., 2001; Ramu y col., 2002; Pauly y col., 2006; Cárdenas y col., 2008; Oger y col., 2012; Andrio y col., 2013; Puppo y col., 2013; Downie, 2014). Santos y col. (2001) informaron un incremento en los niveles de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en la pared y matriz de los HI, indicando que en los inicios de la simbiosis *Medicago sativa*-*Sinorhizobium meliloti* se produce un estallido oxidativo. Se ha propuesto que uno de los roles de dicho estallido oxidativo es promover el crecimiento y desarrollo de los HI, ya que las EROs intervienen en reacciones de oxido-reducción que favorecen el entrecruzamiento de las glicoproteínas asociadas a la pared celular de dichas estructuras, permitiendo de ese modo su elongación (Gibson y col., 2008). Sin embargo, se ha demostrado que el 90% de los HI abortan debido justamente a la respuesta de hipersensibilidad desencadenada en el tejido cortical de la raíz (Vasse y col., 1993). Bueno y col. (2001) demostraron que las primeras 24 horas de dicha interacción son fundamentales para determinar la respuesta de la planta a las bacterias compatibles o incompatibles ya que, cuando inocularon plantas de alfalfa con una cepa mutante de *S. meliloti* no productora de FN (bacteria incompatible) observaron un incremento en la producción de  $H_2O_2$  con respecto a plantas controles sin inocular y a plantas inoculadas con la cepa salvaje (bacteria compatible).

Evidencia adicional sobre el rol de señalización de las EROs durante la interacción leguminosas-rizobios ha sido descrita en el sistema simbiótico *Medicago truncatula*-*S. meliloti*. En los estadios tempranos de dicha interacción (12 horas postinoculación) se ha



demostrado un incremento en la producción de  $O_2^-$  en la zona próxima a la punta de la raíz, la que no se observó cuando se inoculó con una cepa de *S. meliloti* incapaz de sintetizar FN (Ramu y col., 2002). Por el contrario, en las etapas más tempranas de dicha interacción (30 min postinoculación) la aplicación de FN compatibles redujo la tasa de generación de EROs en segmentos de raíz de *M. truncatula* (Shaw y Long, 2003). Además, Lohar y col. (2007) sugirieron que es requerida una reducción transitoria en la acumulación de EROs para que, 1 hora después de la inoculación, ocurra el curvado del pelo radical inducido por los FN específicos de *S. meliloti*. Estos resultados aparentemente contradictorios permiten suponer que se requeriría de distintos niveles de EROs en las distintas etapas de la interacción simbiótica *M. truncatula*-*S. meliloti*, y que los FN participarían en el proceso de modulación del eflujo de dichas moléculas.

Glyan'ko y col. (2003) confirmaron la importancia del  $H_2O_2$  en las etapas tempranas de la interacción *Pisum sativum*-*Rhizobium leguminosarum*, dado que en plantas mutantes, incapaces de reconocer los FN, se produce un incremento en los niveles de  $H_2O_2$  que estaría asociado a la ausencia de modulación de la producción de EROs mediada por los FN.

Cárdenas y col. (2008) informaron que en los estadios tempranos (3 min post-inoculación) de la interacción *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium etli*, se produce un incremento transitorio en los niveles de EROs, el que es atribuido a la percepción de FN específicos. Estos autores proponen que el aumento en los niveles de EROs es una respuesta característica de la interacción simbiótica que se establece en esta especie de leguminosa y que su modulación por los FN permite a los rizobios el ingreso a la planta hospedadora, evitando la inducción de una respuesta hipersensible.

En las etapas más tardías del proceso de interacción simbiótica que ocurre en las leguminosas del género *Medicago*, se ha observado un aumento en la producción de EROs y una elevada y variable actividad antioxidante en la zona de infección de nódulos jóvenes, indicando la producción de estos radicales durante el desarrollo y vida del nódulo (Becana y col., 2000; Santos y col., 2001; Muglia y col., 2008). Esta generación prolongada de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$  en la zona de infección posibilitaría que, en ausencia de la señal bacteriana adecuada, la planta inicie una respuesta sistémica de defensa (Santos y col., 2001). Por otra parte, Oger y col. (2012) informaron que la producción de EROs durante la interacción simbiótica constituye parte de las cascadas de señalización desencadenadas por la percepción de los FN. El uso de químicos y sondas genéticas, junto con el análisis por espectrometría de masas, les



permitió a estos autores identificar, en la simbiosis *M. truncatula*-*S. meliloti*, alrededor de un centenar de proteínas modificadas por el proceso de sulfenilación, ampliamente distribuidas en los tejidos vegetales en las etapas tempranas de la interacción (2 días postinoculación) y en los nódulos maduros (4 semanas postinoculación). Estos resultados sugieren que el proceso de sulfenilación, que ocurre como consecuencia de la oxidación de los residuos Cys por el  $H_2O_2$  generado durante el establecimiento de la simbiosis, regularía la actividad de las proteínas que juegan un papel importante en el desarrollo y funcionamiento de la interacción simbiótica.

Andrio y col. (2013), mediante un análisis transcriptómico realizado en raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* y tratadas con DPI (difenileneiodonio), un inhibidor de la producción de EROs, identificaron, a los 2 días postinoculación, 301 genes cuya expresión era potencialmente regulada por el contenido de EROs. Entre ellos se encuentra el gen *MtSpk1* que codifica para una proteína quinasa putativa, la cual es inducida por tratamiento con  $H_2O_2$  o con FN. Estos estudios permitieron identificar por primera vez un gen que participa en la interacción simbiótica y que su expresión es regulada por los FN y por las EROs. Los transcritos de este gen fueron encontrados en los pelos radicales, en los primordios de nódulos y en la zona de la infección de los nódulos maduros. El uso de una sonda fluorescente específica permitió además conocer que la distribución de los transcritos del gen y del  $H_2O_2$  producido es similar en la zona de infección de los nódulos.

En *Sesbania rostrata*, una leguminosa infectada inicialmente por *crack entry* pero luego por HI, se observó un incremento en la producción y acumulación de  $H_2O_2$  en la zona de infección de la planta. Dicha ERO está relacionada a la muerte celular localizada que culmina con la formación del bolsillo de infección (Den Herder y col., 2007). Además, se observó que el aumento de  $H_2O_2$  es consecuencia de la percepción de los FN.

Otro rol clave de las EROs en los procesos metabólicos y de señalización durante el establecimiento de la simbiosis es su participación en la producción de especies reactivas del nitrógeno (ERNs). Las ERNs incluyen principalmente a la molécula gaseosa óxido nítrico (ON) y al peroxinitrito que se genera por la reacción del ON y del anión superóxido (Romero y col. 2006). En la última década, se ha informado una producción y acumulación de ON durante las diferentes etapas del establecimiento de la simbiosis rizobios-leguminosas (Meilhoc y col., 2011). Dado que se conoce que en las interacciones planta-patógeno existe una interconexión entre las vías de regulación de la producción de EROs y de ERNs (Asai y

Yoshioka, 2008; Bellin y col., 2013), ésta está siendo actualmente investigada en la simbiosis fijadora de nitrógeno. En este sentido, Puppo y col. (2013) propusieron que el peroxinitrito generado en los nódulos como resultado de la acumulación de  $O_2^-$  y ON, actuaría como molécula señal activando los procesos de S-nitrosilación y nitración. La modificación postraduccional de algunas proteínas como consecuencia de dichos procesos activaría o inactivaría proteínas requeridas en los diferentes estadios de la interacción simbiótica. Melo y col. (2011) describieron la regulación de la enzima glutamina sintetasa en nódulos de *M. truncatula* a través de la nitración de residuos de tirosina. Además, el peroxinitrito inhibe la generación de EROs como consecuencia de la S-nitrosilación de la enzima NADPH oxidasa (Yun y col., 2011). Por otra parte, Wang y col. (2010) observaron que el  $H_2O_2$  activa una MAP quinasa que participa en la modulación de vías de biosíntesis de ON en *Arabidopsis* sp.. Todos estos resultados dan sustento a la hipótesis del posible entrecruzamiento entre las vías que regulan la generación de las EROs y de las ERNs. Se ha propuesto además que las EROs son parte del repertorio de señales que contribuye al establecimiento de la interacción simbiótica en leguminosas que presentan un mecanismo de infección mediado por la formación de HI. Sin embargo, en procesos de infección rizobiana menos caracterizados como la invasión intercelular, sin formación de HI, como el que ocurre en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., no ha sido aún elucidado el rol de las EROs en las etapas tempranas, y sólo se dispone de información referida a las etapas tardías de dicha interacción.

Recientemente Carlier y col. (2013) estudiaron el rol de las EROs en el proceso de senescencia de nódulos de maní. Para ello analizaron la producción de dichas moléculas en tres estadios del desarrollo de la planta de maní: en floración, en vaina completa y en semilla completa. El análisis de los resultados obtenidos indicó que, durante el desarrollo del nódulo, se produce una disminución de su contenido de EROs sin cambios en los niveles de peroxidación lipídica y oxidación de proteínas. Resultados similares fueron observados por Maiti y col. (2012) en nódulos de maní. Estos hallazgos indicarían que, a diferencia de lo que ocurre en leguminosas infectadas vía HI (Pauly y col., 2006), la producción de EROs no estaría involucrada en la senescencia de dichos nódulos.

- *Rol de la enzima NADPH oxidasa en la simbiosis rizobios-leguminosas*

Las EROs generadas como resultado de la activación del sistema enzimático NADPH oxidasa, participan en mecanismos de protección de la planta contra agentes patógenos, tal como la respuesta hipersensible, la resistencia sistémica adquirida e inducida y el fortalecimiento de la pared celular como barrera mecánica contra la infección (Sagi y Fluhr, 2001). Sin embargo, el papel de las EROs producidas por la NADPH oxidasa en las interacciones mutualistas, y el origen de la acumulación de dichas especies durante la infección rizobiana y la organogénesis del nódulo, aún no son completamente conocidos. Debido a que las etapas iniciales de las interacciones entre plantas y microorganismos patógenos o simbióticos tienen aspectos en común (Soto y col., 2006), se puede sugerir la participación de la NADPH oxidasa en el mecanismo implicado en la producción de EROs durante la interacción simbiótica entre las leguminosas y los rizobios. En este sentido, Peleg-Grossman y col. (2007) demostraron que en ausencia de actividad de la enzima NADPH oxidasa se suprime la producción de EROs, el curvado del pelo radical y la formación del HI. Además, Lohar y col. (2007) determinaron que existe correlación entre la disminución en la acumulación de transcritos de genes putativos de dicha enzima y la disminución del eflujo de superóxido y peróxido, resultados que sustentan la hipótesis de la participación de la enzima NADPH oxidasa en la generación de EROs. En este contexto, se han realizado recientemente estudios tendientes a identificar y caracterizar la NADPH oxidasa en las leguminosas (Lohar y col., 2007; Marino y col., 2011; Montiel y col., 2012). De hecho, varios genes *Rbohs* han sido identificados en los genomas de dichas plantas (Marino y col., 2012).

Si bien diversos estudios sugieren que la NADPH oxidasa de plantas desempeña un papel similar en las interacciones benéficas y patogénicas generando condiciones hostiles para ambos tipos de microorganismos, otros estudios han demostrado que la inhibición de dicha enzima bloquea el proceso de nodulación o reduce el rendimiento de la actividad nitrogenasa. Esto sugiere que la actividad del complejo NADPH oxidasa, a diferencia de lo que ocurre en la interacción patogénica, es requerida para el establecimiento de una simbiosis efectiva (Tavares y col., 2007; Shaw y Long, 2003; Lohar y col., 2007, Peleg-Grossman y col, 2007, Montiel y col., 2012).



El rol de la enzima NADPH oxidasa en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno ha sido analizado en los últimos años, mediante estudios genéticos (Tabla 2). En la interacción *M. truncatula-S. meliloti* se ha encontrado que la expresión de un gen que codifica *Rboh* (*MtRbohA*) está limitada a la zona de fijación de nitrógeno del nódulo, aún cuando la actividad del complejo nitrogenasa es sensible a las EROs (Marino y col., 2009). Por otra parte, la regulación negativa de la expresión *MtRbohA* disminuyó la actividad de fijación de nitrógeno y afectó la expresión de los genes que codifican las proteínas del complejo nitrogenasa (Marino y col., 2011; Kiirika y col., 2012). Estos datos indican que la regulación del gen *MtRbohA* desempeña un papel importante en la simbiosis *M. truncatula-S. meliloti*.

Montiel y col. (2012) identificaron 9 miembros de la familia de genes *Rboh* de *P. vulgaris*. El transcripto de uno de ellos, *PvRbohB*, se acumuló abundantemente en tallo, raíz y nódulos durante la interacción simbiótica *P. vulgaris-R. tropici*. En plantas transformadas, en las cuales la expresión del gen *pvrbohB* está regulada negativamente, se observó una inhibición en la progresión de los HI, una disminución en el número de nódulos y una reducción en la fijación de nitrógeno. Estos resultados indican que el gen que codifica para esta NADPH oxidasa de poroto es crucial para una colonización exitosa y un apropiado desarrollo de los HI.

Tabla 2. Caracterización funcional de genes involucrados en la expresión de la enzima NADPH oxidasa durante la simbiosis fijadora de nitrógeno.

Moléculas redox	Proteínas	Organismos	Fenotipo simbiótico	Referencia
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MtRbohA	<i>Medicago truncatula</i>	Disminución de la actividad nitrogenasa	Marino y col., 2011
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	MtROP9	<i>Medicago truncatula</i>	Disminución del número de nódulos	Kiirika y col., 2012
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	PvRbohB	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Disminución del número de nódulos y de la actividad nitrogenasa	Montiel y col., 2012

Modificado a partir de Ribeiro y col., 2014.

Downie (2014) propone un modelo de inducción de la cascada de señalización simbiótica que se inicia con la percepción de los FN y culmina con la formación de nódulos. Los FN activarían una ROP-GTPasa que a su vez induciría a la enzima NADPH oxidasa, resultando en la producción de EROs y en el eflujo de calcio a través de la membrana plasmática de las células de los pelos radicales en crecimiento, lo que sería requerido para el curvado del pelo radical y la formación del HI.

Todos estos estudios ponen en evidencia la importancia del sistema NADPH oxidasa en la interacción simbiótica que se establece en leguminosas que son infectadas vía HI. Sin embargo, en leguminosas infectadas de manera intercelular, como maní, aún no se han realizado estudios en ese sentido.

- *Importancia del sistema antioxidante de la leguminosa huésped en la simbiosis rizobios-leguminosas.*

Durante las últimas dos décadas ha sido analizado el rol del sistema de defensa antioxidante de la leguminosa huésped en el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno. La primera evidencia de su importancia fue la existencia de correlación entre el contenido de glutatión y ascorbato y la eficiencia en la fijación de nitrógeno (Groten y col., 2005; Chang y col., 2009; Marino y col., 2009; Becana y col., 2010). Además, la actividad de las enzimas involucradas en la vía glutatión-ascorbato también se encontró ligada a la eficiencia de la FBN (Werner Ribeiro y col., 2014). Frendo y col. (2005) observaron que una disminución en la síntesis de glutatión y homoglutatión inhibió la formación de nódulos. La presencia de redoxinas (glutatión peroxidasa, peroxiredoxinas, glutaredoxinas y tioredoxinas) en el interior de los nódulos ha sido asociada con su requerimiento en el desarrollo de dichos órganos (Lee y col., 2005; Groten y col., 2006; Frendo y col., 2013). Por otra parte, se demostró la importancia de la enzima glutatión-S-transferasa (GST) en el correcto establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno (Dalton y col., 2009).

En la interacción *M. sativa-S. meliloti*, se observó que el éxito del establecimiento de la simbiosis dependía, al menos en parte, de un incremento en la actividad del sistema de defensa antioxidante de la planta huésped (particularmente de las actividades de las enzimas antioxidantes CAT y lipoxigenasa) (Bueno y col., 2001). Por otra parte Vasiléva y col. (2005) resaltaron la importancia del incremento en la actividad CAT para la modulación del estallido



oxidativo desencadenado en las etapas tempranas de la interacción simbiótica *P. sativum* - *R. leguminosarum*.

En *S. rostrata* se identificó el gen que codifica para una peroxidasa clase III (*Srprx1*) el que es inducido transitoriamente durante el proceso de nodulación (Den Herder y col., 2007). Además, se observó que la expresión de dicho gen depende estrictamente de la percepción de los FN y puede ser modulada por la producción de  $H_2O_2$ . Dado que *Srprx1* no se induce como consecuencia del ataque de patógenos o del daño tisular, se propuso que dicho gen codifica para una peroxidasa específica del proceso simbiótico. La hibridación *in situ* permitió la detección de transcriptos del gen *Srprx1* alrededor de los bolsillos de infección, a lo largo del HI y en los nódulos, lo que sugiere la importancia de la peroxidasa en el correcto establecimiento de la simbiosis. En la interacción *M. truncatula*-*S. meliloti*, la producción de EROs también estaría acompañada por la inducción de una peroxidasa codificada por el gen *ripI*. La actividad de dicha peroxidasa, podría estar involucrada en el entrecruzamiento de proteínas de la pared celular (Cook y col., 1995; Ramu y col., 2002).

El rol del sistema de defensa antioxidante en plantas de maní no ha sido aún completamente estudiado. Bianucci y col. (2008) reportaron que el glutatión producido en dicha planta es requerido para el normal desarrollo de nódulos. Además, recientemente Maiti y col. (2012), analizaron la actividad de las enzimas CAT, SOD, APX, y GR en nódulos de maní, encontrando un incremento sólo en ésta última, lo que confirma la importancia del glutatión en la interacción simbiótica en dicha leguminosa.

- *Importancia del sistema antioxidante del microsimbionte en la simbiosis rizobios-leguminosas.*

Debido a que, como se describió anteriormente, durante la interacción rizobios-leguminosas se produce un estallido oxidativo, la participación del sistema antioxidante bacteriano sería requerida para sobrellevar dicha producción de EROs. Las bacterias cuentan con un sistema antioxidante que garantiza su sobrevivencia frente al estrés oxidativo que se puede generar en el ambiente circundante (Lushchak, 2011). Dicho sistema ha sido foco de estudio en la interacción rizobios-leguminosas, especialmente en relación a la actividad de las enzimas CAT y SOD.



- *La enzima SOD*

*S. meliloti* posee al menos dos isoenzimas SOD, denominadas SodA y SodB (Hanyu y col., 2009). Se ha observado que los genes que las codifican son expresados diferencialmente tanto en vida libre como en simbiosis. La inoculación de alfalfa con una mutante deficiente en SodA, resultó en una alteración en todos los estadios de la simbiosis (Santos y col., 2000). Por otra parte, Davies y Walker (2007) informaron que la inoculación con una mutante SodB también afectó varias etapas de la interacción simbiótica en esta leguminosa. Todos estos hallazgos indicarían que dicha enzima juega un papel importante en la eficiencia de la nodulación y de la fijación de nitrógeno. En cuanto a la importancia de la MnSOD, si bien se ha identificado la presencia de esta enzima en *Bradyrhizobium* sp., no hay información acerca de su rol en la respuesta de defensa frente al estrés oxidativo en la interacción simbiótica (Santos y col., 1999).

- *La enzima CAT*

La cantidad de isoformas y la actividad de las CAT varían entre las distintas especies rizobianas. Por ejemplo, *B. japonicum* USDA 110 y *R. etli* CFN42 poseen solo una catalasa bifuncional (catalasa-peroxidasa) codificada por *katG* (Vargas y col., 2003; Panek y O'Brian, 2004). En cambio, *S. meliloti* presenta las catalasas KatA y KatC, y una catalasa bifuncional, KatB (Herouart y col., 1996; Sigaud y col., 1999; Jamet y col., 2003; Jamet y col., 2005). Por otra parte, en el genoma de *M. loti* se encuentran dos genes que codifican para enzimas catalasas, una monofuncional, KatE, y otra bifuncional, KatG (Hanyu y col., 2009). Además, en *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* creciendo en vida libre, se han descrito la actividad de tres enzimas catalasas diferentes (Crockford, 1995).

Diversos estudios indican que el rol de dicha enzima en el establecimiento de la simbiosis varía según la isoenzima implicada. Así, por ejemplo, la mutación en el gen *katG* de *R. etli* no afectó el establecimiento de la simbiosis con *P. vulgaris* (Vargas y col., 2003). De igual modo, una mutante de *M. loti* también en el gen *katG* no mostró diferencias con respecto a la cepa salvaje en la interacción simbiótica con *Lotus japonicum* (Hanyu y col., 2009), mientras que tampoco se alteró la nodulación en plantas de *M. sativa* inoculadas con una mutante de *S. meliloti* en el gen que codifica para KatA o KatC (Jamet y col., 2005). Estos resultados indican que KatG y KatA no son esenciales para el fenotipo simbiótico de *R. etli*, *M. loti* y *S. meliloti* respectivamente. Sin embargo, las doble mutantes de *S. meliloti* en



*katA/katC* o *katB/katC* indujeron la formación de un menor número de nódulos, con una disminución en la capacidad de fijar nitrógeno (Herouart y col., 1996, Jamet y col., 2003). Por otra parte, una mutante de *M. loti* en el gen *katE* formó nódulos poco eficientes, en comparación con la cepa salvaje.

El rol del  $H_2O_2$  en la interacción rizobio-leguminosa ha sido estudiado mediante el uso de mutantes de rizobios que sobrepresan la enzima CAT. Orikasa y col. (2010) informaron que la inoculación de *P. vulgaris* con una cepa de *R. leguminosarum* *bv. phaseoli* superproductora de CAT incrementó la fijación de nitrógeno, lo que podría relacionarse con un aumento en la actividad nitrogenasa como consecuencia de la disminución de los niveles de  $H_2O_2$  en los nódulos. En cambio, en plantas de *M. sativa* inoculadas con una cepa mutante de *S. meliloti* que sobreexpresa KatB se observó una alteración en la formación de los HI seguida de una disminución en el número de nódulos, con la consecuente alteración de la capacidad fijadora de nitrógeno. Ello puede atribuirse al rol del  $H_2O_2$  en el entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular vegetal, posibilitando el desarrollo del HI (Jamet y col., 2007).

#### - *Glutaredoxinas*

La inactivación de SmGRX1, una de las tres glutaredoxinas de *S. meliloti*, conduce a una deficiencia en la nodulación. Si bien se observan numerosos simbiosomas en plantas inoculadas con dicha mutante, el número de bacteroides se encuentra disminuido y su morfología está alterada (Benyamina y col., 2013). SmGRX1 ha sido relacionada a la glutatiónilación de proteínas y a la defensa frente a  $H_2O_2$  en bacterias en vida libre. En conjunto, estas observaciones sugieren que se requiere un control redox estricto y de modificaciones pos-traduccionales para la diferenciación a bacteroides. El proceso de S-glutatiónilación podría constituir un mecanismo por el cual la función de las proteínas es modulada como consecuencia de modificaciones pos-traduccionales basada en la unión reversible de GSH a residuos de cisteína presentes en su estructura.

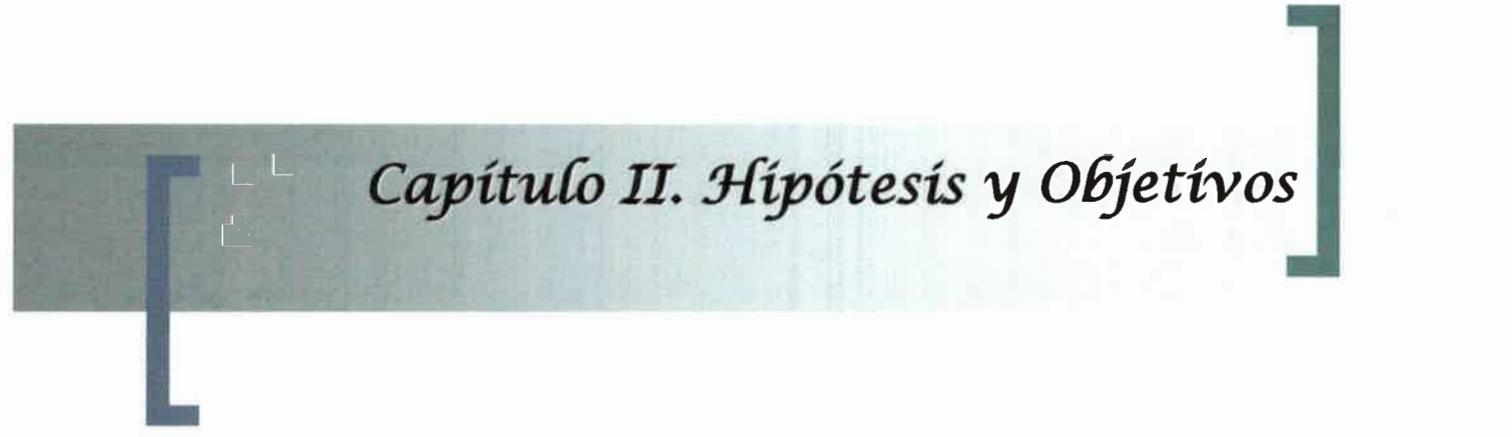


- *Glutación sintetasa*

Se ha informado que plantas de *P. vulgaris* inoculadas con una cepa mutante en el gen *gshB* que codifica para una glutación sintetasa presentaron un fenotipo de nodulación retardada y una reducción en el peso seco de la parte aérea, lo que sugiere una disminución en la actividad fijadora de nitrógeno (Muglia y col., 2008). Además, los nódulos inducidos en estas plantas presentaron un patrón de senescencia temprana, asociado a un aumento de los niveles de  $O_2^-$ . Por otra parte, Harrison y col. (2005) observaron que la disrupción en el gen *gshA* de *S. meliloti*, que codifica para la primera enzima de la vía de biosíntesis del glutatión, afectó marcadamente el proceso de nodulación, mientras que una mutación en el gen *gshB* redujo el número de nódulos y la eficiencia en la fijación de nitrógeno. Recientemente, Lu y col. (2014) encontraron una relación entre la biosíntesis del glutatión y la eficiencia de la fijación de nitrógeno. Estos autores observaron que la actividad glutatión sintetasa está positivamente regulada por LsrB, un regulador del tipo LysR el cual también controla la expresión del sensor redox OxyR. Si bien la inactivación de OxyR no afectó la eficiencia de la simbiosis (Jamet y col., 2005), una mutante en LsrB indujo nódulos inefectivos en *M. sativa* (Luo y col., 2005; Lu y col., 2013). Por otra parte, Tate y col. (2012) encontraron que cepas mutantes de *R. etli* deficientes en la actividad glutatión sintetasa presentaron una eficiencia simbiótica reducida. Estos resultados demuestran la importancia del glutatión bacteriano en el correcto desarrollo de los nódulos.

Tomados en conjunto, estos antecedentes constituyen una evidencia directa del rol crítico del sistema antioxidante bacteriano en la interacción simbiótica que se establece en leguminosas que son infectadas vía HI. Si se considera que en el proceso de infección que ocurre de manera intercelular no se forman estas estructuras, es posible suponer que, en la interacción con maní, los bradirizobios están más expuestos a las EROs producidas en los tejidos vegetales mientras atraviesan intercelularmente la epidermis radical.



A decorative graphic consisting of a horizontal bar with a light blue-to-white gradient. On the left side, there is a large blue bracket '['. On the right side, there is a large teal bracket ']' that overlaps the right edge of the bar. The text 'Capítulo II. Hipótesis y Objetivos' is centered within the bar in a black, italicized serif font.

*Capítulo II. Hipótesis y Objetivos*

### **Hipótesis**

- La producción de EROs en la planta, modulada por los FN, y el sistema antioxidante bacteriano y vegetal juegan un rol en los procesos de señalización que culminan con una exitosa interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.

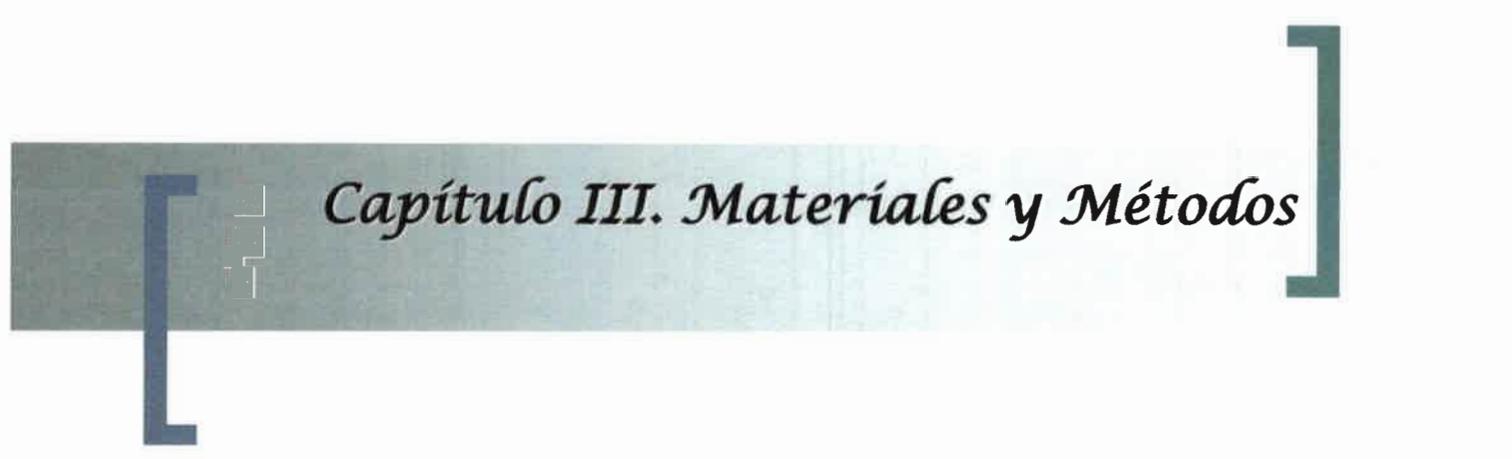
### **Objetivo general:**

- Elucidar el rol de las EROs, la participación de los factores Nod en la modulación de su producción y la importancia del sistema antioxidante vegetal y bacteriano en la simbiosis *Bradyrhizobium* sp.-maní, una leguminosa infectada intercelularmente.

### **Objetivos específicos:**

1. Evaluar la producción de EROs y la actividad de enzimas del sistema antioxidante vegetal durante las etapas tempranas de la interacción maní- *Bradyrhizobium* sp.
2. Determinar la participación de los factores Nod sintetizados por *Bradyrhizobium* sp en la modulación de la producción de EROs y en la activación del sistema antioxidante de maní.
3. Establecer si la producción de EROs en maní constituye un proceso requerido para la nodulación.
4. Determinar el requerimiento del sistema antioxidante de *Bradyrhizobium* sp en la interacción simbiótica con maní.



A horizontal bar with a light blue-to-white gradient background. On the left side, there is a large blue bracket '['. On the right side, there is a large teal bracket ']' that overlaps the right edge of the bar. The text 'Capítulo III. Materiales y Métodos' is centered within the bar in a black, italicized serif font.

*Capítulo III. Materiales y Métodos*

### Cepas bacterianas

Las cepas bacterianas utilizadas se describen en la Tabla 3:

Tabla 3. Cepas bacterianas utilizadas.

Cepa	Características Relevantes	Fuente
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	Recomendada como inoculante para <i>Arachis</i> , Amp <sup>r</sup>	IPAGRO, Brasil
<i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>	Derivada de <i>Bradyrhizobium</i> sp. 6144 incapaz de producir FN, Amp <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	Ibañez y Fabra, 2011

### Medios de Cultivo

Para el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el medio YEM (Vincent, 1970) cuya composición es la siguiente:

PO<sub>4</sub>HK<sub>2</sub> 0,5 g l<sup>-1</sup>

SO<sub>4</sub>Mg.7H<sub>2</sub>O 0,2 g l<sup>-1</sup>

NaCl 0,1 g l<sup>-1</sup>

Extracto de levadura 1 g l<sup>-1</sup>

Manitol 10 g l<sup>-1</sup>

pH 6,8-7

Para obtener el medio sólido (YEMA) se agregó agar-agar en una concentración de 15 g l<sup>-1</sup> y 10 ml l<sup>-1</sup> de una solución de Rojo Congo (2,5 g l<sup>-1</sup>).



Para la obtención de los FN se utilizó el medio B<sup>-</sup> (Spaink y col., 1992) cuya composición es la siguiente:

Glucosa 10 g l<sup>-1</sup>

Ca(NO<sub>3</sub>). 4H<sub>2</sub>O 1,3 g l<sup>-1</sup>

KNO<sub>3</sub> 0,55 g l<sup>-1</sup>

MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0,55 g l<sup>-1</sup>

Biotina 0,2 mg l<sup>-1</sup>

Tiamina 5 mg l<sup>-1</sup>

Micronutrientes 2,5 mg l<sup>-1</sup>

FeEDTA 2,5 mg l<sup>-1</sup>

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM

pH 5

#### Solución de Micronutrientes

CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O 0,035 g l<sup>-1</sup>

MnSO<sub>4</sub>. 4H<sub>2</sub>O 0,6 g l<sup>-1</sup>

ZnSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O 0,097 g l<sup>-1</sup>

H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 1,26 g l<sup>-1</sup>

NaMoO<sub>4</sub>. 2H<sub>2</sub>O 0,4 g l<sup>-1</sup>

#### Conservación de las cepas bacterianas

Las cepas se mantuvieron en placas de medio YEMA a 4° C. Para su almacenamiento a largo plazo, se tomaron alícuotas de cultivos en fase logarítmica tardía que fueron suplementadas con glicerol estéril hasta alcanzar una concentración final del 40% (v/v). Las suspensiones así preparadas se conservaron a -20°C.



### **Obtención y análisis de los FN**

Para la purificación de los FN se siguió la metodología propuesta por Spaink y col. (1992). Se obtuvieron cultivos en medio YEM de la cepa salvaje *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 o de la cepa isogénica mutante *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> en fase exponencial (168 h de incubación a 28°C en agitación). Un ml de dichos cultivos fue inoculado en 10 ml de medio B<sup>-</sup> y se lo incubó 7 días a 28°C en agitación (150 rpm). Luego, 1 ml de este cultivo fue transferido a 100 ml de medio B<sup>-</sup> y se lo incubó en las mismas condiciones y tiempo. Finalmente, 100 ml se transfirieron a 1 l de medio B<sup>-</sup> sin el agregado de flavonoides, o a 3 l de medio B<sup>-</sup> suplementados con el flavonoide genisteina en una concentración 1 µM, y se los incubó 4 días con idénticas condiciones de temperatura y rpm. A ambos cultivos se les agregó butanol en una concentración del 30% (v/v) y se los incubó toda la noche manteniendo las condiciones de incubación establecidas al inicio de la experiencia. El extracto butanólico (conteniendo los FN) se llevó a sequedad en rotavapor, y se resuspendió en 5 ml de ACN 60% (v/v). Luego se adicionó 5 ml de ACN 60% (v/v) por cada litro de cultivo. La muestra se dejó toda la noche en agitación y se diluyó con agua bidestilada hasta alcanzar una concentración de ACN 20% (v/v). La muestra fue transferida a una columna SPE C18 previamente tratada con ACN 20% (v/v) y MeOH. Los FN se eluyeron con dos volúmenes de MeOH y se liofilizaron. Posteriormente se adicionó 1 ml de ACN 50% (v/v) por cada litro de cultivo, se sonicó durante 15 min y se filtró a través de un microfiltro con un diámetro de poro de 0,45 µ para eliminar impurezas. Un volumen de 0,5 ml fue analizado en un equipo HPLC PerIKn Elmer series 200 acoplado a un espectrómetro de masas LC-MS/MS (QTRAP-Applied Biosystems). El resto de la muestra se conservó a 4°C hasta su posterior uso.

### **Esterilización superficial y germinación de semillas de maní**

Para la esterilización superficial de semillas de maní (variedad Runner, cultivar Tegua) se utilizó la metodología sugerida por Vincent (1970). Las semillas se sumergieron en etanol 96° durante 30 seg y en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 15% (v/v) durante 15 min. Luego, se realizaron 5-6 lavados con agua estéril. Una vez esterilizadas superficialmente, las semillas fueron colocadas en placas de Petri estériles conteniendo algodón y papel de filtro, y se incubaron en estufa a 28°C en oscuridad, hasta que la radícula alcanzó una longitud aproximada de 2-3cm.



### **Obtención de raíces inoculadas**

Las semillas pre-germinadas fueron transferidas a frascos de vidrio que contenían papel de filtro estéril humedecido con medio Hoagland sin nitrógeno (Hoagland y Arnon, 1950). Se obtuvieron cultivos en medio YEM de la cepa salvaje *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 o de la cepa isogénica mutante *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> afectada en la producción de FN (Ibáñez y Fabra, 2011) en fase exponencial-tardía (120 h de incubación) conteniendo 10<sup>9</sup> ufc ml<sup>-1</sup>. Cincuenta ml de dichos cultivos fueron centrifugados a 5.000 rpm durante 5 min y el pellet obtenido se resuspendió en el mismo volumen de agua destilada. Un ml de esta suspensión bacteriana o 10 µl de la solución de FN purificados (10<sup>-6</sup> M) fue inoculado en la zona de emergencia de las raíces laterales de plantas de maní. Las plantas fueron luego incubadas en cámara de cultivo con una temperatura de 28°C, un fotoperíodo de 18/6 h (luz/oscuridad) y 50% de humedad relativa. Controles negativos (plantas no inoculadas) también fueron incluidos. Se tomaron muestras a los 5, 10, 15, 30, 60 y 240 min pos-inoculación (pi), se congelaron en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su utilización.

### **Evaluación de la actividad biológica de los FN de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144**

Con el fin de evaluar la actividad biológica de los FN obtenidos, 5 plantas de maní creciendo en vermiculita estéril se inocularon con 3 ml de una suspensión bacteriana de la cepa *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> (10<sup>9</sup> ufc ml<sup>-1</sup>) y se adicionaron los FN purificados de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en una concentración 10<sup>-6</sup> M. Además, se incluyeron plantas controles sin inocular, plantas inoculadas con una suspensión bacteriana de la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (10<sup>9</sup> ufc ml<sup>-1</sup>) y plantas co-inoculadas con las cepas *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>. En todos los tratamientos, las plantas fueron cosechadas a los 28 días pi y se determinó número de nódulos formados, porcentaje de nódulos rojos y peso seco de la parte aérea. El experimento se repitió dos veces con un n = 5 cada uno de ellos.



### **Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nódulos o raíces de plantas de maní**

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midió siguiendo la metodología propuesta por Alexieva y col. (2001).

Cien mg de material vegetal (raíz o nódulos) congelados fueron molidos en un mortero con nitrógeno líquido, y posteriormente se les añadió ácido tricloroacético (TCA) 0,1% (p/v). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min, y el sobrenadante fue trasvasado a un tubo Eppendorf estéril. La mezcla de reacción consistió en 160 µl de buffer fosfato 100 mM (pH 6,8), 680 µl de KI 1 M y 160 µl de extracto vegetal. El blanco de la prueba consistió en TCA 0,1% (p/v) en ausencia del extracto vegetal. Se incubó la mezcla de reacción durante 1 h en oscuridad y posteriormente se midió la absorbancia a 390 nm. El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue calculado utilizando una curva estándar obtenida a partir de determinaciones realizadas con concentraciones conocidas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. El experimento se repitió dos veces con un n = 5 cada uno de ellos.

### **Cuantificación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en raíces de plantas de maní**

El contenido de O<sub>2</sub><sup>-</sup> se midió siguiendo la metodología propuesta por Frahry y Schopfer (2001).

Las raíces de plantas maní fueron inoculadas con 1 ml de cultivo de la cepa salvaje o de la cepa isogénica mutante en la zona de emergencia de las raíces laterales. Controles negativos (plantas no inoculadas) también fueron incluidos. Se extrajeron 5 raíces por tiempo (0, 5, 10, 15, 30, 60, 240 min pi) y por tratamiento. El conjunto de 5 raíces se colocó en un tubo de ensayo que contenía 1 ml de la mezcla de reacción que consistía en buffer citrato de potasio 10 mM (pH 6), KCl 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM y XTT 0,5 mM. La absorbancia se registró continuamente a una longitud de onda de 470 nm y se transformó en concentración molar utilizando el coeficiente de extinción molar del O<sub>2</sub><sup>-</sup> (2.16x10<sup>4</sup> L mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Sutherland y Learmonth, 1997). El experimento se repitió dos veces con un n = 5 cada uno de ellos.



### **Detección histoquímica de $O_2^-$ y de $H_2O_2$**

La localización in situ del  $O_2^-$  y de  $H_2O_2$  se realizó en las raíces de plantas de 5 días que fueron inoculadas como se describió más arriba. Controles negativos (plantas no inoculadas) también fueron incluidos.

La producción de  $O_2^-$  fue visualizada a los 0, 5, 10, 15, 30, 60 y 240 min pi utilizando nitroblue tetrazolium (NBT) de acuerdo al método de Frahry y Schopfer (2001). Segmentos de raíces frescos fueron incubados por 8 h a 25°C en 3 ml de buffer citrato de sodio 10 mM (pH 6), conteniendo 1 mM NBT. Cuando el NBT reacciona con el  $O_2^-$  se forma un precipitado insoluble azul oscuro. Las raíces teñidas fueron luego clarificadas con etanol 80% (v/v) y conservadas en 3 ml de agua-glicerol (1:1). Luego se realizaron cortes transversales de la raíz a mano alzada, los que fueron observados con un microscopio estereoscópico Stemi SV6 Carl Zeiss provisto de una cámara digital Cannon. El experimento se repitió dos veces con un n = 3 cada uno de ellos.

El  $H_2O_2$  fue visualizado utilizando 3,3-diaminobenzidine (DAB) como sustrato de acuerdo al método descrito por Orozco-Cárdenas y Ryan (1999). Segmentos de raíz fueron incubados por 12 h a 25°C en 3 ml de una solución DAB-HCl (1 mg ml<sup>-1</sup>, pH 3,8). Cuando el DAB reacciona con el  $H_2O_2$  se forma un precipitado insoluble marrón. Las raíces teñidas fueron luego clarificadas con etanol 80% (v/v) y conservadas en 3 ml de agua-glicerol (1:1). Luego se realizaron cortes transversales de la raíz a mano alzada, los que fueron observados con un microscopio estereoscópico Stemi SV6 Carl Zeiss provisto de una cámara digital Cannon. El experimento se repitió dos veces con un n = 3 cada uno de ellos.

### **Extracción de proteínas de raíces de plantas de maní**

Para medir la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD; EC 1.15.1.1) (EC 1.15.1.1), catalasa (CAT; EC 1.11.1.6) y NADPH oxidasa (EC 1.6.3.1), las raíces congeladas fueron homogeneizadas en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se le añadió buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,4, pH 7,8, o pH 7 para SOD, CAT o NADPH oxidasa respectivamente) conteniendo EDTA (1, 0,5 o 0,2 mM para SOD, CAT o NADPH oxidasa respectivamente) 1 % (p/v) de polivinilpolipirrolidona (PVP), y Triton X-100 al 0,5 % (v/v) (para actividad SOD y CAT) o al 0,1 % (v/v) (para actividad NADPH oxidasa). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min a 4°C, y el sobrenadante fue



trasvasado a un tubo Eppendorf estéril y utilizado para las posteriores determinaciones de actividades enzimáticas.

Para medir la actividad de enzimas peroxidasas totales (PX), las raíces congeladas fueron homogeneizadas en un mortero con nitrógeno líquido, posteriormente se le añadió buffer acetato de sodio 50 mM (pH 5), conteniendo 1 M de KCl, en relación 1:10 (mg de raíz  $\mu$ l de buffer<sup>-1</sup>). El homogeneizado se centrifugó a 10.000 rpm por 30 min a 4°C, y el sobrenadante constituyó la fracción de PX.

### **Determinación de la actividad de las enzimas SOD, CAT, PX y NADPH oxidasa en raíces de plantas de maní**

La actividad SOD se determinó mediante el método propuesto por Beauchamp y Fridovich (1973). La mezcla de reacción consistió en buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7,8), conteniendo metionina 0,777 mM, NBT 75  $\mu$ M, EDTA 0,1 mM, riboflavina 1 mM y 20  $\mu$ l de extracto de raíz en un volumen final de 1 ml. Se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 560 nm en oscuridad (blanco para cada muestra) y posteriormente se expusieron a luz U.V. durante 7 min y se midió nuevamente la absorbancia a la misma longitud de onda. El testigo se obtuvo a partir de diferentes concentraciones de riboflavina. Una unidad (U) SOD fue definida como la cantidad de enzima capaz de inhibir en un 50% la reducción del NBT, y se expresó en U mg proteínas<sup>-1</sup>. El experimento se repitió tres veces con un n = 5 cada uno de ellos.

La actividad CAT se determinó midiendo el consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a una longitud de onda de 240 nm según el método propuesto por Aebi (1984). La mezcla de reacción consistió en buffer fosfato de potasio 50 mM (pH 7), 5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y un volumen de extracto de raíz ajustado a 25  $\mu$ g proteínas ml<sup>-1</sup> en un volumen final de reacción de 500  $\mu$ l. La desaparición del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se calculó por la ley de Lambert-Beer utilizando su coeficiente de extinción molar a 240 nm (40 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>). La actividad de la enzima CAT se expresó en nmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mg proteínas<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. El experimento se repitió dos veces con un n = 5 cada uno de ellos.

La actividad PX se determinó según el método propuesto por Sosa Alderete y col. (2009). La mezcla de reacción consistió en buffer acetato de sodio 0,1 M (pH 5,5), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 mM, orto-dianisidina 0,63 mM (sustrato reductor) y un volumen de extracto de raíz conteniendo aproximadamente 25  $\mu$ g proteínas ml<sup>-1</sup> en un volumen final de reacción de 1000  $\mu$ l. Se determinó el incremento en la absorbancia a una longitud de onda de 470 nm como resultado de la aparición de un producto coloreado [bis(3,3'-dimetoxi-4-amino)azobifenilo]



originado por la oxidación de la orto-dianisidina por las peroxidasas en un medio ácido y en presencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato oxidante. La actividad se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer utilizando el coeficiente de extinción molar  $11 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Una unidad (U) de PX se definió como la cantidad que cataliza la formación, en 1 min de reacción, de 1  $\mu\text{mol}$  de producto. La actividad PX se expresó en  $\text{U mg proteínas}^{-1}$ . El experimento se repitió dos veces con un  $n = 5$  cada uno de ellos.

La actividad NADPH oxidasa se determinó midiendo la oxidación de NADPH a una longitud de onda de 340 nm. La mezcla de reacción consistió en buffer acetato de sodio 30 mM (pH 6,5), 50  $\mu\text{M}$  de NADPH, 5 mM de  $\text{MnCl}_2$ , 20  $\mu\text{M}$  de ácido p-cumárico y 20  $\mu\text{l}$  de extracto de raíz ajustado en un volumen final de reacción de 500  $\mu\text{l}$ . La oxidación del NADPH se calculó por la ley de Lambert-Beer utilizando su coeficiente de extinción molar a 340 nm ( $6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). La actividad de la enzima NADPH oxidasa se expresó en  $\text{U mg proteínas}^{-1}$  (Ishida y col., 1987). El experimento se repitió dos veces con un  $n = 5$  cada uno de ellos.

### **Cuantificación de proteínas**

El contenido proteico fue determinado por el método de Bradford (1976), utilizando albúmina bovina ( $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ) como estándar.

### **Evaluación del estallido oxidativo en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia de nitrógeno asimilable**

Con el fin de evaluar si se produce estallido oxidativo en plantas inoculadas cuando crecen en presencia de una fuente de nitrógeno asimilable, las raíces de 5 plantas de maní de 5 días creciendo en frascos de vidrio que contenían papel de filtro estéril humedecido con medio Hoagland sin nitrógeno o con  $\text{KNO}_3$  5 mM, fueron inoculadas en la zona de emergencia de la raíz lateral con 1 ml de cultivo de la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 ( $10^9$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ). Además, se incluyeron plantas controles sin inocular. En todos los tratamientos, las plantas fueron cosechadas a los 5 y 10 min pi y se determinó el contenido  $\text{H}_2\text{O}_2$  siguiendo la metodología descrita más arriba (Alexieva y col., 2001). El experimento se repitió dos veces con un  $n = 5$  cada uno de ellos.



### **Evaluación del rol de EROs en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144**

Con el fin de evaluar el requerimiento de la producción de  $H_2O_2$  por la planta en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., se propuso disminuir los niveles de dicha molécula mediante la adición de KI o de la enzima CAT. Con tal fin se determinó en una primera instancia los niveles óptimos de dichos compuestos que inhiben o disminuyen la producción de  $H_2O_2$  sin afectar el crecimiento de la planta. Para ello las raíces de 5 plantas de maní fueron inoculadas en la zona de emergencia de la raíz lateral con 1 ml de cultivo de la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, adicionando simultáneamente KI 0,5, 1,5, 3 mM o CAT exógena ( $1000\text{ U ml}^{-1}$ ). Además, se incluyeron plantas controles sin inocular. A los 10 min pi, se determinó el contenido  $H_2O_2$  siguiendo la metodología descrita más arriba (Alexieva y col., 2001). El experimento se repitió dos veces con un  $n = 5$  cada uno de ellos.

Luego de conocidas las concentraciones de KI o de CAT a adicionar, se realizaron los siguientes ensayos:

- *Evaluación de la interacción simbiótica en presencia de CAT exógena.*

Plantas de maní creciendo en macetas con vermiculita estéril se inocularon con 3 ml de un cultivo de la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 ( $10^9\text{ ufc ml}^{-1}$ ), y simultáneamente se adicionó  $1000\text{ Uml}^{-1}$  de la enzima CAT (EC 1.11.1.6, SIGMA). En todos los tratamientos, las plantas fueron cosechadas a los 28 días pi y se determinó el número de nódulos formados, el porcentaje de nódulos rojos y el peso seco de la parte aérea. El experimento se repitió dos veces con un  $n = 5$  o 10 cada uno de ellos.

- *Evaluación de la interacción simbiótica en presencia de KI.*

Plantas de maní creciendo en macetas con vermiculita estéril se inocularon con 3 ml de un cultivo de la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 ( $10^9\text{ ufc ml}^{-1}$ ), y simultáneamente se adicionó KI 0,5 o 1,5mM. En todos los tratamientos, las plantas fueron cosechadas a los 28 días pi y se determinó el número de nódulos formados, el porcentaje de nódulos rojos. Además se evaluó la ultraestructura de estos órganos por microscopía electrónica y se determinó el peso seco de la parte aérea de las plantas. El experimento se repitió tres veces con un  $n = 5$  cada uno de ellos.



- *Evaluación de la ultraestructura de nódulos mediante Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)*

El 10-20% de los nódulos formados en cada planta se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % en buffer S-collidine (0,2 M, pH 7,4) durante 3 h a 4°C y luego se lavaron dos veces con dicho buffer. Luego se fijaron en tetróxido de osmio al 1% durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron dos veces en buffer S-collidine y se deshidrataron sumergiéndolos durante 15 min en concentraciones crecientes de acetona (30%, 50%, 70% y 90%) y 3 veces en acetona 100% durante 15 min. La preinclusión se realizó en una mezcla 1:1 de resina epoxi EMBED 812 y acetona 100%, durante toda la noche a temperatura ambiente. La inclusión se realizó en EMBED812 con una incubación a 56°C, durante 48 h. A través de un ultramicrotomo manual, utilizando cuchillas de vidrio, se obtuvieron cortes semifinos ( $\pm 0,25 \mu\text{m}$ ) los que fueron teñidos con azul de toluidina y observados al microscopio óptico para la elección de la zona de interés. Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos (20-60 nm) con cuchilla de diamante, los que se colocaron sobre grillas de cobre de 250 mesh y se contrastaron con acetato de uranilo durante 30 min y con citrato de plomo durante 8 min. La observación de la ultraestructura de los nódulos se realizó a través de un microscopio electrónico de transmisión Elmiskop 101 y la adquisición de imágenes mediante un microscopio electrónico de transmisión JEM 1200 EXII. En los cortes procesados se realizaron mediciones morfométricas (área de los simbiosomas y área de los bacteroides) utilizando el software AxioVisionRelease 4.6.3.

- *Técnica de Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR)*

Se utilizaron los cortes semifinos ( $\pm 0,25 \mu\text{m}$ ) de nódulos de plantas de maní procesados para microscopía electrónica de transmisión. Los mismos fueron colocados sobre un portaobjetos de vidrio y teñidos con azul de toluidina sobre una platina termostatizada, para permitir la entrada del colorante al tejido incluido en la resina. Los cortes semifinos coloreados fueron montados en DPX (medio de montaje para preparaciones de microscopía) y observados a través de un microscopio óptico Axiophot. La adquisición de las imágenes se realizó mediante una cámara digital Powershot G6, 7,1 megapixels adosada al microscopio óptico y el procesamiento de las mismas a través del software AxioVisionRelease 4.6.3. En



los cortes semifinos procesados se realizaron mediciones morfométricas, que permitieron calcular la densidad (número de bacteroides área celular<sup>-1</sup>), utilizando el software AxioVisionRelease 4.6.3.

### **Evaluación de la expresión del gen *prx1* en plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 o *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>**

#### *- Obtención de raíces de plantas de maní*

Se obtuvieron raíces de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 o con la cepa isogénica mutante *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>, siguiendo la metodología descrita más arriba. Se tomaron muestras a los 30, 60 y 240 min pi.

#### *- Extracción de ARN total*

La extracción de ARN total se realizó a partir de 0,1 g de raíces de un pool de 4 plantas usando el kit NucleoSpin RNA Plant II de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Macherey-Nagel). La integridad del ARN obtenido se verificó en geles de agarosa. La cuantificación del ARN obtenido y del ADN contaminante presente en la muestra se realizó utilizando los kits de cuantificación; Qubit RNA BR Assay Kits y Qubit DNA BR Assay Kits (Invitrogen) respectivamente.

#### *- Obtención de cDNA*

A partir del ARN obtenido se realizó la síntesis de la primera hebra de ADNc mediante RT-PCR empleando el kit MMLV reverse transcriptase 1° strandcDNAsynthesis (EPICENTRE-BIOTECHNOLOGIES) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido se cuantificó por fluorescencia utilizando el kit QubitssDNAAssay (Molecular Probes).

#### *- Ensayo de real time PCR (qReal-Time PCR)*

Las muestras de ADNc se utilizaron en ensayos de Real-Time PCR empleando cebadores específicos para el gen *prx1* y el kit Brilliant SYBR green QPCR master (Agilent Technologies) en un equipo Stratagene Mx3005P. Como control de contaminación con ADN

genómico se utilizaron como molde para la amplificación productos de las reacciones de síntesis de la primera hebra sin el agregado de la Reversa Transcriptasa. La abundancia relativa de transcriptos del gen *prx1* fue calibrada y normalizada a la del gen de ubiquitina (gen constitutivo), el cual fue amplificado con los cebadores RTUBQf: 5'AAGCCGAAGAAGATCAAGCAC3' y RTUBQr: 5'GGTTAGCCATGAAGGTTCCAG3' (Luo y col., 2005). Los niveles de transcripción relativos se calcularon mediante el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak y Schmittgen, 2001). El experimento consistió en dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas con un n = 4 cada uno de ellos.

### **Inhibición de la actividad de peroxidasas bacteriana mediante la adición de Ácido Salicilhidroxámico (SHAM)**

- *Determinación de la viabilidad de Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia de SHAM.*

Se analizó la viabilidad de la cepa *Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144* creciendo en presencia del compuesto inhibidor SHAM. Para ello, se obtuvo en medio YEM un cultivo bacteriano en fase estacionaria ( $DO_{620nm} = 1$ ,  $10^9$  ufc  $ml^{-1}$ ). Noventa y cinco  $\mu l$  de este cultivo fueron inoculados en Erlenmeyer de 50 ml conteniendo 15 ml de medio YEM con el agregado de SHAM (0,2; 0,5; 1 o 2mM) e incubados a 28°C en agitación (150 rpm). Se extrajeron muestras de 1 ml a las 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h de crecimiento y se midió la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm. Para determinar la viabilidad se tomaron muestras de 0,1 ml a las 120 h de crecimiento y se determinó ufc  $ml^{-1}$  mediante la técnica de la microgota (Somasegaran y Hoben, 1994). El experimento se repitió tres veces con un n = 3 cada uno de ellos.

- *Determinación de la actividad PX en Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia de SHAM (0,2mM)*

Para la determinación de la actividad PX, *Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144* fue crecida en 15 ml de medio YEM con o sin el agregado de SHAM 0,2 mM. Dicho volumen de cultivo bacteriano se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y se lavó 2 veces con solución fisiológica. El pellet se resuspendió en 2 ml de buffer de extracción (50 mM buffer fosfato, 1 mM Na-EDTA pH 7,5), se sonicó (amplitud: 80; tiempo: 2 min; pulso: cada 6 seg) y luego se



centrifugó nuevamente (12.000 rpm durante 10 min). El sobrenadante se utilizó para la determinación de la actividad de enzimas PX. El contenido proteico fue determinado por el método descrito más arriba (Bradford, 1976).

La actividad PX se determinó mediante la técnica propuesta por Sosa Alderete y col. (2009), descrita más arriba. El experimento se repitió tres veces con un  $n = 3$  o  $5$  cada uno de ellos.

- *Cuantificación de  $H_2O_2$  en raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia o ausencia de SHAM.*

Se obtuvieron raíces de plantas de maní siguiendo la metodología descrita más arriba excepto que en este ensayo se utilizó como inoculante *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 cultivada en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM. Se tomaron muestras a los 5, 10 y 15 min pi y el contenido de  $H_2O_2$  se midió siguiendo la metodología descrita más arriba (Alexieva y col., 2001). El experimento se repitió dos veces con un  $n = 5$  cada uno de ellos.

- *Evaluación del fenotipo simbiótico.*

Con el fin de evaluar el proceso simbiótico cuando los niveles de PX de *Bradyrhizobium* sp. se encuentran disminuidos, plantas de maní creciendo en macetas con vermiculita estéril se inocularan con 4 ml de un cultivo de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 ( $10^9$  ufc  $ml^{-1}$ ), crecido en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM. Las plantas fueron cosechadas a los 28 días pi y se determinó el número de nódulos formados, el porcentaje de nódulos rojos y el peso seco de la parte aérea. El experimento se repitió dos veces con un  $n = 15$  cada uno de ellos.

### **Análisis de datos**

El análisis de datos se llevó a cabo utilizando el software InfoStat (Di Rienzo y col., 2010). Se realizó la prueba estadística ANOVA y el test a posteriori de Tukey para calcular diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (nivel de significancia: 0,05).



*Capítulo IV. Resultados y Discusión*  
*Objetivo 1*

### **Generación de EROs y rol del sistema antioxidante vegetal en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.**

Las EROs se consideran moléculas críticas para el óptimo establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno, en leguminosas que son infectadas de manera intracelular. Sin embargo no se dispone de información acerca del rol de estas especies parcialmente reducidas del oxígeno en leguminosas en las que, como ocurre en maní, los rizobios invaden los tejidos radicales exclusivamente de modo intercelular.

*Determinación de la producción cuantitativa y cualitativa de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.*

Para evaluar la existencia de un estallido oxidativo en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., se determinó cualitativamente y cuantitativamente la producción de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  en raíces de plantas de maní inoculadas con la cepa *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 a los 0, 5, 10, 15, 30, 60 y 240 min pi.

Los resultados obtenidos en la cuantificación de  $H_2O_2$  indican que sólo en raíces inoculadas se produjo un incremento en la concentración de esta ERO a los 10 min pi, retornando más tarde (15 min pi) a los valores basales (Tabla 4). La forma oxidada de DAB (un polímero insoluble de color marrón), muestra los sitios de acumulación de  $H_2O_2$ . En este estudio dicho precipitado se observó en la zona de emergencia de la raíz lateral (lugar de entrada de los bradirizobios a los tejidos epidérmicos y corticales de la raíz de maní) a los 10 min pi, en concordancia con los resultados cuantitativos (Figura 17). Por el contrario, los niveles de  $O_2^-$  de plantas inoculadas se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo, sin diferir de los obtenidos en plantas sin inocular (Tabla 5). La evaluación de la producción de esta ERO utilizando NBT confirmó este resultado, ya que no se observaron diferencias entre las raíces inoculadas y sin inocular (Figura 18).



Tabla 4. Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Tiempo (min pi)	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> tejido fresco	
	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144
0	9,83 ± 0,87 <sup>a</sup>	9,83 ± 0,87 <sup>a</sup>
5	10,05 ± 0,79 <sup>a</sup>	10,49 ± 0,95 <sup>a</sup>
10	11,17 ± 0,58 <sup>a</sup>	24,16 ± 1,25 <sup>b</sup>
15	9,26 ± 0,56 <sup>a</sup>	8,81 ± 0,30 <sup>a</sup>
30	8,23 ± 0,84 <sup>a</sup>	9,70 ± 1,04 <sup>a</sup>
60	9,38 ± 0,89 <sup>a</sup>	8,90 ± 0,73 <sup>a</sup>
240	8,13 ± 1,21 <sup>a</sup>	9,53 ± 0,52 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 5 - 10). pi: pos-inoculación. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0.05).

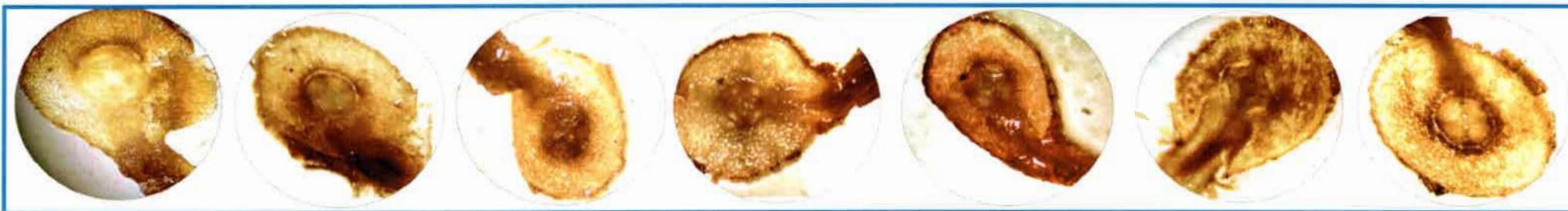
Tabla 5. Concentración de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Tiempo (min pi)	nmol O <sub>2</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> tejido fresco	
	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144
0	2,62 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,18 <sup>a</sup>
5	2,81 ± 0,15 <sup>a</sup>	2,96 ± 0,34 <sup>a</sup>
10	2,33 ± 0,22 <sup>a</sup>	2,39 ± 0,11 <sup>a</sup>
15	2,97 ± 0,16 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,11 <sup>a</sup>
30	2,89 ± 0,11 <sup>a</sup>	2,90 ± 0,19 <sup>a</sup>
60	2,60 ± 0,04 <sup>a</sup>	2,55 ± 0,11 <sup>a</sup>
240	2,28 ± 0,09 <sup>a</sup>	2,88 ± 0,36 <sup>a</sup>

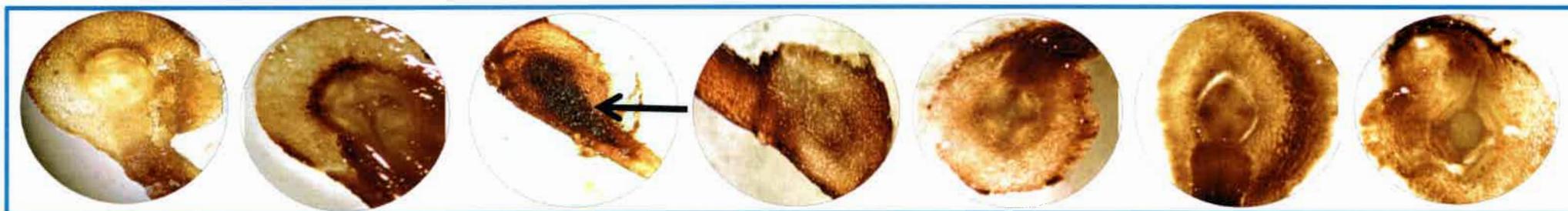
Los datos representan la media ± E.E. (n = 5). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0.05).



Plantas sin inocular



Plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144



0 min pi

5 min pi

10 min pi

15 min pi

30 min pi

60 min pi

240 min pi

**Figura 17.** Determinación cualitativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Cortes transversales de raíces de maní. La flecha indica el precipitado insoluble marrón propio de la reacción DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desde la zona de infección hacia la corteza radical. 5X



Plantas sin Inocular



Plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144



0 min pi

5 min pi

10 min pi

15 min pi

30 min pi

60 min pi

240 min pi

Figura 18. Determinación cualitativa de  $O_2^-$  en raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Cortes transversales de raíces de maní . 5X



El hallazgo de que en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. se produce un estallido oxidativo representado por un incremento en los niveles de  $H_2O_2$  es coincidente con lo reportado en la interacción *Medicago* sp.-*S. meliloti*. Sin embargo, el aumento de EROs en *Medicago* ocurre más tardíamente que en maní (12-48 h pi) e involucra no sólo al  $H_2O_2$  sino también al  $O_2^-$ . Además, la mayor producción de estas EROs fue observada en los HI, estructura involucrada en la entrada rizobiana a los tejidos radicales (Santos y col., 2001; Ramu y col., 2002; Peleg-Grosman y col., 2009, 2012). La rápida respuesta detectada en maní en comparación con *Medicago* probablemente esté relacionada con las diferentes vías de entrada que utilizan los rizobios para colonizar los tejidos de ambas leguminosas (ausencia de infección de células epidérmicas con entrada intercelular hasta alcanzar las células corticales en maní, e invasión de células epidérmicas con formación de HI en *Medicago*). Por otra parte, y dado que el incremento en los niveles de  $O_2^-$  ha sido relacionado con la regulación del curvado del pelo radical y del crecimiento polar del HI (Foreman y col., 2003; Gage, 2004), la ausencia de variaciones detectables en dicha ERO en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. también podría asociarse a las diferencias en el mecanismo de infección rizobiana entre ambas leguminosas.

- *Evaluación del estallido oxidativo en la interacción maní-Bradyrhizobium* sp. en presencia de nitrógeno asimilable.

A fin de evaluar si el estallido oxidativo detectado en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. es consecuencia exclusiva del proceso simbiótico y no sólo una respuesta a la colonización microbiana de la raíz, se propuso determinar la producción de  $H_2O_2$  cuando la planta crece en presencia de una fuente de nitrógeno asimilable ( $KNO_3$ ), ya que bajo estas condiciones no se establece la simbiosis.

Un incremento en la producción de  $H_2O_2$  a los 10 min pi se detectó sólo en aquellas raíces inoculadas y que crecieron en ausencia de  $KNO_3$  (Tabla 6). Este resultado sugiere que dicho estallido oxidativo está relacionado con el establecimiento de la interacción simbiótica. Recientemente Gourion y col. (2015) propusieron que el incremento en las EROs durante las etapas tempranas de la simbiosis que se establece entre leguminosas y rizobios, es consecuencia de la percepción de patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PPR). Estos son epítopes específicos ubicados en moléculas esenciales para la vida microbiana, ampliamente distribuidas entre los microorganismos y ausentes en la planta huésped, como flagelina,



lipopolisacáridos, entre otros (Soto y col., 2009). Se propone, por lo tanto, que el estallido oxidativo desencadenado en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. podría constituir una respuesta de defensa de la planta frente a los rizobios, desencadenada por el reconocimiento de MAMPs, o bien que el  $H_2O_2$  podría formar parte del repertorio de moléculas señal requeridas para el establecimiento de una simbiosis efectiva.

Resulta interesante el aumento significativo en los niveles de  $H_2O_2$  producido en raíces de plantas que crecieron en presencia de  $KNO_3$  con respecto a plantas cultivadas sin nitrógeno (Tabla 6). Esta elevada producción de  $H_2O_2$  podría estar asociada con diversos procesos metabólicos y fisiológicos que se activan en las plantas bajo estas condiciones, tales como la generación de ON. Es conocido que el ON inhibe la actividad de la enzima CAT vegetal, con el consecuente incremento en los niveles de  $H_2O_2$  (Klessig y col., 2000). Stöhr y Stremlau (2006) informaron un aumento en el ON generado en tejidos vegetales cuando las plantas crecen en presencia de elevados niveles de nitrógeno asimilable. Según estos autores, este incremento de ON desencadenaría en la planta una respuesta hipersensible (mecanismo asociado a un estallido oxidativo), previniendo de este modo el establecimiento de asociaciones simbióticas planta-microorganismos. En concordancia con ello, Gyan'ko y col. (2008) propusieron que los elevados niveles de ON en suelos fertilizados, como consecuencia de la desnitrificación microbiana, pueden afectar la interacción rizobios-leguminosas. En *Pisum sativum*, se demostró además que el agregado de nitrógeno mineral al suelo tiene un efecto perjudicial sobre la adherencia y penetración de los rizobios a los tejidos radicales, debido a que se incrementa la reducción de nitratos por las células vegetales, con la consecuente generación de ON (Mitanova y col., 2006). Es por lo tanto probable que la elevada producción de  $H_2O_2$  detectada en plantas de maní que crecieron con  $KNO_3$  esté asociada con un aumento en los niveles de ON, activando una respuesta de defensa de la planta e inhibiendo el proceso simbiótico.



Tabla 6. Producción de  $H_2O_2$  en raíces de plantas de maní creciendo en presencia o ausencia de  $KNO_3$  5 mM e inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Tratamiento	nmol $H_2O_2$ g <sup>-1</sup> tejido fresco	
	Tiempo (min pi)	
	5	10
Plantas sin inocular y sin suplementar con $KNO_3$	14,20 ± 1,40 <sup>a</sup>	15,80 ± 1,50 <sup>a</sup>
Plantas sin inocular y suplementadas con $KNO_3$	76,60 ± 9,90 <sup>b</sup>	78,40 ± 7,20 <sup>b</sup>
Plantas inoculadas y sin suplementar con $KNO_3$	13,70 ± 1,70 <sup>a</sup>	23,83 ± 1,66 <sup>c</sup>
Plantas inoculadas y suplementadas con $KNO_3$	67,75 ± 4,50 <sup>b</sup>	74,26 ± 4,60 <sup>b</sup>

Los datos representan la media ± E.E (n = 5-10). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

- *Determinación de la participación de la NADPH oxidasa en la generación de  $H_2O_2$  en la interacción maní-Bradyrhizobium sp.*

La enzima NADPH oxidasa tiene un rol clave en la activación del estallido oxidativo desencadenado en las interacciones planta-patógeno (Marino y col., 2011). Estudios recientes indican que este complejo enzimático también parece jugar un papel importante en la producción de EROs durante el proceso simbiótico que se establece entre rizobios y leguminosas infectadas intracelularmente (Torres, 2010; Marino y col., 2012; Montiel y col., 2012; Puppo y col., 2013).

En esta tesis se evaluó la actividad de la enzima NADPH oxidasa a fin de determinar si la elevada producción de  $H_2O_2$  en las raíces de maní a los 10 min pi, es consecuencia de dicha actividad enzimática. Los resultados obtenidos mostraron que, hasta los 60 min pi, la actividad de la enzima no difirió entre raíces inoculadas y sin inocular (Tabla 7). La ausencia de cambios en la actividad de la enzima NADPH oxidasa en plantas inoculadas, permite sugerir que el incremento en los niveles de  $H_2O_2$  determinado en dichas plantas a los 10 min pi podría deberse a la acción de otras enzimas como por ejemplo amino oxidasas u oxalato



oxidadas tipo germina que han sido propuestas como productoras de  $H_2O_2$  en apoplasto (Bolwell y Wojtaszek, 1997; Hu y col., 2003; Walters, 2003).

Es llamativo el incremento observado en la actividad NADPH oxidasa a los 240 min pi, ya que no se correspondió con un aumento en los niveles de  $O_2^-$  (Tabla 5), aún cuando esta ERO es el producto principal de la actividad enzimática analizada. Esto puede atribuirse a que los niveles de  $O_2^-$  producidos son inferiores al límite de sensibilidad de las técnicas empleadas para su cuantificación. El aumento en la actividad de la enzima NADPH oxidasa en etapas más tardías que aquélla en la que ocurre el estallido oxidativo, también ha sido informado para leguminosas cuya infección rizobiana ocurre intracelularmente. En este sistema, la elevada actividad de la enzima resulta indispensable para una nodulación exitosa y una eficiente actividad fijadora de nitrógeno (D'Haese y col., 2003; Peleg-Grossman y col., 2007; Marino y col., 2011; Montiel y col., 2012, Marino y col., 2012). La importancia de la enzima NADPH oxidasa a tiempos más tardíos de la interacción podría asociarse a su participación en la regulación de la división y posterior diferenciación celular en raíces (Tsukagoshi y col. 2010), procesos que también ocurren durante el desarrollo del nódulo.

Tabla 7. Actividad NADPH oxidasa en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Tiempo (min pi)	U NADPH oxidasa mg proteínas <sup>-1</sup>	
	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144
0	1,73 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,17 <sup>a</sup>
5	1,57 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,36 ± 0,14 <sup>a</sup>
10	1,62 ± 0,11 <sup>a</sup>	1,38 ± 0,14 <sup>a</sup>
15	1,70 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,53 ± 0,10 <sup>a</sup>
30	1,61 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,98 ± 0,23 <sup>a</sup>
60	1,45 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,89 ± 0,12 <sup>a</sup>
240	1,61 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,04 ± 0,24 <sup>b</sup>

Los datos representan la media ± E.E (n = 7 - 10). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05).



- Rol del sistema antioxidante de maní en la interacción simbiótica con *Bradyrhizobium* sp.

Dado que los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní incrementan a los 10 min pi con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, es posible especular que, concomitante con ello, se activa el sistema antioxidante lo que posibilita el restablecimiento de los valores basales. Para corroborar esta hipótesis se determinaron las actividades de las enzimas CAT, PX y SOD en raíces de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Se observó un incremento estadísticamente significativo en la actividad CAT a los 15 y 30 min pi, retornando a los valores basales a los 60 min pi (Tabla 8). Este incremento se corresponde con la disminución en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> determinada al mismo tiempo (15 min pi) (Figura 19). Igualmente, la actividad PX aumentó en las raíces inoculadas a los 30 y 60 min pi, disminuyendo hasta alcanzar los valores basales a los 240 min pi (Tabla 9). En la interacción *M. sativa*-*S. meliloti* también se informó un incremento en la actividad CAT a las 4 y 8 h pi, la que disminuyó a las 24 h pi, en concordancia con el tiempo al cual los niveles de EROs se vieron aumentados (Bueno y col., 2001). Estos autores propusieron que el éxito de esta interacción simbiótica está vinculado, al menos en parte, con el aumento en la defensa antioxidante de la planta durante el período de pre-infección (0 a 48 h pi).

Tabla 8. Actividad CAT en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Tiempo (min pi)	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg proteínas <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup>	
	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144
0	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>
5	0,77 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,73 ± 0,11 <sup>a</sup>
10	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,05 <sup>a</sup>
15	0,65 ± 0,05 <sup>a</sup>	1,48 ± 0,20 <sup>b</sup>
30	0,59 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,44 ± 0,19 <sup>c</sup>
60	0,86 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,98 ± 0,11 <sup>a</sup>
240	0,53 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,71 ± 0,08 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 7 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05).

Tabla 9. Actividad PX en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Tiempo (min pi)	U PX mg proteínas <sup>-1</sup>	
	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144
15	2,54 ± 0,77 <sup>a</sup>	3,85 ± 0,47 <sup>a</sup>
30	3,32 ± 0,74 <sup>a</sup>	9,73 ± 0,90 <sup>b</sup>
60	2,76 ± 0,56 <sup>a</sup>	4,19 ± 0,94 <sup>c</sup>
240	2,44 ± 0,61 <sup>a</sup>	1,99 ± 0,25 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 5 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05).

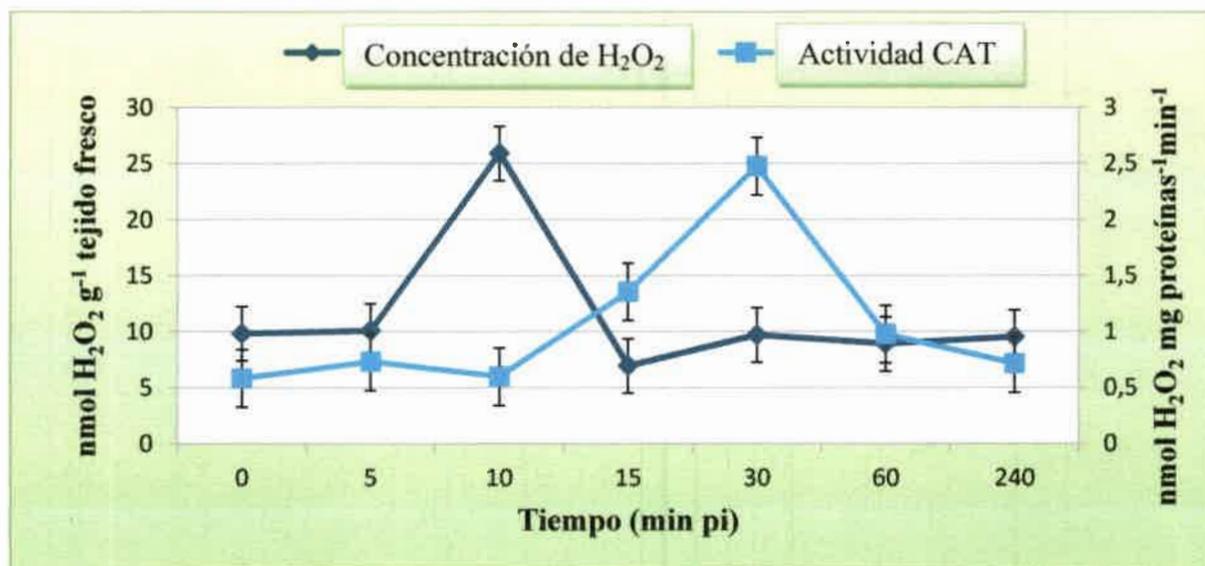


Figura 19. Variaciones entre los niveles de actividad CAT y la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Los datos representan la media ± E.E. (n = 5-10).

A diferencia de la actividad CAT y PX, la actividad SOD no se modificó luego del reconocimiento de los bradirizobios por la planta (Tabla 10). Esto es consistente con la ausencia de cambios en los niveles de O<sub>2</sub><sup>-</sup>. Otros autores tampoco detectaron cambios en la actividad SOD en etapas más tardías de esta interacción (Maiti y col., 2012). Sin embargo, en la simbiosis *M. sativa*-*S. meliloti*, Bueno y col. (2001) informaron que la actividad de esta enzima disminuyó como consecuencia de la inoculación.



Tabla 10. Actividad SOD en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.

Tiempo (min pi)	U SOD mg proteínas <sup>-1</sup>	
	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144
0	61,70 ± 7,20	61,70 ± 7,20
5	74,99 ± 10,21	61,08 ± 6,69
10	71,65 ± 9,40	67,23 ± 6,01
15	72,44 ± 8,43	67,41 ± 4,72
30	76,46 ± 8,97	69,34 ± 9,06
60	78,86 ± 10,58	67,99 ± 8,16
240	67,29 ± 5,63	67,80 ± 6,98

Los datos representan la media ± E.E (n = 9 - 15).

Si se relacionan los resultados obtenidos en la cuantificación de EROs con los de la actividad de enzimas del sistema antioxidante, es posible sugerir que la compatibilidad entre los simbioses en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., al igual que en leguminosas infectadas de manera intracelular, dependería fundamentalmente de la desintoxicación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a través de la actividad de CAT y PX.



*Capítulo V. Resultados y Discusión*  
*Objetivo 2*

### Rol de los FN sintetizados por *Bradyrhizobium* sp. en la modulación del estallido oxidativo y del sistema antioxidante en maní durante las etapas tempranas de la interacción.

En *Medicago* sp., *S. rostrata* y *P. vulgaris*, leguminosas que son infectadas intracelularmente, se ha descrito que la producción de EROs ( $H_2O_2$  y  $O_2^-$ ) es modulada por los FN, a través de la activación del sistema antioxidante de la planta (Puppo y col., 2013).

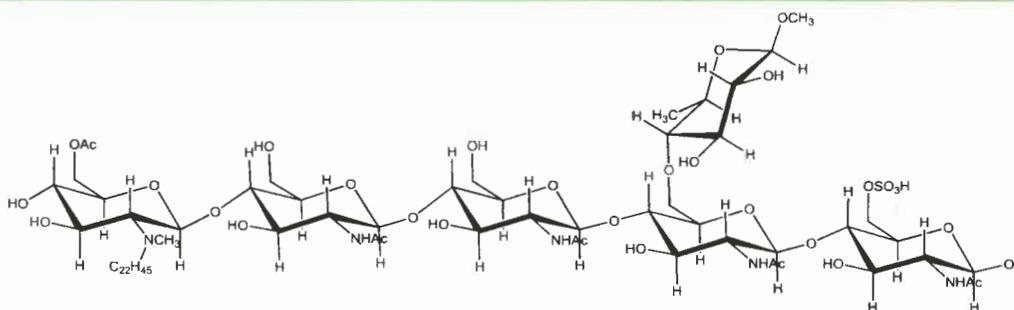
Para evaluar el rol de los FN en la modulación del estallido oxidativo producido en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. éste se analizó en plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> (cepa mutante no productora de FN) y en plantas tratadas con FN purificados, a diferentes tiempos pi. Con tal fin se obtuvieron FN de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y se evaluó su actividad biológica. La composición química de dichas moléculas también fue analizada.

- *Análisis de la composición química y actividad biológica de los FN producidos por Bradyrhizobium sp SEMIA 6144*

Los FN purificados se obtuvieron de un cultivo de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia de genisteína. Se utilizó este flavonoide ya que en un estudio previo se demostró que, de los analizados, genisteína fue el único que indujo la producción de FN (Taurian y col., 2008). Además, se incluyeron cultivos de la cepa *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> cuyo análisis permitió corroborar su fenotipo no productor de FN, ya que sólo se detectaron estas moléculas en cultivos provenientes de la cepa salvaje. La evaluación por HPLC de los FN purificados reveló que contienen metil fucosa, grupos sulfato y N-metilo como sustituyentes en el extremo reductor. En el extremo no-reductor, se determinó la presencia de grupos N-metilo y acetilo y del ácido graso C22:0 (behénico), lo cual fue interesante ya que, hasta nuestro conocimiento, no ha sido reportado este ácido graso como componente de los diferentes FN analizados (Figura 20).



[M <sup>+</sup> H] <sup>+</sup>	Fragmentos	Estructura
1596	1596, 1517, 1135, 932, 729, 526	V, C22:0, NMe, OAc; O-MeFuc (en 4 <sup>a</sup> unidad de GlcNAc); S



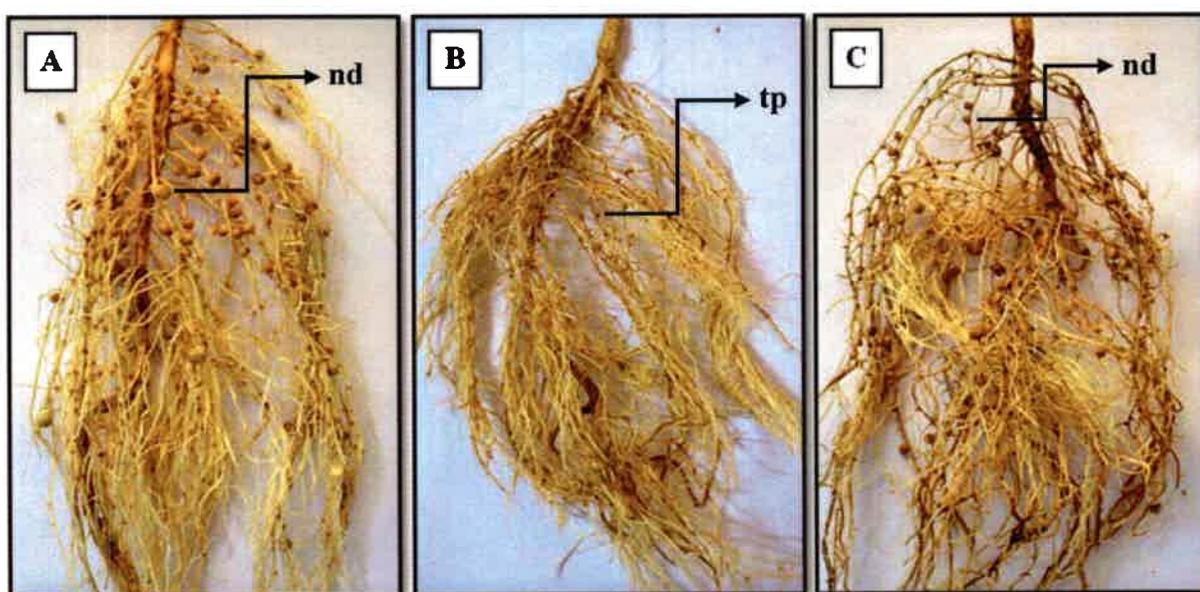
**Figura 20.** Factor Nod producido por *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 (simbiote de maní) en presencia de genisteína. Referencia: [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>: Ión molecular protonado.

Se ha demostrado que la presencia del grupo sulfato en los FN de *S. meliloti* es requerida para una exitosa interacción con *M. sativa*, y para la nodulación de *Leucaena leucocephala* por *R. tropici* (Folch-Mallol y col., 1998). En un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación se determinó que, a diferencia de SEMIA 6144, los FN producidos por una cepa nativa de *Bradyrhizobium* sp. que nodula maní carecen de grupos sulfato (Taurian y col., 2008). Por lo tanto, es probable que este sustituyente no sea relevante para el establecimiento de la simbiosis maní- *Bradyrhizobium* sp.

A fin de corroborar la actividad biológica de los FN, se realizó un ensayo de complementación del fenotipo de la cepa mutante *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> con estas moléculas, para lo cual plantas de maní se inocularon simultáneamente con una suspensión bacteriana y con los FN purificados. Como era de esperar, ya que había sido demostrado en estudios previos (Ibáñez y Fabra, 2011), no se observaron nódulos en raíces inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>. Al igual que lo observado por Ibáñez y Fabra (2011), en estas plantas se visualizó la formación de estructuras que corresponden a tejido parenquimático hipertrófico, ubicadas en los sitios de emergencia de las raíces laterales (Figura 21 B). Estas estructuras actúan como depósitos de almidón y están relacionadas con la deficiencia de nitrógeno (Allen y Allen, 1940). En cambio, en plantas inoculadas simultáneamente con esta cepa y con FN se observó la presencia de nódulos, confirmando que los FN extraídos son biológicamente activos (Figura 21 C). El número total de nódulos formados así como la cantidad de nódulos eficientes (determinado por la visualización de su color rojo como consecuencia de la presencia de leghemoglobina) fueron significativamente menores a los

observados en plantas inoculadas con la cepa salvaje, lo que podría atribuirse a la concentración utilizada y/o estabilidad en el medio de los FN inoculados.

En plantas co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>, el número de nódulos formados fue significativamente mayor al de las inoculadas simultáneamente con la cepa mutante y con FN, pero significativamente menor al observado en plantas inoculadas sólo con la cepa salvaje (Tabla 11). Ello podría atribuirse a que la planta reconoce como patógeno a la cepa rizobiana no productora de FN, exacerbándose entonces la respuesta de defensa frente al consorcio microbiano integrado por *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> y *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144.



**Figura 21.** Evaluación de la actividad biológica de los FN de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Raíces de maní inoculadas con A) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, B) con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> y C) con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> y tratadas con FN. Referencias: nd, nódulo determinado; tp, tejido parenquimático hipertrófico.

Tabla 11. Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, co-inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>, o con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> y FN

Tratamiento	Peso seco aéreo (g planta <sup>-1</sup> )	Nº de Nódulos planta <sup>-1</sup>	% Nódulos Rojos
Plantas sin inocular	0,73 ± 0,03 <sup>a</sup>	-	-
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	1,20 ± 0,09 <sup>b</sup>	122 ± 9 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. FN	1,08 ± 0,05 <sup>b</sup>	66 ± 3 <sup>b</sup>	72 ± 2 <sup>b</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>	1,04 ± 0,04 <sup>b</sup>	93 ± 3 <sup>c</sup>	96 ± 4 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>	0,79 ± 0,03 <sup>a</sup>	-	-

Los datos representan la media ± E.E (n = 5). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05).

En lo que respecta al peso seco aéreo, no se observaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Tabla 11), lo que indicaría que la disminución del porcentaje de nódulos efectivos y del número total de nódulos formados no afectó la producción de biomasa. Además, los nódulos obtenidos a partir de plantas co-inoculadas y de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> y tratadas con FN fueron procesados para su observación por microscopía electrónica, a los efectos de analizar posibles variaciones en su ultraestructura. Los resultados indican que no existen diferencias significativas en el número de bacteroides área celular<sup>-1</sup> (0,14 ± 0,05 y 0,13 ± 0,04 respectivamente) entre estos nódulos y los inducidos por *Bradyrhizobium* sp SEMIA 6144 (0,14 ± 0,04), por lo que se puede inferir que el proceso de diferenciación de las bacterias en el tejido nodular no estaría alterado.



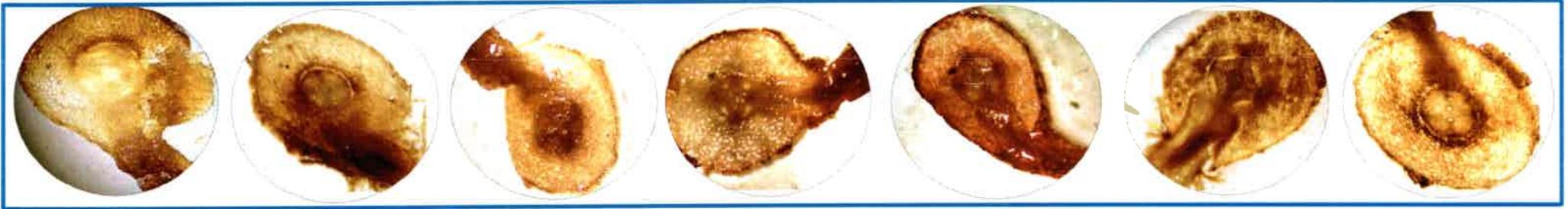
*Determinación de la participación de los FN en la producción del estallido oxidativo durante las etapas tempranas de la interacción maní-Bradyrhizobium sp.*

En raíces inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> se observó un incremento no sólo en la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sino también de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (171 % y 122 % respectivamente) a los 5 min pi, alcanzando los niveles basales a los 235 min pi (Tablas 12 y 13). Las determinaciones histológicas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y O<sub>2</sub><sup>-</sup> realizadas en cortes transversales de estas raíces, también indicaron la producción de ambas EROs a los 5 min pi y en la zona de emergencia de la raíz lateral (Figuras 22 y 23).

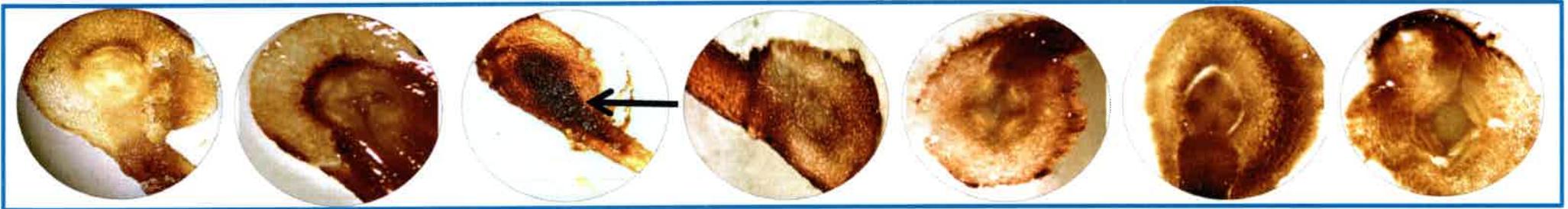
Estos resultados difieren de los obtenidos en las raíces inoculadas con la cepa salvaje, ya que en éstas se incrementó sólo la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, y este incremento fue menor, ocurrió más tardíamente (10 min pi) y resultó ser menos duradero dado que alcanzó los valores basales a los 15 min pi (Tablas 4 y 5). Como era de esperar, cuando las plantas fueron tratadas con FN purificados, se observó un aumento transitorio en la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a los 10 min pi (Tabla 12), al igual que lo que ocurre en las raíces inoculadas con la cepa salvaje (Tabla 4).



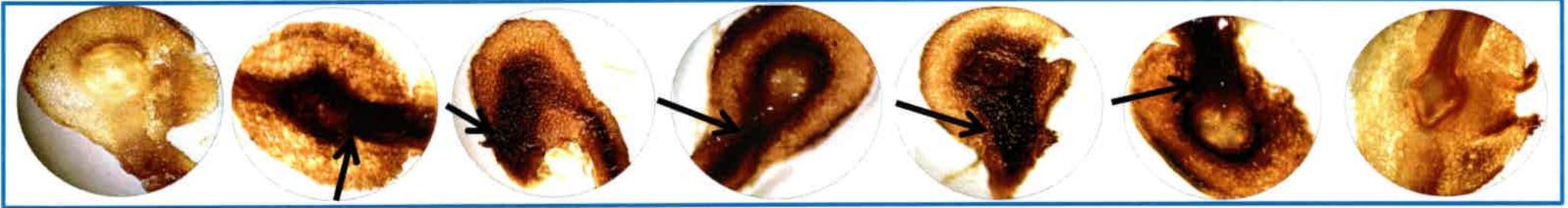
Plantas sin inocular



Plantas ioculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144



Plantas ioculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>



0 min pi

5 min pi

10 min pi

15 min pi

30 min pi

60 min pi

240 min pi

**Figura 22.** Determinación cualitativa de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. cepa salvaje o con la cepa isogénica mutante V<sub>2</sub>. Cortes transversales de raíces de maní . Las flechas indican el precipitado insoluble marrón propio de la reacción DAB-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> desde la zona de infección hacia la corteza radical. 5X



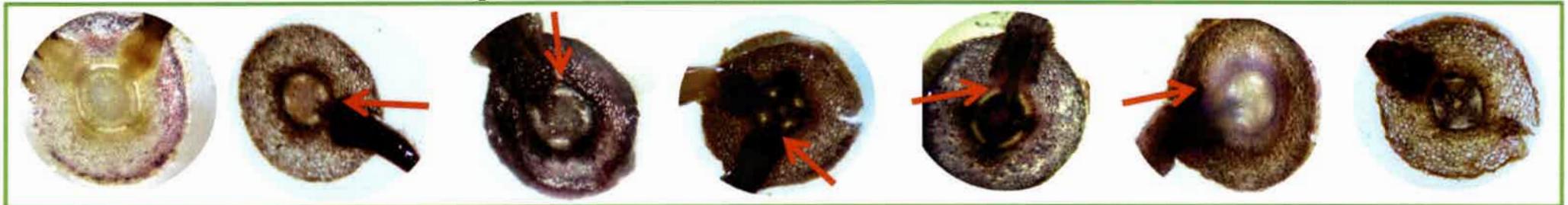
Plantas sin Inocular



Plantas Inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144



Plantas Inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>



0 min pi

5 min pi

10 min pi

15 min pi

30 min pi

60 min pi

240 min pi

**Figura 23.** Determinación cualitativa de  $O_2^-$  en raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. cepa salvaje o con la cepa isogénica mutante V<sub>2</sub>. Cortes transversales de raíces de maní . Las flechas indican el precipitado insoluble azul propio de la reacción  $NBT-O_2^-$  desde la zona de infección hacia la corteza radical. 5X



Tabla 12. Concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>.

nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> tejido fresco			
Tiempo (min pi)	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>	Plantas tratadas con FN purificados
0	9,83 ± 0,87 <sup>a</sup>	9,83 ± 0,87 <sup>a</sup>	ND
5	10,05 ± 0,79 <sup>a</sup>	27,24 ± 1,53 <sup>b</sup>	10,71 ± 1,1 <sup>a</sup>
10	11,17 ± 0,58 <sup>a</sup>	31,46 ± 1,10 <sup>c</sup>	26,33 ± 2,66 <sup>b</sup>
15	9,26 ± 0,56 <sup>a</sup>	32,36 ± 2,62 <sup>c</sup>	ND
30	8,23 ± 0,84 <sup>a</sup>	29,79 ± 1,06 <sup>c</sup>	ND
60	9,38 ± 0,89 <sup>a</sup>	20,04 ± 1,05 <sup>b</sup>	ND
240	8,13 ± 1,21 <sup>a</sup>	12,82 ± 0,67 <sup>a</sup>	ND

Los datos representan la media ± E.E. (n = 5 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05). Referencias: pi: pos-inoculación; ND: no determinado.

Tabla 13. Concentración de O<sub>2</sub><sup>-</sup> en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>.

nmol O <sub>2</sub> <sup>-</sup> g <sup>-1</sup> tejido fresco		
Tiempo (min pi)	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>
0	2,62 ± 0,18 <sup>a</sup>	2,62 ± 0,18 <sup>a</sup>
5	2,81 ± 0,18 <sup>a</sup>	6,25 ± 0,70 <sup>b</sup>
10	2,33 ± 0,22 <sup>a</sup>	11,96 ± 0,60 <sup>c</sup>
15	2,97 ± 0,16 <sup>a</sup>	13,46 ± 1,02 <sup>d</sup>
30	2,89 ± 0,11 <sup>a</sup>	7,15 ± 1,08 <sup>b</sup>
60	2,60 ± 0,04 <sup>a</sup>	5,17 ± 0,49 <sup>b</sup>
240	2,28 ± 0,09 <sup>a</sup>	3,19 ± 0,68 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 5). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05).

En raíces de *P. vulgaris*, luego de la interacción con *R. etli* se produce rápidamente un estallido oxidativo (30 s pi) (Cardenas y col., 2008). En raíces de *Medicago* sp. inoculadas con *S. meliloti*, la producción de EROs aumenta a medida que transcurre el proceso simbiótico. En etapas tempranas de esta interacción (30 min y 1 h pi), la producción de  $H_2O_2$  parece ser inhibida por los FN (Shaw y Long, 2003; Lohar y col., 2008). Sin embargo, más tardíamente (8-12 h pi) los niveles de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  se incrementan, alcanzado un pico a las 24 h pi (Santos y col., 2001; Ramu y col., 2002; Peleg-Grosman y col., 2009, 2012). Bueno y col. (2001) informaron que en plantas de *M. sativa* inoculadas con una cepa mutante de *S. meliloti* incapaz de producir FN, se incrementó la producción de  $H_2O_2$  a las 4 h pi, la que disminuyó luego de 12 h pi. En base a estos resultados los autores le adjudicaron a los FN un rol en la modulación del estallido oxidativo, permitiendo de este modo el correcto establecimiento y desarrollo de la simbiosis.

En esta tesis se proporcionan evidencias directas de que en las etapas tempranas (10 min pi) de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. se induce un estallido oxidativo que estaría representado sólo por  $H_2O_2$ . Este estallido sería modulado por los FN dado que, en ausencia de estas moléculas señal, no sólo se produce un aumento más pronunciado y sostenido en el tiempo en los niveles de  $H_2O_2$ , sino también de  $O_2^-$ . Esta respuesta de la planta frente a la ausencia de señal de los FN, podría deberse a que la planta reconoce como patógenos a los bradirizobios no productores de FN. Se conoce que en plantas de *M. sativa* inoculadas con una cepa de *S. meliloti* no productora de FN, concomitante con el aumento de la producción de EROs, se incrementan los niveles de ácido salicílico (AS), componente clave en la vía de señalización que culmina con la respuesta hipersensible frente a varios patógenos (Bueno y col., 2001).



- *Determinación de la participación de la NADPH oxidasa en la generación de  $H_2O_2$  y  $O_2^-$  en plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>*

En el capítulo 4 se mostraron resultados que indican que el incremento en los niveles de  $H_2O_2$  determinado en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 sería independiente de la actividad NADPH oxidasa. Teniendo en cuenta que dicha enzima tiene un papel clave en la respuesta de defensa que se activa frente a patógenos, se evaluó su rol en el estallido oxidativo que se produce en raíces de maní inoculadas con la cepa mutante. En estas raíces se determinó una alta actividad de dicha enzima en todos los tiempos analizados (5 a 240 min pi) (Tabla 14), lo que sugiere que desempeña un papel en la producción de EROs en ausencia de los FN a diferencia de lo que ocurre en presencia de estas molécula, donde la generación de EROs parecería estar ligada a la acción de oxidasas ubicadas en apoplasto. El hecho de que la actividad NADPH oxidasa permanezca elevada aún después de la disminución de los niveles de EROs podría ser consecuencia de la acción del sistema antioxidante.

Tabla 14. Actividad NADPH oxidasa en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>.

Tiempo (min pi)	NADPH oxidasa (U mg proteínas <sup>-1</sup> )	
	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>
0	1,73 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,73 ± 0,17 <sup>a</sup>
5	1,57 ± 0,13 <sup>a</sup>	2,79 ± 0,24 <sup>b</sup>
10	1,62 ± 0,11 <sup>a</sup>	3,63 ± 0,21 <sup>c</sup>
15	1,70 ± 0,19 <sup>a</sup>	3,54 ± 0,25 <sup>c</sup>
30	1,61 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,50 ± 0,26 <sup>c</sup>
60	1,45 ± 0,13 <sup>a</sup>	3,62 ± 0,33 <sup>c</sup>
240	1,61 ± 0,10 <sup>a</sup>	3,99 ± 0,17 <sup>c</sup>

Los datos representan la media ± E.E (n = 7 - 10). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey (p ≤ 0.05).



- Evaluación de la participación de los FN en la modulación del estallido oxidativo en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.

Para evaluar si los FN modulan el estallido oxidativo mediante la inducción del sistema antioxidante de maní, se analizó la actividad de las enzimas CAT, SOD y PX en plantas inoculadas con la cepa mutante *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos se compararon con los de raíces tratadas con FN o inoculadas con la cepa salvaje.

En plantas inoculadas con la cepa mutante, la actividad CAT no difirió de la determinada en plantas sin inocular y se mantuvo constante durante todos los tiempos ensayados (Tablas 15 y 16). Por el contrario, en raíces tratadas con FN la actividad CAT aumentó a los 15 y 30 min pi (Tabla 15) alcanzando valores similares a los determinados previamente en plantas inoculadas con la cepa salvaje (Tabla 8).

Tabla 15. Actividad CAT en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> o tratadas con FN purificados.

CAT (nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> mg proteínas <sup>-1</sup> min <sup>-1</sup> )			
Tiempo (min pi)	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>	Plantas tratadas con FN purificados
0	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	ND
5	0,77 ± 0,13 <sup>a</sup>	0,68 ± 0,12 <sup>a</sup>	ND
10	0,58 ± 0,04 <sup>a</sup>	0,74 ± 0,06 <sup>a</sup>	0,58 ± 0,09 <sup>a</sup>
15	0,65 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,57 ± 0,04 <sup>a</sup>	1,26 ± 0,13 <sup>b</sup>
30	0,59 ± 0,05 <sup>a</sup>	0,77 ± 0,05 <sup>a</sup>	2,27 ± 0,40 <sup>c</sup>
60	0,86 ± 0,12 <sup>a</sup>	0,82 ± 0,07 <sup>a</sup>	ND
240	0,53 ± 0,07 <sup>a</sup>	0,55 ± 0,05 <sup>a</sup>	ND

Los datos representan la media ± E.E. (n = 7 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según test de Tukey (p ≤ 0. 05). ND: no determinado.

Al igual que en raíces inoculadas con la cepa salvaje (Tabla 10), la actividad SOD en plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> se mantuvo constante a lo largo del tiempo (Tabla 16).

Tabla 16. Actividad SOD en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>.

SOD (U mg proteínas <sup>-1</sup> )		
Tiempo (min pi)	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>
0	61,70 ± 7,20	61,70 ± 7,20
5	74,99 ± 10,21	63,33 ± 8,99
10	71,65 ± 9,40	60,30 ± 6,01
15	72,44 ± 8,43	58,36 ± 6,47
30	76,46 ± 8,97	70,83 ± 8,50
60	78,86 ± 10,53	64,96 ± 8,12
240	67,29 ± 5,63	57,09 ± 5,63

Los datos representan la media ± E.E (n = 9 - 15).

En raíces inoculadas con la mutante, la actividad PX se incrementó desde los 30 hasta los 240 min pi, presentando un pico a los 60 min pi (Tabla 17), tiempo al cual disminuyó la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figura 24). En raíces tratadas con FN la actividad PX presentó el mismo patrón de actividad que en las inoculadas con la cepa salvaje (Tabla 9), aumentando a los 30 y 60 min pi y retornando a los valores basales a los 240 min pi. (Tabla 17).

Tabla 17. Actividad PX en raíces de maní a diferentes tiempos pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> o tratadas con FN purificados.

PX (U mg proteínas <sup>-1</sup> )			
Tiempo (min pi)	Plantas sin inocular	Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. V <sub>2</sub>	Plantas tratadas con FN purificados
15	2,54 ± 0,77 <sup>a</sup>	3,84 ± 1,00 <sup>a</sup>	3,76 ± 0,8 <sup>a</sup>
30	3,32 ± 0,74 <sup>a</sup>	9,89 ± 0,89 <sup>b</sup>	10,39 ± 1,92 <sup>b</sup>
60	2,76 ± 0,56 <sup>a</sup>	12,86 ± 0,67 <sup>d</sup>	4,87 ± 1,12 <sup>c</sup>
240	2,44 ± 0,61 <sup>a</sup>	5,39 ± 0,63 <sup>c</sup>	2,02 ± 0,50 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 5 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05).



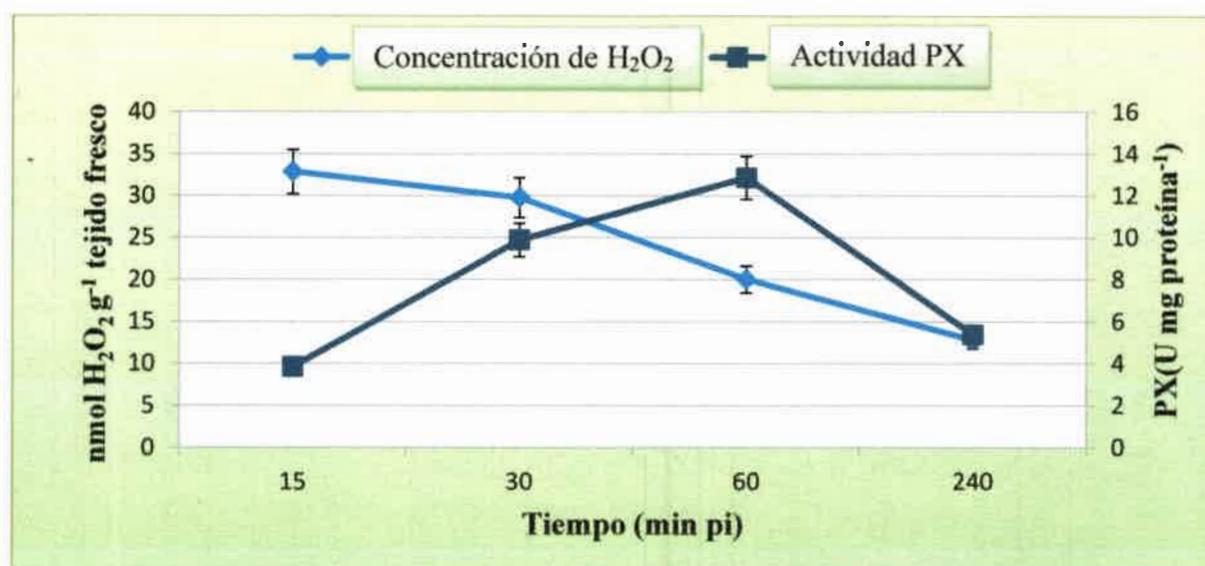


Figura 24. Variaciones de los niveles de actividad PX y de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>. Los datos representan la media ± E.E (n = 5-10).

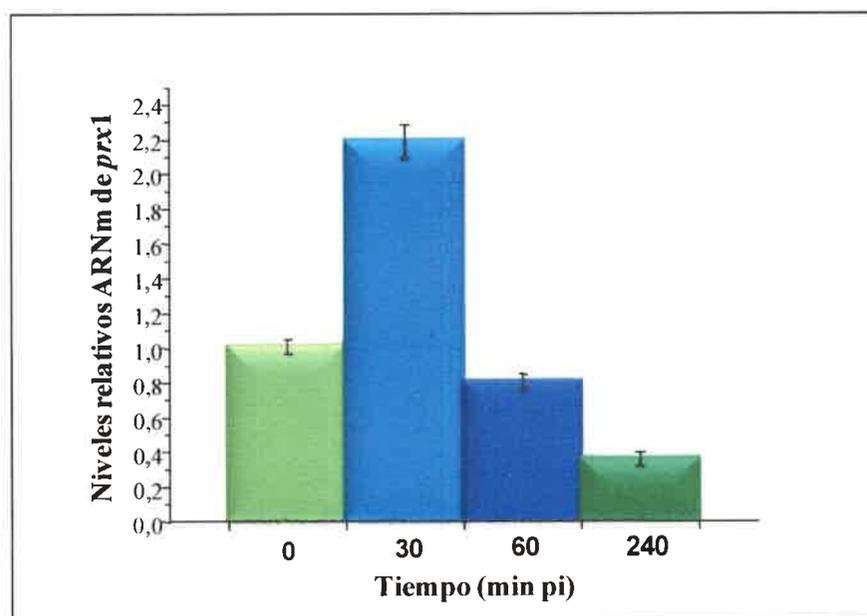
Teniendo en cuenta que la actividad CAT y PX aumentó tanto en raíces inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 como en las tratadas con FN, es posible sugerir que los FN participan en la inducción de la actividad de estas enzimas, atenuando así el estallido oxidativo, lo que posibilitaría el establecimiento de la interacción simbiótica maní-*Bradyrhizobium* sp.

En raíces de *M. truncatula* inoculadas con *S. meliloti* o tratadas con FN purificados, el incremento en los niveles de EROs se correspondió en tiempo y espacio con la activación de la expresión de *ripI*, un gen que codifica para una nodulina temprana con función peroxidasa (Ramu y col., 2002). La actividad de esta enzima en leguminosas infectadas por HI sería responsable de los cambios morfológicos requeridos para el normal desarrollo de esta estructura o de la regulación de su número (Cárdenas y col., 2008). Por otra parte, la expresión del gen que codifica la peroxidasa *Srprx1* en *S. rostrata*, cuya actividad es requerida para el correcto desarrollo de los HI, es dependiente de la presencia de FN y pareciera ser modulada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Den Herder y col., 2007). A diferencia de lo que ocurre en maní, en *S. rostrata* los rizobios invaden de manera intercelular el tejido epidérmico, con posterior formación del HI.

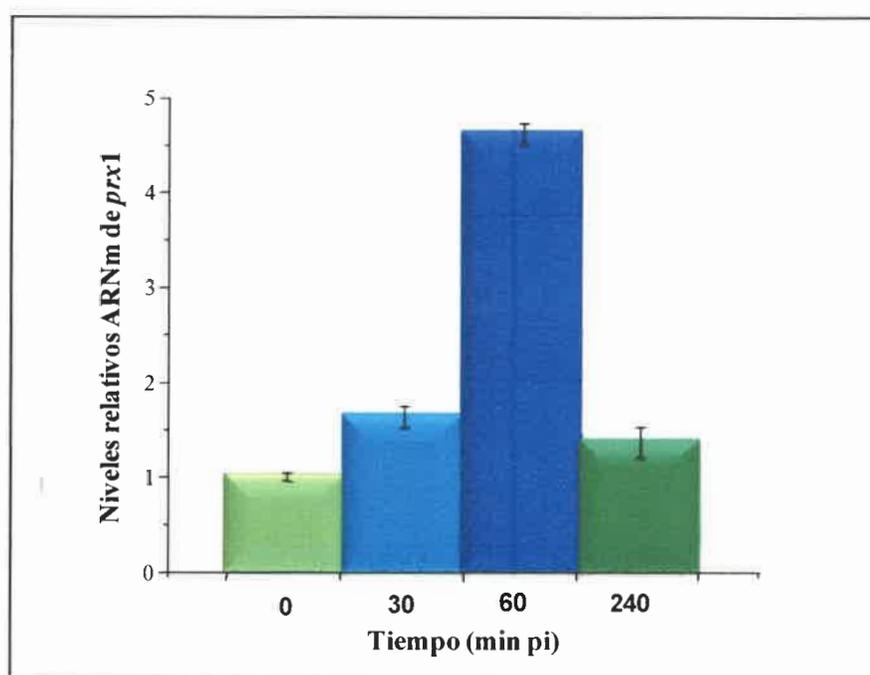


Con el fin de evaluar si el incremento en la actividad de las enzimas peroxidadasas en raíces inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 o con la cepa mutante es consecuencia de la inducción “*de novo*” de su síntesis, se propuso analizar mediante qReal-Time PCR la expresión del gen *prx1* en dichas raíces.

Los resultados obtenidos indican un incremento en los niveles de expresión del gen *prx1* a los 30 min pi, en las raíces inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 (Figura 25), mientras que en las inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub> se observó un aumento en todos los tiempos evaluados con un pico a los 60 min pi (Figura 26). Los tiempos en los que se observaron los mayores niveles de expresión son coincidentes con aquellas obtenidos en la determinación de la actividad enzimática (Tablas 9 y 18), por lo que se puede inferir que el incremento en la actividad PX es consecuencia de la inducción de su síntesis.



**Figura 25.** Niveles relativos de transcritos de *prx1* en raíces de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Los valores representan la media de dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas en un ensayo con n=4.



**Figura 26.** Niveles relativos de transcritos de *prx1* en raíces de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. V<sub>2</sub>. Los valores representan la media de dos réplicas biológicas con tres réplicas técnicas en un ensayo con n=4

A partir de los resultados presentados en este capítulo, se propone que los FN modulan el estallido oxidativo que se desencadena en las raíces de maní frente a su simbionte, activando el sistema antioxidante de la planta, y atenuando el sistema de generación de EROs, lo que contribuye al desarrollo de una simbiosis efectiva.

*Capítulo VI. Resultados y Discusión*  
*Objetivo 3*

### Determinación del requerimiento de la producción de EROs para la nodulación de plantas de maní.

Mediante el uso de diferentes compuestos que permiten modificar los niveles de  $H_2O_2$ , diferentes estudios han demostrado que las EROs son parte del repertorio de señales que contribuyen al establecimiento de una interacción simbiótica fijadora de nitrógeno efectiva en leguminosas cuya infección por rizobios requiere la formación de HI, ya sean éstos epidérmicos o corticales (Puppo y col., 2013).

Para evaluar si la producción de EROs constituye un requisito para el establecimiento de una exitosa interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., se redujeron los niveles de  $H_2O_2$  que se producen en plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y se analizó su fenotipo simbiótico. Se utilizaron dos estrategias con el fin de disminuir el contenido de  $H_2O_2$  en las raíces de dichas plantas:

- Adición de la enzima CAT
  - Adición de KI. El KI reduce el contenido de  $H_2O_2$  mediante una reacción de óxido-reducción que origina  $H_2O$  y  $O_2^-$ , disminuyendo de este modo los niveles de dicha molécula en el medio (Halliwell y Gutteridge, 1989).
- *Evaluación de la disminución de los niveles de  $H_2O_2$  con el agregado de KI o de la enzima CAT.*

La reducción en los niveles de  $H_2O_2$  en raíces de plantas de maní como consecuencia de la adición de KI (0,5, 1,5 o 3 mM) o CAT exógena ( $1.000\text{ U ml}^{-1}$ ) se evaluó a los 10 min pi, tiempo al cual la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 induce un incremento significativo en su concentración (Tabla 4).

Los resultados obtenidos revelaron que el agregado de CAT disminuyó en un 26,8 % el contenido de dicha ERO (Tabla 18), mientras que la adición de KI 0,5, 1,5 o 3 mM lo hizo de manera dosis dependiente (21,8 %, 41,9 %, y 57,9 % respectivamente). Con la adición de esta última concentración de KI, la producción de  $H_2O_2$  alcanzó los valores obtenidos en plantas sin inocular (Tabla 19).



Tabla 18. Producción de  $H_2O_2$  en raíces de maní a los 10 min pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de CAT exógena ( $1.000 U\ ml^{-1}$ ).

Tratamiento	Concentración $H_2O_2$ ( $nmol\ H_2O_2\ g^{-1}$ tejido fresco)
Plantas sin inocular	$15,29 \pm 3,12^a$
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	$32,83 \pm 5,49^c$
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + CAT ( $1.000\ U\ ml^{-1}$ )	$24,03 \pm 2,49^b$

Los datos representan la media  $\pm$  E.E. (n = 5 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Tabla 19. Producción de  $H_2O_2$  en raíces de maní a los 10 min pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI.

Tratamiento	Concentración $H_2O_2$ ( $nmol\ H_2O_2\ g^{-1}$ tejido fresco)
Plantas sin inocular	$14,16 \pm 1,33^a$
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	$38,16 \pm 3,50^c$
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 0,5 mM	$29,83 \pm 1,84^b$
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 1,5 mM	$22,16 \pm 2,16^c$
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 3 mM	$16,08 \pm 2,66^a$

Los datos representan la media  $\pm$  E.E. (n = 5 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Dado que ambas estrategias permitieron disminuir los niveles de  $H_2O_2$  en las raíces inoculadas, se evaluó el fenotipo simbiótico de plantas inoculadas y cuya producción de EROs fue inhibida mediante las dos metodologías.



- *Evaluación del fenotipo simbiótico en presencia de KI o CAT.*

Se evaluó el fenotipo simbiótico de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y a las que se adicionó KI (0,5, 1,5 o 3 mM) o CAT (1.000 U ml<sup>-1</sup>). En todos los tratamientos, las plantas fueron cosechadas a los 28 días pi y se determinó el número de nódulos, el porcentaje de nódulos eficientes y el peso seco de la parte aérea.

El agregado de CAT disminuyó en un 58,8 % la producción de biomasa de plantas inoculadas, la que alcanzó valores que no difirieron de los de plantas sin inocular, mientras que el KI (0,5, 1,5 o 3 mM) lo hizo en un 27,6 %, 30,5 % y 70,5% respectivamente (Tablas 20 y 21). Esta última concentración de KI fue descartada para continuar con los ensayos ya que redujo el peso seco por debajo de los que presentaban las plantas sin inocular.

Con respecto a la nodulación, la adición de CAT disminuyó en un 34 % el número de nódulos totales y en un 4,3 % el de nódulos eficientes (Tabla 20). Aún cuando el efecto de KI 1,5 mM sobre la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue más marcado que el de KI 0,5 mM, no hubo diferencias en la reducción del número de nódulos totales entre ambas concentraciones (Tabla 21), pero sí en la cantidad de nódulos rojos formados que sólo se vio disminuido en un 24% solamente en plantas tratadas con KI 1,5 mM (Tabla 21). Este efecto sobre el número de nódulos eficientes, se correlaciona con la reducción en la biomasa producida (Tablas 20 y 21). Llama la atención que la disminución del 26,8 % en los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> causada por la adición de CAT redunde en una disminución del 58,8% en la biomasa vegetal, mientras que el tratamiento con KI 1,5 mM, que disminuyó aún más el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (41,9%), afecte la producción de biomasa sólo en un 30,5%, aún cuando el número de nódulos formados en este tratamiento fue sensiblemente menor. Dado que es conocido que la producción de oxígeno mediada por la acción de CAT afecta la actividad de la enzima nitrogenasa (Matamoros y col., 2003), es probable que la eficiencia de los nódulos de plantas provenientes del tratamiento con CAT haya sido más baja que la de los nódulos de plantas provenientes del tratamiento con KI 1,5 mM, y que ello explique la marcada reducción en el contenido de biomasa de las primeras.



Tabla 20. Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de CAT exógena (1000 U ml<sup>-1</sup>).

Tratamiento	Peso seco aéreo (g planta <sup>-1</sup> )	Nº de Nódulos planta <sup>-1</sup>	% Nódulos Rojos
Plantas sin inocular	0,39 ± 0,03 <sup>a</sup>	-	-
Plantas sin inocular + CAT	0,41 ± 0,04 <sup>a</sup>	-	-
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	0,97 ± 0,07 <sup>a</sup>	112 ± 4 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + CAT (1000 U ml <sup>-1</sup> )	0,40 ± 0,08 <sup>a</sup>	74 ± 3 <sup>b</sup>	96,70 ± 1,40 <sup>b</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 10 - 12). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0.05).

Tabla 21. Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI (0,5, 1,5 o 3 mM).

Tratamiento	Peso seco aéreo (g planta <sup>-1</sup> )	Nº de Nódulos planta <sup>-1</sup>	% Nódulos Rojos
Plantas sin inocular	0,60 ± 0,04 <sup>a</sup>	-	-
Plantas sin inocular + KI 0,5 mM	0,58 ± 0,03 <sup>a</sup>	-	-
Plantas sin inocular + KI 1,5 mM	0,52 ± 0,02 <sup>a</sup>	-	-
Plantas sin inocular + KI 3 mM	0,36 ± 0,03 <sup>b</sup>	-	-
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	1,05 ± 0,11 <sup>c</sup>	86 ± 8 <sup>a</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 0,5 Mm	0,76 ± 0,03 <sup>d</sup>	36 ± 3 <sup>b</sup>	100 ± 0 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 1,5 Mm	0,73 ± 0,03 <sup>d</sup>	34 ± 3 <sup>b</sup>	76 ± 4 <sup>b</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 3 mM	0,31 ± 0,05 <sup>b</sup>	-	-

Los datos representan la media ± E.E. (n = 10 - 15). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0.05).

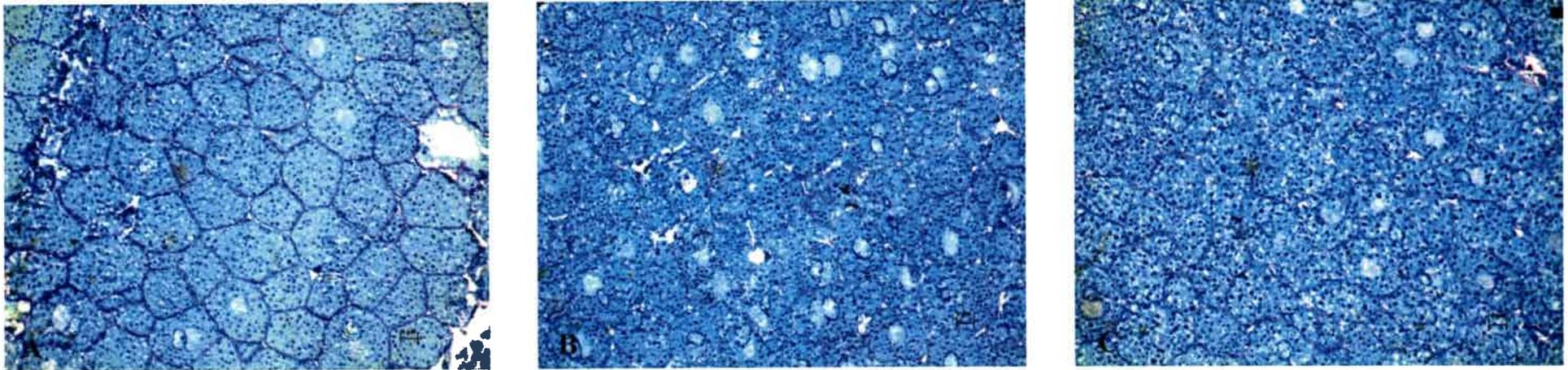


A partir de los resultados obtenidos, se seleccionó KI 0,5 mM y 1,5 mM para continuar los estudios. Con el fin de analizar si se altera la ultraestructura de los nódulos formados cuando se disminuyen los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producidos en la raíz durante la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp, se realizaron cortes ultrafinos que fueron analizados por microscopía óptica de alta resolución y por microscopía electrónica. En dichos cortes se observó la presencia de simbiosomas en las células del nódulo y se midieron parámetros como área del bacteroide (µm<sup>2</sup>), área del simbiosoma (µm<sup>2</sup>) y número de bacteroides área celular<sup>-1</sup>. Sólo se encontró un incremento significativo de este último parámetro en los nódulos de plantas inoculadas y tratadas con KI (0,5 o 1,5 mM) (Tabla 22) (Figuras 27 y 28).

Tabla 22. Área de simbiosomas, área de bacteroides y número de bacteroides área celular<sup>-1</sup> de nódulos de planta de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI (0,5 ó 1,5 mM).

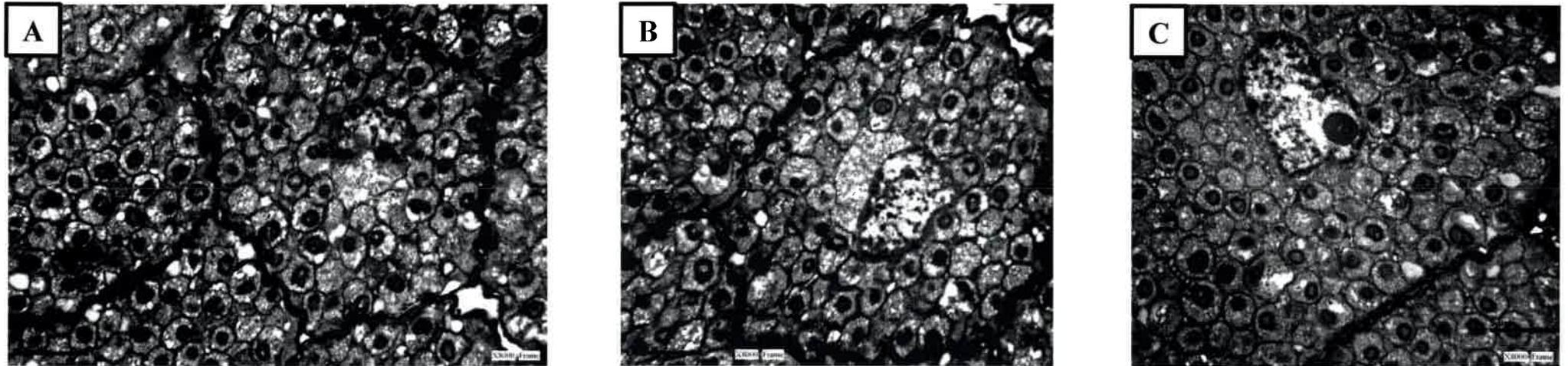
Tratamiento	Número de bacteroides área celular <sup>-1</sup>	Área del simbiosoma (µm <sup>2</sup> )	Área del bacteroide (µm <sup>2</sup> )
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	0,14 ± 0,04 <sup>a</sup>	4,55 ± 0,23 <sup>a</sup>	0,95 ± 0,05 <sup>a</sup>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 0,5 mM	0,18 ± 0,05 <sup>b</sup>	3,99 ± 0,13 <sup>a</sup>	1,11 ± 0,08 <sup>a</sup>
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 1,5 mM	0,20 ± 0,05 <sup>b</sup>	4,48 ± 0,27 <sup>a</sup>	0,97 ± 0,07 <sup>a</sup>

Los datos representan la media ± E.E. n = 12-58. Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0. 05).



**Figura 27.** Evaluación de cortes semifinos ( $\pm 0,25 \mu\text{m}$ ) de nódulos radicales de plantas de maní inducidos por: A) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, B) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 tratada simultáneamente con KI 0,5 mM y C) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 tratada simultáneamente con KI 1,5 mM. Microscopía Óptica de Alta Resolución (MOAR). 100X.





**Figura 28.** Evaluación de cortes ultrafinos (20-60 nm) de nódulos radicales de plantas de maní inducidos por: A) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144, B) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 tratada simultáneamente con KI 0,5 mM y C) *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 tratada simultáneamente con KI 1,5 mM. Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM). 8000X.



Es conocido que en nódulos indeterminados, el proceso de diferenciación bacteriana está bajo el control de péptidos antimicrobianos nódulo específico ricos en cisteína (NCR) (Van de Velde y col., 2010). Dado que los péptidos NCR son sensibles al balance redox (Haag y col., 2012), se ha propuesto que es posible que las EROs podrían regular, a través de la oxidación/reducción de dichos péptidos, el proceso de diferenciación bacteriana (Puppo y col., 2013). En este sentido, una doble mutante de *S. meliloti* que no expresa los genes *katB/katC* mostró un fenotipo aberrante durante la simbiosis, con una disminución en el número de nódulos y la ausencia de diferenciación a bacteroides (Jamet y col., 2007), lo que indicaría la necesidad de un equilibrio en el balance redox para el proceso de diferenciación bacteriana. En nódulos determinados, como los de maní, no hay evidencias de que los péptidos NCR estén implicados en la diferenciación bacteriana a bacteroides. Sin embargo, y dado que en esta tesis se demostró que la disminución de los niveles de  $H_2O_2$  incrementó la densidad de bacteroides, es posible proponer que un equilibrio en el balance redox es también requerido para el normal desarrollo de nódulos en maní.

Se ha informado que un incremento en la densidad de bacteroides se asocia con una disminución de la eficiencia de la FBN (Sen y Weaver, 1984). Ello explicaría el menor peso seco aéreo determinado en las plantas inoculadas y tratadas con KI. Una de las posibles causas por las que el proceso de fijación esté disminuido cuando el número de bacteroides está elevado es que, bajo estas condiciones, aumenta la tasa respiratoria en el interior del nódulo y como consecuencia se produce un incremento en la generación de EROs las cuales inhiben la actividad de la enzima nitrogenasa. Teniendo esto en consideración, fue de interés medir la concentración de  $H_2O_2$  en el tejido nodular de plantas inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI. Los resultados indican que no existen diferencias significativas entre los niveles de  $H_2O_2$  de los nódulos provenientes de plantas tratadas y controles (Tabla 23). Se infiere por lo tanto que la disminución en el peso seco en plantas inoculadas y tratadas con KI es consecuencia de la reducción en el número y porcentaje de nódulos eficientes, producto de la inhibición del estallido oxidativo (Tabla 21). La ausencia de cambios en la concentración de dicha ERO, en nódulos provenientes de plantas tratadas con KI, aún cuando el número de bacteroides en dichos nódulos es elevado, podría ser consecuencia de la acción del sistema antioxidante de la planta y/o de la bacteria.



Tabla 23. Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nódulos de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en presencia o ausencia de KI (0,5 ó 1,5 mM).

Tratamiento	nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> tejido fresco
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	57,82 ± 3,17
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 0,5 mM	50,18 ± 2,47
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + KI 1,5 mM	49,37 ± 3,44

Los datos representan la media ± E.E (n = 12).

El rol del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante la interacción *Medicago* sp.-rizobios fue analizado por Jamet y col. (2003) disminuyendo los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los HI mediante el uso de una mutante de *S. meliloti* que sobreexpresa el gen *katB*. Puesto que la reducción en la concentración de dicha ERO resultó en la formación de HI aberrantes, estos autores concluyeron que la producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es crucial para el establecimiento de esta simbiosis. La supresión o reducción en la generación de EROs mediante el uso del inhibidor de la enzima NADPH oxidasa DPI o por la adición de enzimas antioxidantes, también le permitió a otros investigadores proponer que se requiere del estallido oxidativo durante las etapas tempranas de la interacción simbiótica en *M. truncatula* y en *S. rostrata*, para su correcto desarrollo (D’Haeze y col., 2003; Peleg-Grossman y col., 2007).

Recientemente Android y col. (2012) identificaron alrededor de trescientos genes potencialmente regulados por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante el establecimiento de la interacción *M. truncatula*-*S.meliloti*. La expresión del gen *MtSpk1*, que codifica para una quinasa putativa implicada en las etapas tempranas de la simbiosis, es inducida tanto por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como por los FN. Por otra parte, Oger y col. (2012) informaron que más de un centenar de proteínas sulfeniladas (modificadas por la reducción de los residuos *cys* por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) están involucradas en el correcto desarrollo y posterior funcionamiento de los nódulos en *M. truncatula*, y propusieron que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> participa en la regulación a nivel transcripcional y pos-traduccional de proteínas involucradas en dicha interacción simbiótica.



Los resultados presentados en este capítulo demuestran claramente que la supresión del incremento de  $H_2O_2$  que se produce en plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. afecta negativamente el desarrollo de nódulos con la consecuente disminución en la producción de biomasa. Ello permite sugerir que, al igual que en la interacción *Medicago*-rizobios, el incremento en los niveles de  $H_2O_2$  en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 constituye un requisito para el adecuado desarrollo de dicha simbiosis. Dado que las EROs cumplen un rol crucial en la señalización en leguminosas que son infectadas de manera intracelular, se propone que dichas moléculas también participan en la cascada de señalización que culmina con la nodulación en maní.



*Capítulo VII. Resultados y Discusión*  
*Objetivo 4*

### Evaluación del rol del sistema antioxidante bacteriano en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.

Como consecuencia del estallido oxidativo que se produce en la interacción de las leguminosas *Medicago* sp. y *P. vulgaris* con los rizobios específicos, el sistema antioxidante bacteriano es activado, contribuyendo de este modo al éxito del establecimiento de la simbiosis con su planta hospedadora (Puppo y col., 2013).

Con el fin de evaluar si el sistema antioxidante bacteriano cumple un rol importante durante la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., se inhibió la actividad de enzimas peroxidasas de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 mediante la adición de Ácido Salicilhidroxámico (SHAM) al medio de cultivo bacteriano y se analizó posteriormente su fenotipo simbiótico. El SHAM es un potente inhibidor específico e irreversible de enzimas con actividad peroxidasa (Kawano y Muto, 2000; Houshmandfar y col., 2011; Gao y col., 2013).

- *Evaluación de la inhibición de la actividad de enzimas peroxidasas de Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 con el agregado de SHAM.

Con el objetivo de determinar la concentración de SHAM a ser utilizada en los ensayos propuestos, se evaluó el efecto del agregado al medio de cultivo de 0,2, 0,5, 1 o 2 mM de dicho compuesto sobre el crecimiento y la viabilidad de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Los resultados obtenidos indicaron que la adición de SHAM 0,2 mM no afectó ninguno de los parámetros analizados, mientras que las concentraciones 1 y 2 mM redujeron significativamente el crecimiento (Figura 29) y la viabilidad (Tabla 24) de manera dosis dependiente. Si bien la DO de los cultivos se vio disminuida en presencia de SHAM 0,5 mM, el número de células viables no se modificó (Tabla 23), lo que podría atribuirse a una menor producción de exopolisacáridos en dichas condiciones de cultivo.



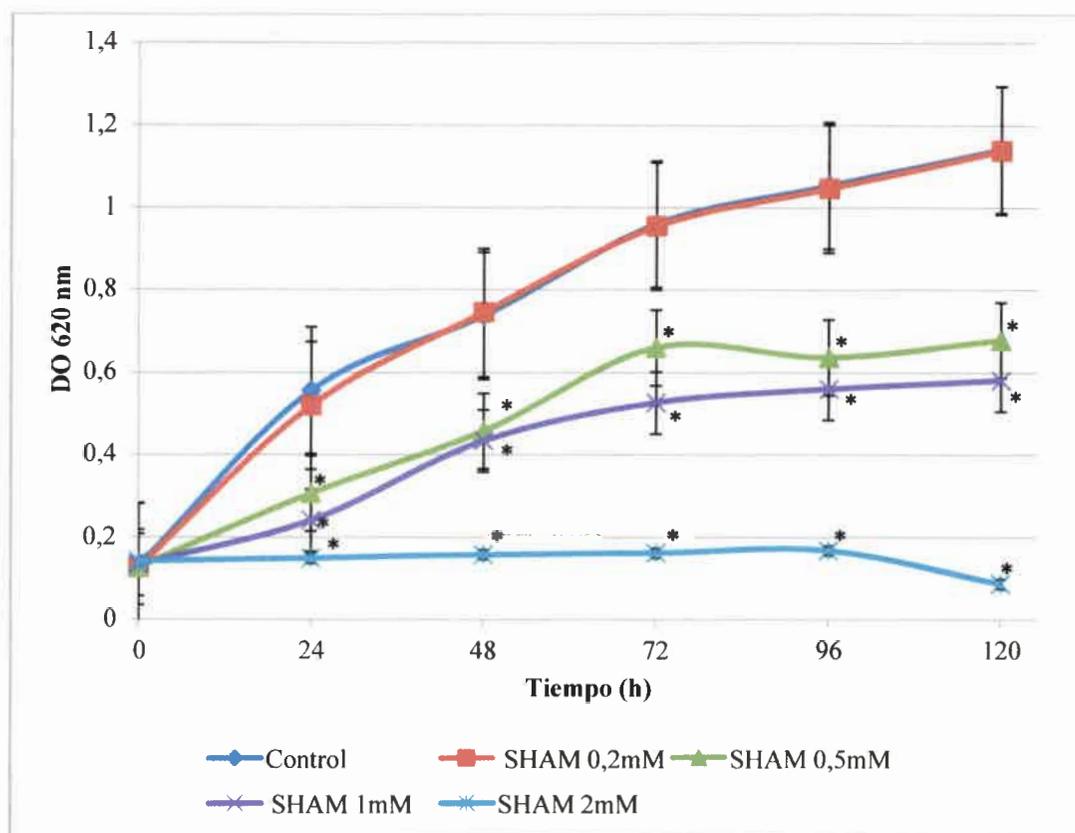


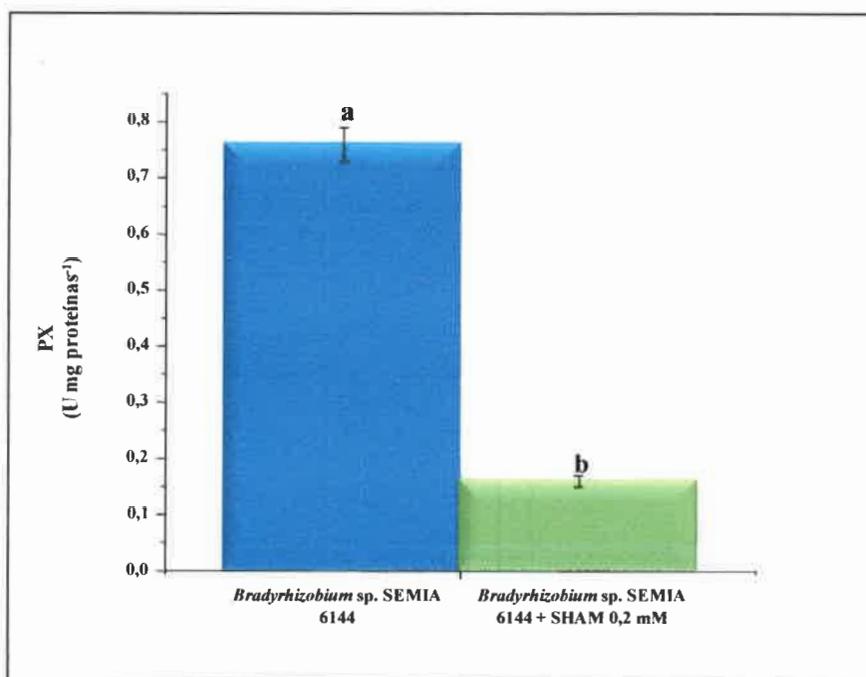
Figura 29. Crecimiento de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 en medio YEM suplementado con 0,2, 0,5, 1 o 2 mM de SHAM. Los datos representan la media  $\pm$  E.E (n = 7 - 9). \*: p < 0,05

Tabla 24. Viabilidad de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 cultivada en medio YEM con diferentes concentraciones de Ácido Salicilhidroxámico (SHAM) a las 120 h de crecimiento.

	Concentración de Ácido Salicilhidroxámico (SHAM)				
	0 mM	0,2 mM	0,5 mM	1 mM	2 mM
<b>Log UFC ml<sup>-1</sup></b>	9,70 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	9,64 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	9,68 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	8,33 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>	6,38 $\pm$ 0,02 <sup>c</sup>

Los datos representan la media  $\pm$  E.E (n = 9). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p  $\leq$  0. 05).

A partir de estos resultados se decidió utilizar la concentración 0,2 mM de SHAM, ya que no afecta el crecimiento ni la viabilidad de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Como era de esperar, la actividad PX de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 incubadas en la presencia de 0,2 mM de SHAM durante 120 h se vio reducida en un 77 % (Figura 30).



**Figura 30.** Determinación de la actividad PX de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM. Los datos representan la media  $\pm$  E.E (n = 10). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

- *Evaluación de la importancia del sistema antioxidante de Bradyrhizobium sp. SEMIA 6144 para el establecimiento de la interacción simbiótica.*

En raíces de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 se comprobó la producción de un estallido oxidativo, el que podría afectar la viabilidad del microsimbionte, y por consiguiente, el desarrollo de la simbiosis. Por lo tanto, es posible que el éxito de dicha interacción se vincule con la participación del sistema antioxidante bacteriano en la atenuación de dicho estallido. Para corroborar esta hipótesis se evaluó, en primer lugar si la disminución de la actividad PX de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 por la adición al medio de cultivo de SHAM 0,2 mM afecta la generación del estallido oxidativo en raíces de maní inoculadas, determinando los niveles de  $H_2O_2$  en dicho órgano.

En estas condiciones, la producción de  $H_2O_2$  se incrementó en todos los tiempos analizados (Tabla 25). Estos resultados sugieren que el sistema antioxidante de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 participa en la modulación de la respuesta de defensa de la planta hospedadora.

Tabla 25. Producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en raíces de maní a los 5, 10 y 15 min pos-inoculación con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM.

Tratamiento	Concentración de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (nmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> g <sup>-1</sup> tejido fresco)		
	5 min pi	10 min pi	15 min pi
Plantas sin inocular	15,43 ± 2,21 <sup>a</sup>	14,41 ± 1,51 <sup>a</sup>	15,10 ± 1,12 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	14,89 ± 2,05 <sup>a</sup>	37,68 ± 1,39 <sup>b</sup>	15,12 ± 0,71 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + SHAM 0,2 mM	33,71 ± 3,80 <sup>b</sup>	51,27 ± 2,78 <sup>c</sup>	31,61 ± 2,63 <sup>b</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 7 - 10). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey (p ≤ 0.05). pi: pos-inoculación.

A los efectos de determinar la importancia del sistema antioxidante bacteriano en el establecimiento de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., se evaluó el fenotipo simbiótico de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 cuando crece en presencia de SHAM. La producción de biomasa de dichas plantas fue significativamente mayor al de plantas sin inocular, pero significativamente menor que la de plantas inoculadas con la bacteria cultivada en condiciones controles. Por otra parte, el número total de nódulos formados así como la cantidad de nódulos eficientes fue significativamente menor al observado en plantas inoculadas con cultivos controles de *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144. Este efecto se correlaciona con la menor producción de biomasa (Tabla 26).

Tabla 26. Peso seco aéreo, número de nódulos y porcentaje de nódulos rojos de plantas de maní inoculadas con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 creciendo en presencia o ausencia de SHAM 0,2 mM.

Tratamiento	Peso seco aéreo (g planta <sup>-1</sup> )	Nº de Nódulos planta <sup>-1</sup>	% Nódulos Rojos
Plantas sin inocular	0,62 ± 0,03 <sup>a</sup>	-	-
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	1,01 ± 0,01 <sup>b</sup>	96 ± 4a	100 ± 0 <sup>a</sup>
Plantas inoculadas con <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 + SHAM 0,2 mM	0,74 ± 0,02 <sup>c</sup>	38 ± 3 <sup>b</sup>	76 ± 1,40 <sup>b</sup>

Los datos representan la media ± E.E. (n = 22 - 30). Letras diferentes indican diferencias significativas según el test de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Es conocido que el sistema antioxidante de *S. meliloti*, *R. etli*, *R. tropici*, *B. japonicum* y *M. loti* cumple un rol importante durante el establecimiento de la simbiosis fijadora de nitrógeno con sus respectivas leguminosas hospedadoras (Santos y col., 2000; Riccillo y col., 2000; Jamet y col., 2003; Del Carmen Vargas y col., 2003; Harrison y col., 2005; Panek y col., 2005; Dombrecht y col., 2005; Muglia y col., 2008; Saeki y col., 2011). En *S. meliloti* y *M. loti* la disrupción del gen *sodA* y de los genes *katA/katC* y *katE*, que codifican para las enzimas superóxido dismutasa y catalasa respectivamente, condujo a un fenotipo simbiótico alterado, con la formación de HI aberrantes, retraso en la nodulación, reducción de la actividad nitrogenasa e inhibición de la diferenciación a bacteroides (Santos y col., 2000; Jamet y col., 2003; Hanyu y col., 2009; Saeki y col., 2011). Por otra parte, la mutación en el gen *katG* de *M. loti* inhibió la formación de nódulos en su leguminosa huésped, mientras que el desarrollo de dichas estructuras no se vio afectada en mutantes de *R. etli* y *B. japonicum* (Panek y col., 2004; Dombrecht y col., 2005). Sin embargo, una doble mutante de *R. etli* peroxidasa/catalasa<sup>-</sup> mostró una reducción del 40% en la capacidad de fijación de nitrógeno (Dombrecht y col., 2005).

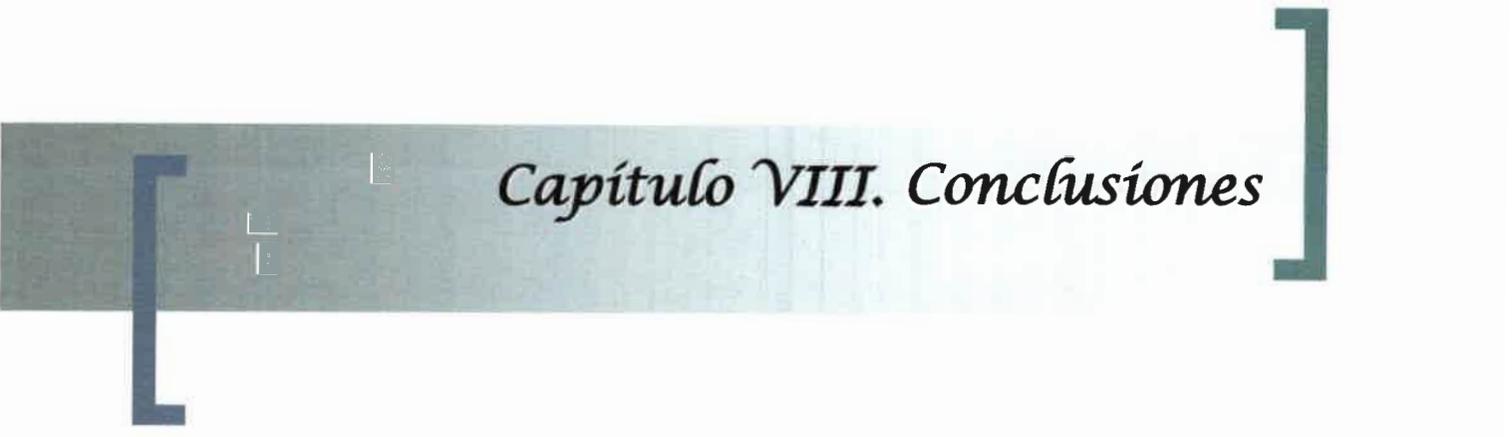
Dado que la expresión de estos genes durante la infección fue asociada a una respuesta de las bacterias al O<sub>2</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> producidos por la planta hospedadora (Ampe y col., 2003; Puppo y col., 2013), y que su represión influye negativamente sobre la interacción fijadora de nitrógeno, se adjudicó un rol esencial al sistema antioxidante bacteriano en el



correcto establecimiento y desarrollo de la simbiosis que se establece entre rizobios y leguminosas infectadas de manera intracelular.

A partir de los resultados presentados en este capítulo se puede inferir que, al igual que para los microsimbiontes de leguminosas infectadas de manera intracelular, la participación del sistema antioxidante de bradirizobios simbioses de maní, es importante para el establecimiento de una interacción simbiótica efectiva.



A horizontal bar with a light blue-to-teal gradient background. It is framed by large, stylized brackets: a dark blue bracket on the left and a dark teal bracket on the right. The text is centered within the bar.

*Capítulo VIII. Conclusiones*

Los rizobios, bacterias Gram negativas del suelo, son capaces de establecer una interacción simbiótica con plantas leguminosas, y excepcionalmente con la no leguminosa *Parasponia*. Dicha interacción conduce a la formación de un nuevo órgano, el nódulo, estructura en la cual se lleva a cabo el proceso de fijación de nitrógeno. El establecimiento de la simbiosis implica un complejo diálogo molecular entre la planta hospedadora y el microsimbionte. Las plantas liberan a la rizósfera flavonoides que son reconocidos por los rizobios, lo que resulta en la activación de la expresión de los genes *nod*, que codifican para proteínas involucradas en síntesis de los FN. La percepción de los FN por la planta huésped desencadena dos programas morfogénicos que se desarrollan en paralelo. La activación de una cascada de señalización induce, por un lado, la división de las células de la corteza radical con la consecuente formación del nódulo, y en simultáneo se activan eventos vinculados al proceso de infección y al establecimiento de la interacción fijadora de nitrógeno. En leguminosas invadidas por HI, las EROs tienen un rol crítico en dicha cascada de señalización. En estas plantas, se activa una respuesta bifásica a la inoculación, representada por incrementos en los niveles de  $O_2^-$  y  $H_2O_2$ , estando el incremento más tardío asociado al desarrollo de los HI. Este aumento en los niveles de EROs es dependiente, en gran parte, de la actividad de la enzima NADPH oxidasa. Además, los FN modulan esta respuesta de la planta mediante la activación de su sistema antioxidante, contribuyendo así al desarrollo de la simbiosis.

A pesar de que el rol de las EROs ha sido ampliamente estudiado en leguminosas infectadas de manera intracelular, hasta el momento no hay información disponible en leguminosas en las que el proceso de infección ocurre intercelularmente, como es el caso de maní. El objetivo principal de esta tesis fue elucidar, en la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp, la existencia y el requerimiento de un estallido oxidativo, la participación de los FN en la modulación de esta respuesta de defensa, así como la importancia del sistema antioxidante de la planta y bacteriano frente a dicha respuesta.

En este trabajo de tesis demostramos por primera vez que en las etapas tempranas de la interacción simbiótica fijadora de nitrógeno maní-*Bradyrhizobium* sp. se produce un estallido oxidativo independiente de la actividad NADPH oxidasa, el cual es requerido para el desarrollo efectivo de dicha interacción. Además, y en concordancia con la ausencia de HI en el proceso de invasión bacteriana que ocurre en maní, se observó una respuesta monofásica de la planta frente al microsimbionte, representada por un único pico en los niveles de  $H_2O_2$



producidos. El sistema antioxidante de la planta, particularmente la actividad de las enzimas PX y CAT, es activado para contrarrestar dicho estallido oxidativo, permitiendo de esta manera el establecimiento de la simbiosis.

Por lo tanto, se concluye que:

- Existe un estallido oxidativo, representado por un incremento en los niveles de  $H_2O_2$ , en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. Dicho estallido oxidativo se produce en el lugar de emergencia de las raíces laterales, coincidiendo con la zona en la que se inicia la infección bacteriana.
- El estallido oxidativo se produce sólo cuando se establece la interacción simbiótica entre ambos organismos, ya que no se observa en raíces que son colonizadas por la bacteria en condiciones en que la interacción se encontraría inhibida.
- La ausencia de cambios en las actividades de las enzimas NADPH oxidasa y SOD en plantas inoculadas, permite sugerir que el incremento en los niveles de  $H_2O_2$  determinado en dichas plantas podría deberse a la acción de otras enzimas como amino oxidasas u oxalato oxidasas.
- La actividad de las enzimas CAT y PX de la planta se incrementa, contrarrestando de este modo el estallido oxidativo en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.
- El incremento en los niveles de  $H_2O_2$  en raíces de maní en las etapas tempranas de la interacción con *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 constituye un requisito para el normal desarrollo de nódulos radicales en esta leguminosa.

En este trabajo de tesis también se demostró que los FN de *Bradyrhizobium* sp. modulan este estallido oxidativo, incrementando la actividad de enzimas del sistema antioxidante de la planta de maní y, en el caso de las peroxidasas, aumentando incluso los niveles de expresión del gen *prx1*. Los FN participan entonces no sólo en la inducción de la cascada de señalización simbiótica, sino que además contribuyen a contrarrestar la respuesta de defensa de la planta de maní, posibilitando el establecimiento de una simbiosis efectiva.



Por lo tanto, se concluye que:

- Los FN de bradirizobios simbioses de maní modulan el estallido oxidativo que se produce en las etapas tempranas de dicha interacción, a través del incremento de la actividad CAT y PX y de la síntesis de esta última, y atenuando el sistema de generación de  $O_2^-$  (como consecuencia de la inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa). Ello resulta relevante para el establecimiento de la relación simbiótica maní-*Bradyrhizobium* sp.

Por otra parte, evidencias directas obtenidas por otros autores indican que el sistema antioxidante bacteriano también tiene un rol clave en el establecimiento de una interacción efectiva en leguminosas que son infectadas vía HI, protegiendo a la bacteria frente a la elevada producción de EROs. Teniendo en cuenta que en el proceso de infección que ocurre en maní no se forman estas estructuras, es posible suponer que los bradirizobios simbioses de dicha leguminosa están más expuestos a la respuesta de defensa de la planta mientras infectan los tejidos vegetales de manera intercelular. En este sentido, hemos demostrado en esta tesis que:

- El sistema antioxidante de bradirizobios simbioses de maní, particularmente la actividad de las enzimas peroxidasas, es importante para contrarrestar el estallido oxidativo producido durante las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.

Nuestros resultados proporcionan nuevos conocimientos sobre el mecanismo implicado en el desarrollo de la interacción simbiótica que establecen las leguminosas infectadas de manera intercelular. La comparación de esta información con la disponible para leguminosas infectadas vía HI revela que existen diferencias y semejanzas en la respuesta mediada por EROs que se activa en ambos grupos de leguminosas frente al microsimbionte:

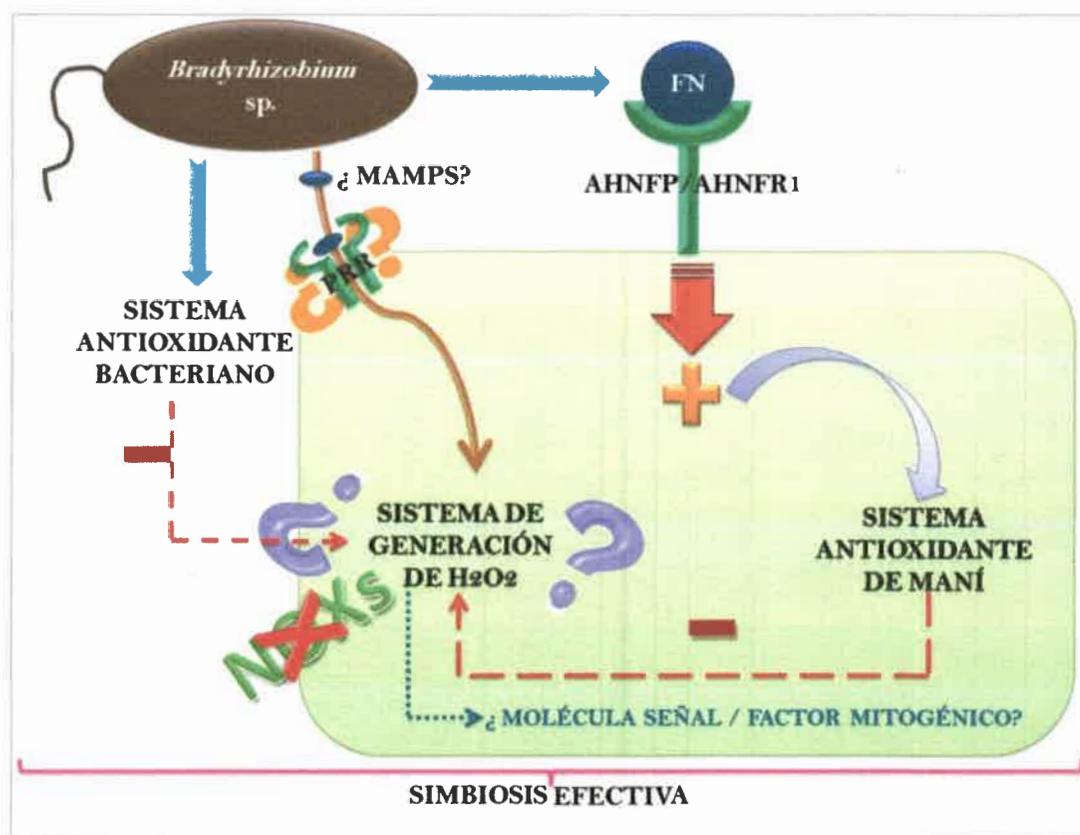
- a) Como resultado del establecimiento de la interacción simbiótica maní-*Bradyrhizobium* sp. se desencadenaría una respuesta que culmina con la activación del sistema de generación de EROs, produciéndose un estallido oxidativo. En contraste con lo que ocurre en las leguminosas infectadas de manera intracelular, en maní esta respuesta está representada sólo por un pico de incremento de  $H_2O_2$ , y es independiente de la actividad NADPH oxidasa.



- b) Al igual que en leguminosas infectadas por HI, la compatibilidad entre los simbiontes en la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp. depende fundamentalmente de la desintoxicación del  $H_2O_2$  a través de la actividad de CAT y PX de la planta, la cual es modulada por los FN.
- c) Por otra parte, y similar a lo descrito para rizobios específicos de leguminosas invadidas intracelularmente, las enzimas antioxidantes del microsimbionte de maní también actuarían contrarrestando la respuesta de defensa de la planta, contribuyendo de esta manera a la creación de condiciones favorables para el correcto desarrollo de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.
- d) Por último, y en coincidencia con lo que ocurre en leguminosas infectadas intracelularmente, el aumento en los niveles de  $H_2O_2$  constituye un requisito para el adecuado establecimiento de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.

El conjunto de resultados obtenidos en esta tesis permite plantear un modelo que explica la participación de las EROs en la interacción simbiótica maní-*Bradyrhizobium* sp. Se propone entonces que cuando se establece la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp., la planta percibiría patrones moleculares asociados al microorganismo (MAMPs) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PPR) produciéndose un estallido oxidativo como resultado de la activación del sistema de generación de  $H_2O_2$ , sin participación de la enzima NADPH oxidasa. Es probable que, al igual que en leguminosas en las que se desarrollan HI, dicha ERO también participe en la regulación a nivel transcripcional o pos-traducciona de proteínas involucradas en el desarrollo de la interacción simbiótica en estudio ó bien actúe como factor mitogénico en la activación de la división de células corticales que culmina con la formación de nódulos. Por otra parte, los FN liberados por *Bradyrhizobium* sp. se unirían a los receptores LysM identificados recientemente en nuestro laboratorio (Ibañez y col., 2015). La percepción de dichas moléculas activaría al sistema antioxidante de la planta modulando de esta manera el incremento en los niveles de  $H_2O_2$ . Además, también se activarían las enzimas antioxidantes del microsimbionte a fin de contrarrestar la respuesta de defensa de la planta, contribuyendo de esta manera a la creación de condiciones favorables para el establecimiento de una simbiosis efectiva (Figura 31).





**Figura 31.** Modelo propuesto del rol de EROs, la participación de los FN en su producción y la importancia del sistema antioxidante de la planta y bacteriano en la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp. Referencias: MAMPS: patrones moleculares asociados al microorganismo, PRR: receptores de reconocimiento de patrones, FN: Factor Nod, AHNFP/AHNFR1: receptores LysM, NOXs: NADPH oxidasas.

- *Perspectivas futuras*

Como suele suceder, muchos de los resultados descritos a lo largo de los capítulos de esta tesis dejan abiertas preguntas que requieren de futuros estudios para ser resueltas, entre las cuales podemos mencionar:

- ¿Cuál es el rol que cumple el  $H_2O_2$  producido en las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.? ¿Actúa como molécula señal induciendo la expresión de nodulinas tempranas o interviene como factor mitogénico activando la división celular de las células de la corteza radical?
- ¿Es requerida la actividad de la enzima NADPH oxidasa en etapas más avanzadas de la simbiosis en estudio?
- ¿Cuál/les es/son la/s enzima/s responsable/s de la generación del  $H_2O_2$  durante las etapas tempranas de la interacción maní-*Bradyrhizobium* sp.?

- En ausencia de la señal inducida por los FN ¿se asocia la respuesta de la planta con la vía de señalización frente a patógenos?
- ¿El ON juega un papel en el establecimiento de la simbiosis maní-*Bradyrhizobium* sp.?



*Capítulo IX. Bibliografía*

- **Aebi, H.** (1984). Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105: 121-126.
- **Aguilar, J., Ashby, A., Richards, A., Loake, G., Watson, M., Shaw C.** (1988). Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli* towards Flavonoid Inducers of the Symbiotic Nodulation Genes. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2741-2746.
- **Alazard, D.** (1985). Stem and root nodulation in *Aeschynomene* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 732-734.
- **Alazard, D., Duhoux, E.** (1990). Development of stem nodule in a tropical forage legume, *Aschynomene afraspera*. *J. Exp. Bot.* 41: 1199-1206.
- **Alexieva, V., Sergiev, I., Mapelli, S., Karanov, E.** (2001). The effect of drought and ultraviolet radiation on growth and stress markers in pea and wheat. *Plant Cell Environ.* 24: 1337-1344.
- **Allan, D., Graham. P.** (2002). Symbiotic Nitrogen Fixation, other N<sub>2</sub>-fixing symbiosis. *Soil 5611: Soil Biology and Fertility: Dep. of Soil, Water, and Climate. University of Minnesota.* Disponible en: <http://www.soils.agri.umn.edu/academics/classes/soil3612/SymbioticNitrogenFixation/Other.html>.
- **Allen, O., Allen, E.** (1940). False nodulation on certain leguminous species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 35: 15-16.
- **Allen, O., Allen, E.** (1981). *The Leguminosae: A source Book of Characteristics, uses and nodulation.* The University of Wisconsin Press, Madison, USA. 800 pages.
- **Ampe, F., Kiss, E., Sabourdy, F., Batut, J.** (2003). Transcriptome analysis of *Sinorhizobium meliloti* during symbiosis. *Genome Biol.* 4: R15
- **Andrio, E., Marino, D., Marmeys, A., de Segonzac, M., Damiani, I., Genre, A., Huguet, S., Frendo, P., Puppo, A., Pauly, N.** (2013). Hydrogen peroxide-regulated genes in the *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *New Phytol.* 198: 179-189.
- **Angelini, J., Castro, S., Fabra, A.** (2003). Alteration in root colonization and nodC gene induction in the peanut rhizobia interaction under acidic conditions. *Plant Physiol Biochem* 41: 289-294.
- **Apel, K., Hirt, H.** (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 55: 373-399.
- **Asai, S., Yoshioka, H.** (2008). The role of radical burst via MAPK signaling in plant immunity. *Plant Signal Behav.* 3: 920-922.



- **Baca, B., Soto Urzúa, L., Pardo Ruiz, M.** (2000). Fijación Biológica de Nitrógeno. Elem. 38: 43-49.
- **Bais, H., Walker, T., Schweizer, H., Vivanco, J.** (2002). Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Plant Physiol. Biochem. 40: 983-995.
- **Bais, H., Weir, T., Perry, L., Gilroy, S., Vivanco, J.** (2006) The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. Annu. Rev. Plant Biol. 57: 233-266.
- **Bal, A., Hameed, S., Jayaram, S.** (1989). Ultrastructural characteristics of the host symbiont interface in nitrogen-fixing peanut nodules. Protoplasma 150: 19-26.
- **Beauchamp, C., Fridovich, I.** (1973). Isoenzymes of SOD from wheat germ. Biochem. Biophys. Acta. 317: 50-54.
- **Becana, M., Dalton, D., Moran, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Matamoros, M., Rubio, M.** (2000). Reactive oxygen species and antioxidants in legume nodules. Physiol. Plant. 109: 372-381.
- **Bellin, D., Asai, S., Delledonne, M., Yoshioka, H.** (2013). Nitric oxide as a mediator for defense responses. Mol. Plant Microbe. Interact. 26: 271-277.
- **Benyamina, S., Baldacci-Cresp, F., Couturier, J., Chibani, K., Hopkins, J., Bekki, A., de Lajudie, P., Rouhier, N., Jacquot, J., Alloing, G., Puppo, A., Frendo, P.** (2013). Two *Sinorhizobium meliloti* glutaredoxins regulate iron metabolism and symbiotic bacteroid differentiation. Environ. Microbiol. 15: 795-810.
- **Bertin, C, Yang X., Weston, L.** (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. Plant Soil. 256: 67-83.
- **Bianucci, E., Fabra, A., Castro, S.** (2008). Growth Of *Bradyrhizobium* sp. Semia 6144 In Response To Methylglyoxal: Role Of Glutathione. Curr. Microbiol. 56: 371-376.
- **Bogino, P., Banchio, E., Rinaudi, L., Cerioni, G., Bonfiglio, C., Giordano, W.** (2005). Peanut (*Arachis hypogaea*) response to inoculation with Bradyrhizobium sp in soils of Argentina. Ann. Appl. Biol. 148: 207-212.
- **Bolsa de cereales de Córdoba.** (2014). Sistema de Información Agroeconómica. Informe ESPECIAL Maní. Disponible en: <http://www.bccba.com.ar>.
- **Bolwell, G., Wojtaszek, P.** (1997). Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defense broad perspective. Physiol. Mol. Plant. Pathol. 51: 347-366.



- **Bonadeo, E., Moreno, I.** (2006). In: Peanut crop in Córdoba: Mineral nutrition. Eds. E.M. Fernandez, O. Giayetto, Ed. Universidad Nacional de Río Cuarto. pp: 113-123.
- **Booger, F., van Rossum, D.** (1997). Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. FEMS Microbiol. Rev. 21: 5-27.
- **Borisov, A., Madsen, L., Tsyganov, V., Umehara, Y., Voroshilova, V., Batagov, A., Sandal, N., Mortensen, A., Schauser, L., Ellis, N., Tikhonovich, I., Stougaard, J.** (2003). The sym35 gene required for root nodule development in pea is an ortholog of NIN from *Lotus japonicus*. Plant Physiol. 131: 1009-1017.
- **Bowen, G., Rovira, A.** (1999). The rhizosphere and its management to improve plant growth. Adv. Agron. 66: 1-102.
- **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.
- **Bricchi, E., Bonadeo, E., Cisneros, J., Marcos, J., Reboyras, V., Hulsken, W.** (1996). Efecto de las labranzas sobre el perfil cultural y la distribución de raíces de maní en un Haplustol típico de Córdoba. XV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (AACCS). Santa Rosa, La Pampa. pp. 197 y 198.
- **Broughton, W., Jabbouri, S., Perret, X.** (2000). Keys to symbiotic harmony. J. Bacteriol. 182: 5641-5652.
- **Bueno, P., Soto M., Rodriguez-Rosales, M., Sanjuan, J., Olivares, J., Donaire J.** (2001). Time-course of lipoxygenase, antioxidant enzyme activities and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation during early stages of *Rhizobium* legume symbiosis. New Phytol. 152: 91-96.
- **Buer C., Imin N., Djordjevic, M.** (2010). Flavonoids: new roles for old molecules. J. Integr. Plant Biol 52: 98-111.
- **Caetano-Anollés, G., Wrobel-Boerner, E., Bauer, W.** (1992). Growth and movement of spot inoculated *Rhizobium meliloti* on the root surface of alfalfa. Plant Physiol. 98: 1181-1189.
- **Cámara Argentina del Maní.** (2014) Disponible en: <http://www.camaradelmani.com.ar/>.
- **Capoen, W., Oldroyd, G., Goormachtig, S., Holsters, M.** (2010). *Sesbania rostrata*: a case study of natural variation in legume nodulation. New Phytol. 186: 340-345.



- **Cárdenas, L., Martínez, A., Sánchez, F., Quinto, C.** (2008). Fast, transient and specific intracellular ROS changes in living root hair cells responding to Nod factors (NFs). *Plant J.* 56: 802-813.
- **Carlier, E., Castro, S., Fabra, A.** (2013). Production of reactive oxygen species in peanut nodules. *Commun. Plant Sci.* 3: 11-14.
- **Carlson, R., Price, N., Stacey, G.** (1995). The biosynthesis of rhizobial lipooligosaccharide nodulation signal molecules. *Mol Plant-Microbe Interact.* 7: 684-695.
- **Carol, R., Dolan, L.** (2006). The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *J. Exp. Bot.* 9: 1-6.
- **Castro, S., Cerioni, G., Giayetto, O., Fabra, A.** (2006). Contribución relativa del nitrógeno del suelo y del fijado biológicamente a la economía de la nutrición nitrogenada de maní (*Arachis hypogaea* L) en diferentes condiciones de fertilidad. *Agriscientia.* 23: 55-66.
- **Chandler, M.** (1978). Some observations on infection of *Arachis hypogaea* L. by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* 29: 749-755.
- **Chandler, M., Date, R., Roughley, R.** (1982). Infection and root-nodule development in *Stylosanthes* species by *Rhizobium*. *J. Exp. Bot.* 33: 47-57.
- **Chang, C., Damiani, I., Puppo, A., Frendo, P.** (2009). Redox changes during the legume-rhizobium symbiosis. *Mol. Plant* 2: 370-377.
- **Chen, W., de Faria, S., Stralioetto, R., Pitard, R., Simões-Araújo, J., Chou, J., Chou, Y., Barrios, E., Prescott, A., Elliott, G.** (2005). Proof that *Burkholderia* strains form effective symbioses with legumes: a study of novel *Mimosa*-nodulating strains from South America. *App. Environ. Microbiol.* 71: 7461-7471.
- **Chen, W., Laevens, S., Lee, T., Coenye, T., de Vos, P., Mergeay, M., Vandamme, P.** (2001). *Ralstonia taiwanensis* sp. nov., isolated from root nodules of *Mimosa* species y sputum of cystic fibrosis patient. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1729-1735.
- **Chen, W., Moulin, L., Bontemps, C., Vandamme, P., Bena, G., Boivin-Masson, C.** (2003). Legume symbiotic nitrogen fixation by beta-proteobacteria is widespread in nature. *J. Bacteriol.* 185: 7266-7272.
- **Cholaky, L., Giayetto, O., Neuman, E., Cavaignac, S.** (1983). Respuesta del maní (*Arachis hypogaea* L.) a la inoculación del suelo con *Rhizobium* spp. *Revista de la UNRC.* 3: 173-179.



- **Cisneros, J., Cholaky, C., Bricchi, E., Cantero, J., Giayetto, O.** (1996). Evaluación del efecto del uso agrícola sobre las propiedades físicas de un Haplustol típico del centro de Córdoba. XV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (AACCS). Santa Rosa, La Pampa. pp. 23-24.
- **Cisneros, J., Cholaky, C., Giayetto, O., Bricchi, E., Marcos, J., Cerioni, G.** (1998). Influencia de diferentes sistemas de laboreo sobre la resistencia mecánica de suelos del área manisera. XVI Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (AACCS). Villa Carlos Paz, Córdoba. pp. 253-254.
- **Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., VandenBosch, K.** (1995). Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. *Plant Cell*. 7: 43-55.
- **Crespi, M., Gálvez, S.** (2000). Molecular mechanisms in root nodule development. *J. Plant Growth Regul.* 19: 155-166.
- **Crockford, A., Georgina, A., Williams, H.** (1995). Evidence for cell-density-dependent regulation of catalase activity in *Rhizobium leguminosarum* bv. *phaseoli*. *Microbiology*. 141: 843-851.
- **D'Haese, W., De Rycke, R., Mathis, R., Goormachtig, S., Pagnotta, S., Verplancke, C., Capoen, W., Holsters, M.** (2003). Reactive oxygen species and ethylene play a positive role in lateral root base nodulation of a semiaquatic legume. *PNAS* 100: 11789-11794.
- **Davies, B., Walker, G.** (2007). Identification of novel *Sinorhizobium meliloti* mutants compromised for oxidative stress protection and symbiosis. *J. Bacteriol.* 189: 2110-2113.
- **De Faría, S., Hay, G., Sprent, J.** (1988). Entry of Rhizobia into Roots of *Mimosa scabrella* Bentham Occurs between Epidermal Cells. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2291-2296.
- **De Pinto, M., De Gara, L.** (2004). "Changes in the ascorbate metabolism of apoplastic and symplastic spaces are associated with cell differentiation". *J. Exp. Bot.* 55: 2559-2569.
- **del Carmen Vargas, M., Encarnación, S., Dávalos, A., Reyes-Pérez, A., Mora, Y. M., Garcia-de los Santos, A., Brom, S., Mora, J.** (2003). Only one catalase, *katG*, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology*. 149: 1165-1176.
- **Delamuta, J., Ribeiro, R., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I., Martínez-Romero, E., Hungria, M.** (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of



- Bradyrhizobium japonicum* group I strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. Int J. Syst. Evol. Microbiol. 63: 3342-3351.
- **Den Herder, J., Lievens, S., Rombauts, S., Holsters, M., Goormachtig, S.** (2007). A symbiotic plant peroxidase involved in bacterial invasion of the tropical legume *Sesbania rostrata*. Plant Physiol. 144: 717-727.
  - **Denarie, J., Debelle, J., Prome, D.** (1996). *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. Annu. Rev. Biochem. 65: 503-535.
  - **Di Rienzo, J., Casanoves F., Balzarini M., Gonzalez L., Tablada M., Robledo C.** InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
  - **Díaz-Zorita, M, R Baliña.** (2004). Respuesta de cultivos de maní a la inoculación con *Bradyrhizobium* sp. Ciencia del Suelo. 22: 7-10.
  - **Dombrecht, B., Heusdens, C., Beullens, S., Verreth, C., Mulkers, E., Proost, P., Vanderleyden, J., Michiels, J.** (2005). Defence of *Rhizobium etli* bacteroids against oxidative stress involves a complexly regulated atypical 2-Cys peroxiredoxin. Mol. Microbiol. 55: 1207-1221.
  - **dos Reis, F., Simon, M., Gross, E., Boddey, R., Elliott, G., Neto, N., Loureiro, M., de Queiroz, L., Scotti, M., Chen, W., Norén, A., Rubio, M., de Faria, S., Bontemps, C., Goi S., Young, J., Sprent, J., James, E.** (2010). Nodulation and nitrogen fixation by *Mimosa* spp. in the Cerrado and Caatinga biomes of Brazil. New Phytol. 186: 934-946.
  - **Downie, J.** (2014). Legume nodulation. Curr. Biol. 24: 184-190.
  - **Downie, J.** (1998). Functions of Rhizobial Nodulation genes. En Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J. (Eds). The Rhizobiaceae, Kluwer Academic Publishers. pp. 387-399.
  - **Doyle, J.** (2011). Phylogenetic perspectives on the origins of nodulation. Mol. Plant Microbe Interact. 24: 1289-1295.
  - **Dreyfus, B., Alazard, D., Dommergues, Y.** (1984). Stem-nodulating rhizobia. In: Current Perspectives in Microbial Ecology (Klug, M. y Reddy, C., Eds.) Am. Soc. Microbiol. U.S.A. pp 161-169.
  - **Dreyfus, B., García, J., Gillis, M.** (1988). Characterization of *Azorhizobium caulinodans* gen. nov. sp. nov., a stem-nodulating nitrogen-fixing bacterium isolated from *Sesbania rostrata*. Int. J. Syst. Bacteriol. 38: 89-98.



- **Duhoux, E.** (1984). Ontogénesis des nodules culminaires du *Sesbania rostrata* (légumineuses). Can. J. Bot. 62: 982-994.
- **Eaton C., Cox M., Scott B.** (2011). What triggers grass endophytes to switch from mutualism to pathogenesis? Plant Sci. 180: 190-195.
- **El-Akhal, M., Rincón, A., Arenal, F., Lucas, M., El Mourabit, N., Barrijal, S., Pueyo, J.** (2008). Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco. Soil Biol. Biochem. 40: 2911-2914.
- **Endre, G., Kereszt, A., Kevei, Z., Mihacea, S., Kalo, P., Kiss, G.** (2002). A receptor kinase gene regulating symbiotic nodule development. Nature. 417: 962-966.
- **Fabra, A., Castro, S., Taurian, T., Angelini, J., Ibañez, F., Dardanelli, M., Tonelli, M., Bianucci, E., Valetti L.** (2010). Interaction among *Arachis hypogaea* L. (peanut) and beneficial soil microorganisms: how much is it known? Crit. Rev. Microbio. 36: 179-194.
- **Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Dugald, E., Gresshoff, P.** (2010). Molecular Analysis of Legume Nodule Development and Autoregulation. J. Integ. Plant Biol. 52: 61-76.
- **Fernández, E., Giayetto, O.** (2006). El Cultivo de maní en Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- **Fleishman, M., Kramer, D.** (1998). Photosynthetic rhizobia. Biochim. Biophys. Acta 1364: 17-36.
- **Folch-Mallol, J., Manyani, H., Marroquí, S., Sousa, C., Vargas, C., Nava, N., Colmenero-Flores, J., Quinto, C., Megías, M.** (1998). Sulfation of nod factors via *nodHPQ* is *nodD* independent in *Rhizobium tropici* CIAT899. Mol. Plant Microbe Interact. 11: 979-987.
- **Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J., Mylona, P., Miedema, H., Torres, M., Linstead, P., Costa, S., Brownlee, C., Jones, J., Davies, J., Dolan, L.** (2003). Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. Nature 422: 442-446.
- **Foyer, C., Noctor, G.** (2013). Redox signaling in plants. Antioxid. Redox Signal. 18: 2087-2090.
- **Frahry, G., Schopfer, P.** (2001). NADH-stimulated, cyanide-resistant superoxide production in maize coleoptiles analysed with a tetrazolium-based assay. Planta. 212: 175-183.



- **Frendo, P., Baldacci-Cresp, F., Benyamina, S., Puppo, A.** (2013). Glutathione and plant response to the biotic environment. *Free Radic. Biol. Med.* 65: 724-730.
- **Frendo, P., Harrison, J., Norman, C., Hernández Jiménez, M., Van de Sype, G., Gilabert, A., Puppo, A.** (2005). Glutathione and homoglutathione play a critical role in the nodulation process of *Medicago truncatula*. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 18: 254-259.
- **Fundación Maní Argentino.** (2014). Outlook del Cluster Manisero Argentino. Disponible en: <http://www.fundacionmani.org.ar>.
- **Gage, D.** (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 280-300.
- **Gao J., Wang N., Wang G.** (2013). *Saccharomyces cerevisiae*-induced stomatal closure mainly mediated by salicylhydroxamic acid-sensitive peroxidases in *Vicia faba*. *Plant Physiol. Biochem.* 65: 27-31.
- **Gechev, T., Hille, J.** (2005). Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J. Cell Biol.* 168: 17-20.
- **Giayetto, O., Cerioni, G., Asnal, W., Cisneros, J.** (1998). Rotaciones y labranzas en sistemas agrícolas del centro de Córdoba. Efectos sobre la productividad de cultivos oleaginosos. III Reunión Nacional de Oleaginosas. Bahía Blanca, Buenos Aires. pp. 145-146.
- **Gibson, K., Kobayashi, H., Walker, G.** (2008). Molecular Determinants of a Symbiotic Chronic Infection. *Annu. Rev. Genet.* 42: 413-441.
- **Giraud, E., Fleischman, D.** (2004). Nitrogen-fixing symbiosis between photosynthetic bacteria and legumes. *Photosynth. Res.* 82: 115-130.
- **Glyan'ko A., Makarova L., Vasil'eva G., Mironova N.** (2003). Possible involvement of hydrogen peroxide and salicylic acid in the Legume–*Rhizobium* Symbiosis. *Biology Bulletin.* 32: 245-249.
- **Glyan'ko, A., Mitanova, N., Vasil'eva, G.** (2008). Effect of nitric oxide and other nitrogen compounds on the adhesion and penetration of nodule bacteria into root tissues and on growth of etiolated pea seedlings. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 44: 438-441.
- **Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., Frugier, F.** (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell.* 18: 2680-2693.



- **Gonzalez-Sama, A., Lucas, M., de Felipe M., Pueyo J.** (2004). "An unusual infection mechanism and nodule morphogenesis in white lupin (*Lupinus albus*).” *New Phytol* 163: 371-380.
- **Goormachtig, S., Capoen, W., James, E., Holsters, M.** (2004). Switch from intracellular to intercellular invasion during water stress-tolerant legume nodulation. *PNAS*. 101: 6303-6308.
- **Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kündig, C., Beck, C., Marty, R., Hennecke, H.** (2001). Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-Kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *J. Bacteriol.* 183: 1405-1412.
- **Gourion, B., Berrabah, F., Ratet, P., Stacey, G.** (2015). Rhizobium-legume symbioses: the crucial role of plant immunity. *Trends Plant Sci.* 20: 186-194.
- **Groten, K., Dutilleul, C., van Heerden, P., Vanacker, H., Bernard, S., Finkemeier, I., Dietz, K., Foyer, C.** (2006). Redox regulation of peroxiredoxin and proteinases by ascorbate and thiols during pea root nodule senescence. *FEBS Lett.* 580: 1269-1276.
- **Gyaneshwar, P., Hirsch, A., Moulin, L., Chen, W., Elliott, G., Bontemps, C., Estrada de Los Santos, P., Gross, E., dos Reis, F., Sprent, J., Young, J., James, E.** (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range and future prospects. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 24: 1276-1288.
- **Haag, A., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Sani, M., Longhi, R., Baloban, M., Wilson, H., Mergaert, P., Zanda, M., Ferguson, G.** (2012). Role of cysteine residues and disulfide bonds in the activity of a legume root nodule-specific, cysteine-rich peptide. *J. Biol. Chem.* 287: 10791-1078.
- **Hanyu, M., Fujimoto, H., Tejima, K., Saeki, K.** (2009). Functional differences of two distinct catalases in *Mesorhizobium loti* MAFF303099 under free-living and symbiotic conditions. *J. Bacteriol.* 191: 1463-1471.
- **Harrison, J., Jamet, A., Muglia, C.I., Van de Sype, G., Aguilar, O.M., Puppo, A., Frendo, P.** (2005). Glutathione plays a fundamental role in growth and symbiotic capacity of *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187: 168-174.
- **Herouart, D., Baudouin, E., Frendo, P., Harrison, J., Santos, R., Jamet, A., Van de Sype, G., Touati, D., Puppo, A.** (2002). Reactive oxygen species, nitric oxide and glutathione: a key role in the establishment of the legume: *Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiol. Biochem.* 40: 619-624.



- **Hérouart, D., Sigaud, S., Moreau, S., Frendo, P., Touati, D., Puppo, A.** (1996). Cloning and characterization of the *kata* gene of *Rhizobium meliloti* encoding a hydrogen peroxide-inducible catalase. *J. Bacteriol.* 178: 6802-6809.
- **Hoagland, D., Arnon, D.** (1950). Water culture method for growing plants without soil. *Cal Agr Exp Sta Circ* 347.
- **Houshmandfar, A., Asli, D., Moaveni, P.** (2011). Effect of salicylhydroxamic acid on relative levels of catalase, peroxidase and ascorbic acid peroxidase in bold and small grains of wheat. *Adv. Environ. Biol.* 8: 2107-2111.
- **Hu, X., Bidney, D., Yalpani, N., Duvick, J., Crasta, O., Folkerts, O., Lu, G.** (2003). Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol.* 133: 170-181.
- **Ibañez, F.** (2009). Estudios genéticos, moleculares y fisiológicos de la interacción entre maní (*Arachis hypogaeae* L.) y bacterias asociadas a sus nódulos. Tesis Doctoral.
- **Ibañez, F., Fabra, A.** (2011). Rhizobial Nod factors are required for cortical cell division in the nodule morphogenetic programme of the Aeschynomeneae legume *Arachis*. *Plant Biol. (Stuttg).* 13: 794-800.
- **Implay, J.** (2003). Pathways of oxidative damage. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 395-418.
- **Ishida, A., Okubo, K., Ono, K.** (1987). Formation of hydrogen peroxide by NAD(P)H oxidation with isolated cell wall-associated peroxidase from cultured liverwort cells, *Marchantia polymorpha* L. *Plant Cell Physiol.* 28: 723-726.
- **Islam, M., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Seki, T.** (2008). *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 1416-1429.
- **Jamet, A., Kiss, J., Batut, A., Puppo, D., Hérouart, D.** (2005). The *kata* catalase gene is regulated by OxyR in both free-living and symbiotic *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 187: 376-381.
- **Jamet, A., Mandon, K., Puppo, A., Hérouart, D.** (2007). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Is Required for Optimal Establishment of the *Medicago sativa*/*Sinorhizobium meliloti* Symbiosis. *J. Bacteriol.* 187: 8741-8745.
- **Jamet, A., Sigaud, S., Van de Sype, G., Puppo, A., Hérouart, D.** (2003). Expression of the bacterial catalase genes during *Sinorhizobium meliloti*-*Medicago sativa* symbiosis



and their crucial role during the infection process. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 16: 217-225.

- **Jordan, D.** (1982) Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a genus of slow-growing, root nodule bacteria from leguminous plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 136-139.
- **Kape, R., Parniske, M., Brandt, S., Werner, D.** (1992). Isoliquiritigenin, a strong nod gene- and glyceollin-resistance- inducing flavonoid from soybean root exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1705-1710.
- **Karuppanapandian, T., Moon, J., Kim, C., Manoharan, K., Kim, W.** (2011). Reactive oxygen species in plants: their generation, signal transduction, and scavenging mechanisms. *Aust. J. Crop Sci.* 5: 709-725.
- **Kawano T., Muto S.** (2000). Mechanism of peroxidase actions for salicylic acid-induced generation of active oxygen species and an increase in cytosolic calcium in tobacco suspension culture. *J. Exper. Bot.* 51: 685-693.
- **Keller, T., Damude, H., Werner, D., Doerner, P., Dixon, R., Lamb, C.** (1998). A plant homolog of the neutrophil NADPH oxidase gp91<sup>phox</sup> subunit gene encodes a plasma membrane protein with Ca<sup>2+</sup> binding motifs. *Plant Cell.* 10: 255-266.
- **Kiirika L., Bergmann H., Schikowsky C., Wimmer D., Korte J., Schmitz U., Niehaus, K., Colditz, F.** (2012). Silencing of the Rac1 GTPase MtROP9 in *M. truncatula* stimulates early mycorrhizal and oomycete root colonizations but negatively affects rhizobial infection. *Plant Physiol.* 159: 501-516.
- **Kim, J., Rees, D.** (1994). Nitrogenase and biological nitrogen fixation. *Biochem.* 33: 389-397.
- **Kitagawa, W., Takami, S., Miyauchi, K., Masai, E., Kamagata, Y., Tiedje, J., Fukuda, M.** (2002). Novel 2,4-dichlorophenoxyacetic acid degradation genes from oligotrophic *Bradyrhizobium* sp. strain HW13 isolated from a pristine environment. *J. Bacteriol.* 184: 509-518.
- **Klessig, D., Durner, J., Noad, R., Navarre, D., Wendehenne, D., Kumar, D., Zhou, J., Shah, J., Zhang, S., Kachroo, P., Trifa, Y., Pontier, D., Lam, E., Silva, H.** (2000). Nitric oxide and salicylic acid signaling in plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 8849-8855.



- Klitgaard, B., Lavin, M. (2005). En Lewis, G.P., Schrire, B. D., Lock, M., Mackinder, B. (eds.). Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew. *Dalbergiaceae s.l.* pp. 307-335.
- Kováčik, J., Klejdus, B. (2014). Induction of phenolic metabolites and physiological changes in chamomile plants in relation to nitrogen nutrition. *Food Chem.* 142: 334-341.
- Kurz, W., LaRue, T. (1975). Nitrogenase activity in rhizobia in absence of plant host. *Nature.* 256: 407-408.
- Kuykendall, L., Saxena, B., Devine, T., Udell, S. (1993). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. Nov. *Can. J. Microbiol. Validation List N° 45. Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 398-399.
- Lammel, D., Cruz, L., Carrer, H., Cardoso, E. (2013). Diversity and symbiotic effectiveness of beta-rhizobia isolated from sub-tropical legumes of a Brazilian Araucaria Forest. *World J Microbiol. Biotechnol.* 29: 2335-2342.
- Law, I., Botha, W., Majaule, U., Phalane, F. (2007). Symbiotic and genomic diversity of cowpea bradyrhizobia from soils in Botswana and South Africa. *Biol. Fert. Soils.* 43: 653-663.
- Lee, M., Shin, K., Kim, Y., Suh, J., Gu, Y., Kim, M., Hur, Y., Son, O., Kim, J., Song, E., Lee, M., Nam, K., Hwang, K., Sung, M., Kim, H., Chun, J., Park, M., Ahn, T., Hong, C., Lee, S., Park, H., Park, J., Verma, D., Cheon, C. (2005). Induction of Thioredoxin Is Required for Nodule Development to Reduce Reactive Oxygen Species Levels in Soybean Roots. *Plant Physiol.* 139: 1881-1889.
- Leonard, S., Carroll, K. (2011). Chemical ‘omics’ approaches for understanding protein cysteine oxidation in biology. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 15: 88-102.
- Lerouge, P., Roche, P., Faucher, C., Maillet, F., Truchet, G., Promé, J., Dénarié, J. (1990). Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature.* 344: 781-784.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994). “H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response”. *Cell.* 79: 583-593.
- Lievens, S., Goormachtig, S., Den Herder, J., Capoen, W., Mathis, R., Hedden, P., Holsters, M. (2005). Gibberellins are involved in nodulation of *Sesbania rostrata*. *Plant Physiol.* 139: 1366-1379.



- **Lin, D., Wang, E., Tang, H., Han, T., He, Y., Guan, S., Chen, W.** (2008). *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 58: 1409-1413.
- **Livak, K., Schmittgen, T.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 25: 402-408.
- **Lloret, L., Martínez-Romero, E.** (2005). Evolución y Filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 47: 43-60.
- **Lodeiro, A., López García, S., Mongiardini, E., Quelas, J., Peticari, A.** (2003). Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno. En *Microbiología agrícola, un aporte a la investigación argentina*. Albanesi, A., Anriquez, A., Luna, S., Kunst, C., Ledesma, R. (Eds). UNSE.
- **Lohar, D., Gantt, J., VandenBosch, K.** (2007). A transient decrease in reactive oxygen species in roots leads to root hair deformation in the legume-rhizobia symbiosis. *New Phytol.* 173: 39-49.
- **López-Mosquera, M., Fernández-Lema, E., Villares, R., Corral, R., Alonso, B., Blanco, C.** (2011). Composting fish waste and seaweed to produce a fertilizer for use in organic agriculture. *Procedia Environ. Sci.* 9: 113-117.
- **Lu, D., Tang, G., Wang, D., Luo, L.** (2013). The *Sinorhizobium meliloti* LysR family transcriptional factor LsrB is involved in regulation of glutathione biosynthesis. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 45: 882-8.
- **Luo, L., Yao, S., Becker, A., Ruberg, S., Yu, G., Zhu, J., Cheng, H.** (2005). Two new *Sinorhizobium meliloti* LysR-type transcriptional regulators required for nodulation. *J. Bacteriol.* 187: 4562-4572.
- **Luo, M., Dang, P., Bausher, M., Holbrook, R., Lee, R., Lynch, R., Guo, B.** (2005). Identification of transcripts involved in resistance responses to leaf spot disease caused by *Cercosporidium personatum* in peanut (*Arachis hypogaea*). *The Amer. Phytopathol. Soc.* 95: 381-387.
- **Lushchak, V.** (2011). Adaptative response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 153: 175-190.
- **Madigan, M., Martiniko, J., Parker, J.** (2000). *Brock biology of microorganisms*, Prentice-Hall (ed), Inc., New Jersey. pp: 874.



- **Madsen, L., Tirichine, L., Jurkiewicz, A., Sullivan, J., Heckmann, A., Bek, C. Ronson, A., James, E., Stougaard, J.** (2010). The molecular network governing nodule organogenesis and infection in the model legume *Lotus japonicus*. *Nat. Commun.* 1-12.
- **Maiti, D., Sarkar, T., Sanjay, G.** (2012). Detection of S-nitrosothiol and nitrosylated proteins in *Arachis hypogaea* functional nodule: response of the nitrogen fixing symbiont. *Plos One.* 7: e45526.
- **Mallick, N., Mohn, F.** (2000). "Reactive oxygen species: response of algal cells". *J. Plant Physiol.* 157: 183-193.
- **Marino, D., Pucciariello, C., Puppo, A., Frendo, P.** (2009). The Redox State, a Referee of the Legume–Rhizobia Symbiotic Game. *Adv. Bot. Res.* 52: 115-151.
- **Marino, D., Andrio, E., Danchin, E., Oger, E., Gucciardo, S., Lambert, A., Puppo, A., Pauly, N.** (2011). A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol.* 189: 580-592.
- **Marino, D., Dunand, C., Puppo, A., Pauly, N.** (2012). A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci.* 17: 9-15.
- **Martínez-Romero, E., Phillips, D.** (2000). Biological nitrogen fixation. En: *Enciclopedia of Microbiology.* 2º ed. Academic Press. Vol. 1 pp: 492-505.
- **Matamoros, M., Dalton, D., Ramos, J., Clemente, M., Rubio, C., Becana, M.** (2003). Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis. *Plant Physiol.* 133: 499-509.
- **Mayz, J.** (1997). *Simbiosis Leguminosas/Rizobia.* Ediciones del Instituto de Investigaciones Agropecuarias IAPUDO. Universidad de Oriente. Núcleo de Monagas. Maturín. Venezuela. 113 p.
- **Meilhoc, E., Boscari, A., Bruand, C., Puppo, A., Brouquisse, R.** (2011). Nitric oxide in legume-rhizobium symbiosis. *Plant Sci.* 181: 573-581.
- **Melo, P., Silva, L., Ribeiro, I., Seabra, A., Carvalho, H.** (2011). Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant Physiol.* 157: 1505-1517.
- **Men'shchikova, E., Zenkov, N., Lankin, V.** (2008). Oxidative Stress. *Pathological States and Diseases [in Russian], ARTA, Novosibirsk,* p. 284.
- **Merrick, M.** (2005). Regulation of nitrogen fixation in free-living diazotrophs. En: Klipp, W., Masepohl, B., Gallon, J., Newton, W., (eds.). *Genetics and regulation of nitrogen fixation in free-living bacteria,* Washington, D.C, USA pp. 197-223.



- **Mesa, S., Velasco, L., Manzanera, M., Delgado, M., Bedmar, E.** (2002). Characterization of the *norCBQD* genes, encoding nitric oxide reductase, in the nitrogen fixing bacterium *Bradyrhizobium japonicum*. *Microbiol.* 148: 3553-3560.
- **Michaelis, L.** (1946). Fundamentals of oxido-reduction. In *Currents in Biochemical Research*, DE Green (ed) New York: Interscience. pp: 207-227.
- **Miller, G., Shulaev, V., Mittler, R.** (2008). Reactive oxygen signaling and abiotic stress. *Physiol Plant.* 133: 481-489.
- **Mitanova, N., Mironova, N., Glyan'ko, A.** (2006). Nitrate Absorption by Pea Seedlings Depending on Doze and Inoculation with Root Nodule Bacteria, *Agrokhimiya.* 1: 32-33.
- **Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., Van Breusegem, F.** (2004). Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490-498.
- **Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V., Van Breusegem, F.** (2011). ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci.* 16: 300-309.
- **Montiel J., Nava N., Cárdenas L., Sánchez-López R., Arthikala M., Santana O., Sánchez, F., Quinto, C.** (2012). A *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene is required for root injection by rhizobia. *Plant Cell Physiol.* 53: 1751-1767.
- **Moreno, I., Cholaky, C., Lesser, M., Marcos, J.** (1996). Efecto de la labranza sobre el contenido de carbono orgánico y su implicancia en la estabilidad estructural. *Actas Resúmenes del XV Congreso Argentino de la Ciencia del Suelo (AACCS).* Santa Rosa, La Pampa-Argentina: 26a-26b.
- **Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B., Boivin-Masson, C.** (2001). Nodulation of legumes by members of the beta-subclass of Proteobacteria. *Nature.* 411: 948-950.
- **Muglia, C., Comai, G., Spegazzini, E., Ricillo, P., Aguilar, O.** (2008). Glutathione produced by *Rhizobium tropici* is important to prevent early senescence in common bean nodules. *FEMS Microbiol. Lett.* 286: 191-198.
- **Muñoz, V., Ibañez, F., Tonelli, M., Valetti, L., Anzuay, M., Fabra, A.** (2011). Phenotypic and phylogenetic characterization of native peanut *Bradyrhizobium* isolates obtained from Córdoba, Argentina. *Syst. Appl. Microbiol.* 34: 446-452.
- **Nanda, A., Andrio, E., Marino, D., Pauly, N., Dunand, C.** (2010). Reactive oxygen species during plant-microorganism early interactions. *J. Integr. Plant Biol.* 52: 195-204.
- **Ndoye, I., de Billy, F., Vasse J., Dreyfus, B., Truchet, G.** (1994). Root nodulation of *Sesbania rostrata*. *J Bacteriol* 176: 1060-1068.



- Neill, S., Desikan, R., Clarke, A., Hurst, R., Hancock, J. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J. Exp. Bot.* 53: 1237-1247.
- Oger, E., Marino, D., Guignonis, J., Pauly, N., Puppo, A. (2012). Sulfenylated proteins in the *Medicago truncatula-Sinorhizobium meliloti* symbiosis. *J. Proteomics.* 75: 4102-4113.
- Oldroyd, G. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat. Rev. Microbiol.* 11: 252-263.
- Oldroyd, G., Downie, J. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 519-526.
- Orikasa, Y., Nodasaka, Y., Ohyama, T., Okuyama, H., Ichise, N., Yumoto, I., Morita, N., Wei, M., Ohwada, T. (2010). Enhancement of the nitrogen fixation efficiency of genetically-engineered *Rhizobium* with high catalase activity. *Journ. Biosc. Bioen.* 4: 397-402.
- Orozco-Cárdenas, M., Ryan, C. (1999). Hydrogen Peroxide is generated systemically in plant leaves by wounding and systemin via the octadecanoid pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 6553-6557.
- Panek, H., O'Brian, M. (2004). *KatG* is the primary detoxifier of hydrogen peroxide produced by aerobic metabolism in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 186: 7874-7880.
- Pang, C., Wang, B. (2008). "Oxidative stress and salt tolerance in plants," in *Progress in Botany*, U.L.üttge, W. Beyschlag, and J. Murata, Eds., pp. 231-245, Springer, Berlin, Germany.
- Parniske, M., Downie, J. (2003). Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature.* 425: 569-570.
- Pauly, N., Pucciariello, C., Mandon, K., Innocenti, G., Jamet, A., Baudouin, E., Herouart, D., Frendo, P., Puppo, A. (2006). Reactive oxygen and nitrogen species and glutathione: key players in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *J. Exp. Bot.* 57: 1769-1776.
- Peer, W., Murphy, A. (2007). Flavonoids and auxin transport: modulators or regulators? *Trends Plant Sci.* 12: 556-563.
- Pei, Z., Murata, Y., Benning, G., Thomine, S., Klusener, B., Allen, G., Grill, E., Schroeder, J. (2000). Calcium channels activated by hydrogen peroxide mediate abscisic acid signalling in guard cells. *Nature.* 406: 731-734.



- **Peleg-Grossman, S., Golani, Y., Kaye, Y., Melamed-Book, N., Levine A.** (2009). NPR1 Protein Regulates Pathogenic and Symbiotic Interactions between *Rhizobium* and Legumes and Non-Legumes. *PLoS One*. 4: e8399.
- **Peleg-Grossman, S., Melamed-Book N., Levine A.** (2012). ROS production during symbiotic infection suppresses pathogenesis-related gene expression. *Plant Signal Behav.* 7: 409-415.
- **Peleg-Grossman, S., Volpin, H., Levine, A.** (2007). Root hair curling and *Rhizobium* infection in *Medicago truncatula* are mediated by phosphatidylinositide-regulated endocytosis and reactive oxygen species. *J. Exp. Bot.* 58: 1637-1649.
- **Peoples, M., Brockwell, J., Herridge, D., Rochester, I., Alves, B., Urquiaga, S., Boddey, R., Dakora, F., Bhattarai, S., Maskey, S., Sampet, C., Rerkasem, B., Khan, D., Hauggaard-Nielsen, H., Jensen, E.** (2009). The contributions of nitrogen-fixing crop legumes to the productivity of agricultural systems. *Symbiosis*. 48: 1-17.
- **Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., Le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., Frugier, F.** (2011). *MtCRE1*-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant J.* 65: 622-633.
- **Poiteau, P.** (1853). Note sur l' *Arachis hypogaea*. *Ann. Sci. Nat.* 3d Ser 19: 268-272.
- **Poole, R., Hughes M.** (2000). New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol. Microbiol.* 36: 775-783.
- **Puppo, A., Pauly, N., Boscari, A., Mandon, K., Brouquisse, R.** (2013). Hydrogen peroxide and nitric oxide: key regulators of the Legume-*Rhizobium* and mycorrhizal symbioses. *Antioxid Redox Signal.* 18: 2202-2219.
- **Ramírez-Bahena, M., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D., Mateos, P., Martínez-Molina, E., Willems, A., Velázquez, E.** (2009). *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59: 1929-1934.
- **Ramu S., Peng H., Cook D.** (2002). Nod factor induction of reactive oxygen species production is correlated with expression of the early nodulin gene *rip1* in *Medicago truncatula*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 522-528.
- **Rana, D., Krishnan, H.** (1995). A new root-nodulating symbiont of the tropical legume *Sesbania*, *Rhizobium* sp. SIN-1, is closely related to *R. galegae*, a species that nodulates temperate legumes. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 19-25.

- **Rappé, M., Giovannoni, S.** (2003). The uncultured microbial majority. *Annu. Rev. Microbiol.* 57: 369-394.
- **Raymond, J., Siefert, J., Staples, C., Blankenship, R.** (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Mo. Biol. Evol.* 21: 541-554.
- **Ribeiro, C., Alloing, G., Mandon, K., Frendo, P.** (2014). Redox regulation of differentiation in symbiotic nitrogen fixation. *Biochim. Biophys. Acta.* doi: 10.1016/j.bbagen.2014.11.018.
- **Riccillo, P., Muglia, C., de Bruijn, F., Roe, A., Booth, I., Aguilar, O.** (2000). Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.* 182: 1748-1753.
- **Rivas, R., Velázquez, E., Willems, A., Vizcaíno, N., Subba-Rao, N., Mateos, P., Gillis, M., Dazzo, F., Martínez-Molina, E.** (2002). A new species of *Devosia* that forms a unique nitrogen-fixing root-nodule symbiosis with the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.) Druce. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5217-5222.
- **Romero, N., Denicola, A., Radi, R.** (2006). Red blood cells in the metabolism of nitric oxide-derived peroxynitrite. *IUBMB-Life.* 58: 572-580.
- **Roos, G., Messens, J.** (2011). Protein sulfenic acid formation: from cellular damage to redox regulation. *Free Radic. Biol. Med.* 51: 314-326.
- **Rubio-Wilhelmi, M., Sanchez-Rodriguez, E., Rosales, M., Blasco, B., Rios, J., Romero, L., Blumwald, E., Ruiz, J.** (2012). Ammonium formation and assimilation in PSARK:IPT tobacco transgenic plants under low N. *J. Plant Physiol.* 169: 157-162.
- **Saeki, K.** (2011). Rhizobial measures to evade host defense strategies and endogenous threats to persistent symbiotic nitrogen fixation: a focus on two legume-rhizobium model systems. *Cell Mol. Life Sci.* 68: 1327-1339.
- **Sagi, M., Fluhr, R.** (2001). Superoxide production by plant homologues of the gp91<sup>phox</sup> NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and Tobacco Mosaic Virus Infection. *Plant Physiol.* 126: 1281-1290.
- **Saito, A., Mitsui, H., Hattori, R., Minamisawa, K., Tsutomu, Hattori T.** (1998). Slow-growing and oligotrophic soil bacteria phylogenetically close to *Bradyrhizobium japonicum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25: 277-286.
- **Sánchez, F., Padilla, J., Pérez, H., Lara, M.** (1991). Control of nodulin genes in root-nodule development and metabolism. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biology.* 42: 507-528.



- **Santos, R., Bocquet, S., Puppo, A., Touati, D.** (1999). Characterization of an atypical superoxide dismutase from *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 181: 4509-4516.
- **Santos, R., Herouart, D., Puppo, A., Touati, D.** (2000). Critical protective role of bacterial superoxide dismutase in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Mol. Microbiol.* 38: 750-759.
- **Santos, R., Herouart, D., Sigaud, S., Touati, D., Puppo, A.** (2001). Oxidative burst in alfalfa-*Sinorhizobium meliloti* symbiotic interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 14: 86-89.
- **Scandalios, J.G.** (1993). "Oxygen stress and superoxide dismutases". *Plant Physiol.* 101: 7-12.
- **Schauser, L., Roussis, A., Stiller, J., Stougaard, J.** (1999). A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. *Nature.* 402: 191-195.
- **Scheler, C., Durner, J., Astier, J.** (2014). Nitric oxide and reactive oxygen species in plant biotic interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* 16: 534-539.
- **Sen, D., Weaver, R.** (1984). A basis for different rates of N<sub>2</sub>-fixation by the same strains of *Rhizobium* in peanut and cowpea root nodules. *Plant Science Letters.* 34: 239-246.
- **Sen, D., Weaver, R., Bal, A.** (1986). Structure and organisation of effective peanut and cowpea root nodules induced by rhizobial strain 32H1, *J. Exp. Bot.* 37: 356-363.
- **Sharma, P., Jha, A., Dubey, R., Pessarakli, M.** (2012). Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Plant Signal Behav.* 8: e23681.
- **Shaw, S., Long, S.** (2003). Nod factor inhibition of reactive oxygen efflux in a host legume. *Plant Physiol.* 132: 2196-2204.
- **Sigaud, S., Becquet, V., Frendo, P., Puppo, A., He´rouart, D.** (1999). Differential regulation of two divergent *Sinorhizobium meliloti* genes for HP-II-like catalases during free-living growth and protective role of both catalases during symbiosis. *J. Bacteriol.* 181: 2634-2639.
- **Smirnov, N.** (1993). The role of active oxygen in response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.* 125: 27-58.
- **Smit, P., Raedts, J., Portyanko, V., Debell'e, F., Gough, C., Bisseling, T., Geurts, R.** (2005). NSP1 of the GRAS protein family is essential for rhizobial Nod factor-induced transcription. *Science.* 308: 1789-1791.



- **So, R., Ladha, J., Young, J.** (1994). Photosynthetic symbionts of *Aeschynomene* spp. form a cluster with bradyrhizobia on the basis of fatty acid and rRNA analyses. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 392-403.
- **Somasegaran, P., Hoben, H.** (1994). Handbook for *Rhizobia*: Methods in Legume–*Rhizobium*. Techn. Section 1: 3-6.
- **Sosa Alderete, L., Talano, M., Ibañez, S., Purro, S., Agostini, E., Medina, M.** (2009). Establishment of transgenic tobacco hairy roots expressing basic peroxidases and its application for phenol removal. *J. Biotechnol.* 139: 273-279.
- **Soto, M., Dominguez-Ferreras, A., Pérez-Mendoza, D., Sanjuán, J., Olivares, J.** (2009). Mutualism versus pathogenesis: the give-and-take in plant-bacteria interactions. *Cell. Microbiol.* 11: 381-388.
- **Soto, M., Sanjuan J., Olivares J.** (2006). Rhizobia and plant-pathogenic bacteria common infections weapons. *Microbiology.* 152: 3167-3174.
- **Soto-Urzúa L., Baca B.** (2001). Mecanismos de Protección de la Nitrogenasa a la Inactivación por Oxígeno. *Revista Latinoamericana de Microbiología.* 43: 37-49.
- **Spaink, H., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G., Lugtenberg, B., Kennedy E.** (1992). Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 5: 72-80.
- **Sprent, J.** (2003). Mutual sanctions. *Nature.* 422: 672–674.
- **Sprent, J. y Sprent, P.** (1990). Nitrogen fixing organsims. Pure and applied aspects. Chapman and Hall, Camdbrige. Great Britain. pp. 256.
- **Sprent, J., James, E.** (2008). Legume–rhizobial symbiosis: an anorexic model?. *New Phytol.* 179: 3-5.
- **Stachelin, C., Schultze, M., Tokuyasu, K., Poinso, V., Promé, J.C., Kondorosi, E., Kondorosi, A.** (2000). N-Deacetylation of *Sinorhizobium meliloti* Nod factors increases their stability in the *Medicago sativa* rhizosphere and decreases their biological activity. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 13: 72-79.
- **Stalker, H.** (1997). Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Field Crops Research Elsevier. 53: 205-217.
- **Stöhr, C., Stremmlau, S.** (2006). Formation and Possible Roles of Nitric Oxide in Plant Roots, *J. Exp. Bot.* 57: 463-470.
- **Stougaard, J.** (2000). Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiol.* 124: 531-540.



- **Stracke, S., Kistner, C., Yoshida, S., Mulder, L., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., Stougaard, J., Szczyglowski, K., Parniske, M.** (2002) A plant receptor-like kinase required for both fungal and bacterial symbiosis. *Nature*. 417: 959-962.
- **Subba, Rao, N., Mateos, P., Baker, D., Pankratz, H., Palma, J., Dazzo, F., Sprent, J.** (1995). The unique root-nodule symbiosis between *Rhizobium* and the aquatic legume *Neptunia natans* (L.f.). *Druce. Planta*. 196: 311-320.
- **Subramanian, S., Stacey, G., Yu, O.** (2007). Distinct, crucial roles for flavonoids during legume nodulation. *Trends Plant Sci*. 12: 282-285.
- **Sullivan, J., Ronson, C.** (1998) Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 5145-5149.
- **Sutherland M., Learmonth B.** (1997). The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase. *Free Radical Res.* 27: 283-289.
- **Sy, A., Giraud, E., Jourand, P.** (2001). Methylophilic *Methylobacterium* bacteria nodulate and fix nitrogen in symbiosis with legumes. *J. Bacteriol.* 183: 214-220.
- **Tate, R., Cermola, M., Riccio, A., Diez-Roux, G., Patriarca, E.** (2012). Glutathione is required by *Rhizobium etli* for glutamine utilization and symbiotic effectiveness. *Mol. Plant Microbe. Interact.* 25: 331-340.
- **Taurian, T., Ibañez, F., Fabra, A., Aguilar, O.** (2006). Genetic diversity of rizobia nodulating *Arachis hypogaea* L. in Central Argentinean soils. *Plant Soil*. 282: 41-52.
- **Taurian, T., Morón, B., Soria-Díaz, M., Angelini, J., Tejero-Mateo, P., Gil-Serrano, A., Megías, M., Fabra, A.** (2008). Signal molecules in the peanut-bradyrhizobia interaction. *Archiv. Microbiol.* 189: 345-356.
- **Tavares, F., Santos, C., Sellstedt, A.** (2007). Reactive oxygen species in legume and actinorhizal nitrogen-fixing symbioses: the microsymbiont's responses to an unfriendly reception. *Physiol. Plant*. 130: 344-356.
- **Taylor, L. y Grotewold, E.** (2005). Flavonoids as developmental regulators. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 317-323.
- **Tirichine, L., Sandal, N., Madsen, L., Radutoiu, S., Albrektsen, A.** (2007). A gain-of-function mutation in a cytokinin receptor triggers spontaneous root nodule organogenesis. *Science*. 315: 7-104.



- **Tognetti, V., Muhlenbock, P., Van Breusegem, F.** (2012). Stress homeostasis – the redox and auxin perspective. *Plant Cell Environ.* 35: 321-333.
- **Torres, M.** (2010). ROS in biotic interactions. *Physiol. Plant.* 138: 414-429.
- **Torres, M., Dang, J.** (2005). Functions of respiratory burst oxidative in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8: 397-403.
- **Torres, M., Jones, J., Dangl, J.** (2006). Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol.* 141: 373-378.
- **Treutter, D.** (2005). Significance of flavonoids in plant resistance and enhancement of their biosynthesis. *Plant Biol.* 7: 581-591.
- **Trujillo, M., Willems A., Abril A., Planchuelo A., Rivas R., Ludeña D., Mateos P., Martínez-Molina E., Velázquez, E.** (2005). Nodulation of *Lupinus albus* by strains of *Ochrobactrum lupini* sp. nov. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1318-1327.
- **Tsakagoshi, H., Busch, W., Benfey, P.** (2010). Transcriptional regulation of ROS controls transition from proliferation to differentiation in the root. *Cell.* 143: 606-616.
- **Uheda, E., Daimon, H., Yoshizako, F.** (2001). Colonization and invasion of peanut (*Arachis hypogaea* L.) roots by *gusA*-marked *Bradyrhizobium* sp. *Can. J. Bot.* 79: 733-738.
- **Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaître, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., Kondorosi, E., Mergaert, P.** (2010). Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science.* 327: 1122-1126.
- **Vanechoutte, M., Peter Kämpfer, De Baere, T., Falsen, E., Verschraegen, G.** (2004). *Wautersia* gen. nov., a novel genus accommodating the phylogenetic lineage including *Ralstonia eutropha* and related species, and proposal of *Ralstonia* [*Pseudomonas*] *syzygii* (Roberts et al. 1990) comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 317-327.
- **Vargas, M., Encarnacion, S., Davalos, A., Reyes-Perez, A., Mora, Y., Garcia-de los Santos, A., Brom, S., Mora, J.** (2003). Only one catalase, KatG, is detectable in *Rhizobium etli*, and is encoded along with the regulator OxyR on a plasmid replicon. *Microbiology.* 149: 1165-1176.
- **Vasil'eva, G., Glian'ko, A., Mironova, N.** (2005). *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* 41: 621-5.



- **Vasse, J., de Billy, F., Truchet, G.** (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *Plant J.* 4: 555-566.
- **Vega-Hernández, M., Pérez-Galdona, R., Dazzo, F., Jarabo-Lorenzo, A., Alfayate, M., Leon-Barrios, M.** (2001). Novel infection process in the indeterminate root nodule symbiosis between *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste) and *Bradyrhizobium* sp. *New Phytol.* 150: 707-721.
- **Verma, S., Dubey, S.** (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Science.* 164: 645-655.
- **Verstraete, B., Janssens, S., Smets, E., Dessein, S.** (2013). Symbiotic  $\beta$ -Proteobacteria beyond legumes: *Burkholderia* in Rubiaceae. *PLoS ONE.* 8:e55260.
- **Vincent, J.** (1970). A manual for the practical study of root nodule bacteria. International biological programme handbook no 15. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford. pp. 73-97.
- **Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., PérezGaldona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E.** (2005). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium genospecies* beta. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55: 569-575.
- **Wagner, S.** (2011). Biological nitrogen fixation. *Nature Education Knowledge.* 3: 15.
- **Walters, D.** (2003). Polyamines and plant disease. *Phytochem.* 64: 97-107.
- **Wang, Y., Chen, C., Loake, G., Chu, C.** (2010). Nitric oxide: promoter or suppressor of programmed cell death?. *Protein Cell.* 1: 133-142.
- **Wasson, A., Pellerone, F., Mathesius, U.** (2006). Silencing the flavonoid pathway in *Medicago truncatula* inhibits root nodule formation and prevents auxin transport regulation by rhizobia. *Plant Cell.* 18: 1617-1629.
- **Wasson, A., Ramsay, K., Jones, M., Mathesius, U.** (2009). Differing requirements for flavonoids during the formation of lateral roots, nodules and root knot nematode galls in *Medicago truncatula*. *New Phytol.* 183: 167-179.
- **Willems, A., Fernández-López, M., Muñoz-Adelantado, E., Goris, J., De Vos, P., Martínez-Romero, E., Toro, N., Gillis, M.** (2003). Description of new *Ensifer* strains from nodules and proposal to transfer *Ensifer adhaerens* Casida 1982 to *Sinorhizobium* as



*Sinorhizobium adhaerens* comb. nov. Request for an opinion. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 53: 1207-1217.

- **Williamso, C., Grayer, R.** (2004). Anthocyanins and other flavonoids. Nat. Prod. Rep. 21: 539-573.
- **Wojtaszek, P.** (1997). Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. Biochem. J. 322: 681-692.
- **Xu, L., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H.** (1995). *Bradyrhizobium liaoningense* sp. Nov., isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 45: 706-711.
- **Yao, Z., Kan, F., Wang, E., Wei, G., Chen, W.** (2002). Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 52: 2219-2230.
- **Young, J.** (1992). Phylogenetic classification of Nitrogen-fixing organisms. En biological nitrogen fixation. G. Stacey R. H. Burris & H. J. Evans. New York: Chapman & Hall. pp: 43-86.
- **Young, J.** (2010). *Sinorhizobium* versus *Ensifer*: may a taxonomy subcommittee of the ICSP contradict the Judicial Commission? Inter. J. Syst. Evol. Microbiol. 60: 1711-1713.
- **Yun, B., Feechan, A., Yin, M., Saidi, N., Le Bihan, T., Yu, M., Moore, J., Kang, J., Kwon, E., Spoel, S., Pallas, J., Loake, G.** (2011). S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. Nature. 478: 264-268.
- **Zaninotto, F., La Camera, S., Polverari, A., Delledonne, M.** (2006). Cross talk between reactive nitrogen and oxygen species during the hypersensitive disease resistance response. Plant Physiol. 141: 379-383.
- **Zhang, J., Subramanian, S., Stacey, G., Yu, O.** (2009). Flavones and flavonols play distinct critical roles during nodulation of *Medicago truncatula* by *Sinorhizobium meliloti*. Plant J. 57: 171-183.
- **Zhang, X., Nick, G., Kaijalainen, S., Terefewirjm, Z., Paulin, L., Tighe, S., Graham, P., Lindstrom, K.** (1999). Phylogeny and diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from the root-nodules of peanut (*Arachis hypogaea*) in Sichuan, China. Syst. Appl. Microbiol. 22: 378-386.
- **Zurdo-Pinheiro, J., Rivas, R., Trujillo, M., Vizcaino, N., Carrasco, J., Chamber, M., Palomares, A., Mateos, P., Martinez-Molina, E., Velazquez, E.** (2007). *Ochrobactrum cytisi* sp. nov., isolated from nodules of *Cytisus scoparius* in Spain. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 784-788.



74747

16