



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para optar el título de Doctor en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DEL EFECTO DE LA LUZ
SOBRE EL CRECIMIENTO, DESARROLLO Y CAPACIDAD PGPR
DE *Azospirillum brasilense* Az39, LA CEPA MÁS UTILIZADA EN LA
FORMULACIÓN DE INOCULANTES PARA NO-LEGUMINOSAS EN
LA REPÚBLICA ARGENTINA**

Mic. Romina Micaela Molina

DIRECTOR: Dr. Fabricio Darío Cassán

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Marzo de 2019

COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

Nombre y Apellido.....Lugar de trabajo.....

Firma.....Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha.....

Calificación.....

DEDICATORIA

*A mis padres
Miguel y Mirta*

AGRADECIMIENTOS

- A mi Familia que estuvo presente en cada paso que di, momentos buenos y no tan buenos, pero siempre incondicionalmente me han apoyado y me han enseñado a luchar y continuar. Mil gracias a mis padres Miguel y Mirta y a mis hermanos, que son mi vida, Natalia, David y María Luz. Los quiero mucho. Gracias por haber sido mi pilar..!
- A María Luz, que me acompañó en cada momento y confió en mi más que nadie. Gracias hermanita..!!
- A Analía Llanes, que además de ser una gran amiga, que me ha acompañado y enseñado muchas cosas durante todo el camino recorrido desde lo profesional hasta aprender a relajarse con las famosas “cortaditas de semana”, ja. Siempre presente para brindar buena onda, y enseñarme a confiar en que todo lo que nos proponemos se puede lograr..!
- A Verónica Mora, a quien conocí durante el transcurso de esta Tesis, y también además de conocer a una excelente profesional, conocí a una gran persona y amiga a quien valoro mucho. Ella me ha enseñado a luchar por lo que queremos a pesar de las adversidades de la vida. Gracias amiga...!
- A Anahí Coniglio y Florencia Donadío, amigas que día a día, con mate de por medio, me han acompañado no solo en los experimentos, índices, tablas, etc., sino también en cada momento que transcurrió durante este tiempo, haciendo que cada día fuera especial. Gracias..!!
- A Luciano, quien a pesar de conocerlo hace muy poco tiempo, he compartido muchos momentos de esta Tesis cruciales y el siempre estuvo presente, ayudándome, acompañándome, una gran persona, muchas gracias..!
- A todas las personas que conocí durante esta Tesis, y a otras que ya conocía cuando estudié la carrera de grado de Microbiología fue muy lindo estar rodeada de estas personas
- A mis compañeros del Laboratorio, Daniela, Jose, Gastón, muchas gracias por su aporte, que en mayor o menor medida, para mi fue importante.
- A Gastón con el que compartí la última etapa, sin embargo su aporte, fue enorme y de gran importancia. Gracias López..!
- A Fabricio Cassán, el director de esta Tesis a quien agradezco todo lo enseñado y toda su preocupación por que este trabajo se llevara a cabo en tiempo y forma.

ÍNDICE

INDICE DE TABLAS	X
INDICE DE FIGURAS	XI
RESUMEN	XVIII
ABSTRACT	XIX
CAPÍTULO I: Introducción general	1
I.1. Introducción general.....	2
I.1.1. Características morfo-fisiológicas del género	5
I.1.1.1. Aislamiento e identificación.	6
I.1.1.2. <i>A. brasilense</i> Az39	8
I.1.1.3. Inoculantes formulados con <i>A. brasilense</i> Az39.....	8
I.1.2. El secuenciamiento genómico	9
I.1.2.1. Genomas bacterianos y secuenciación	10
I.1.2.2. Análisis genómico de <i>A. brasilense</i> Az39	10
I.1.3. La luz en la naturaleza	11
I.1.3.1. El efecto de la luz en bacterias.	11
I.1.3.2. Estrategias bacterianas relacionadas con la captación de luz.	12
I.1.3.3. El rol de los fotoreceptores en bacterias.	13
I.1.3.3.1. Fotoreceptores en <i>Azospirillum</i> sp.	14
I.2. Hipótesis	15
I.2.1. Hipótesis Principal.....	15
I.3. Objetivos.....	15
I.3.1. Objetivo General.....	15
I.3.2. Objetivos Específicos.....	16
CAPÍTULO II: Análisis genómico y funcional del genoma de <i>A. brasilense</i> Az39	17
II.1. Importancia del género <i>Azospirillum</i> sp. en la República Argentina	18
II.1.1. Secuenciación Masiva	19
II.1.1.1. Tecnologías de Secuenciación de ADN: Segunda generación	20
II.1.1.1.1. Sistema Roche 454. Pirosecuenciación.....	20
II.1.1.1.2. Secuenciamiento del genoma completo de <i>Azospirillum brasilense</i> Az39.....	21
II.1.2. Análisis <i>in silico</i>	24
II.1.2.1. Anotaciones Rápidas utilizando Tecnología de Subsistemas (RAST)	24
II.1.2.2. KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto).....	25

II. 2. Materiales y Métodos.....	25
II.2.1. Análisis bioinformático del genoma de <i>A. brasilense</i> Az39.....	25
II.2.2. Análisis comparativo	26
II.3. Resultados.....	26
II.3.1. Secuencia codificante “phyAz39-1”	26
II.3.2. Secuencia codificante “phyAz39-2”	28
II.3.3. Secuencia bacterio-fitocromo hemooxigenasa “BphO-Az39”	30
II.4. Análisis comparativo.....	31
II.5. Discusión.....	34
II.5.1. Abordaje filogenético bioinformático.....	38
II.6. Conclusiones parciales	39
CAPÍTULO III: Comportamiento de <i>A. brasilense</i> Az39 en medio sólido y semi-sólido expuesto a diferentes calidades de luz.....	40
III.1. <i>A. brasilense</i> Az39 en la naturaleza.....	41
III.1.1. Comportamiento de <i>Azospirillum</i> sp. frente a diversas condiciones ambientales	41
III.1.1.1. Influencia de la luz en el sistema suelo	42
III.1.2. <i>Azospirillum</i> en condiciones naturales y su utilización en prácticas agrícolas.....	42
III.1.3. Movilidad en <i>Azospirillum</i> sp.	44
III.2. Materiales y Métodos.....	44
III.2.1. Material Biológico.....	44
III.2.2. Evaluación del comportamiento de Az39 en Medio de Cultivo sólido.....	44
III.2.2.1. Condiciones generales de cultivo.	44
III.2.2.1.1. Tipo y calidad de luz	45
III.2.2.1.2. Medios de cultivo	46
III.2.2.1.3. Temperatura de incubación.....	46
III.2.2.1.4. Tiempo de exposición.....	47
III.2.2.1.5. Disposición de las placas en la cámara de cultivo.....	47
III.2.2.1.6. Distancia a la fuente lumínica.	47
III.2.2.2. Evaluación de la movilidad por swimming (natación)	48
III.2.2.3. Evaluación de la fototaxis en medio semisólido	49
III.2.3. Análisis estadístico de la información.....	50
III.3. Resultados	50
III.3.1. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio agarizado.....	50

III.3.1.1. Tipo y calidad de luz.....	50
III.3.1.2. Espectros de Emisión.....	51
III.3.1.3. Medios de cultivo.....	52
III.3.1.4. Dilución del medio nutricionalmente complejo	53
III.3.1.5. Enriquecimiento del medio mínimo	55
III.3.1.6. Distancia a la fuente lumínica	59
III.3.1.7. Temperatura de incubación	60
III.3.1.8. Tiempo de exposición	62
III.3.1.9. Disposición de las placas en la cámara de cultivo.....	63
III.3.2. Evaluación de la movilidad por natación (swimming).....	65
III.3.3. Evaluación de la fototaxis en medio semisólido.....	66
III.4. Discusión.....	68
III.4.1. Movilidad por swimming y fototaxis	71
III.5. Conclusiones parciales.....	73
CAPÍTULO IV: Comportamiento de <i>A. brasilense</i> Az39 en medio de cultivo líquido y expuesto diferentes calidades de luz.....	74
IV.1. Introducción	75
IV.1.1. <i>Azospirillum</i> y el estilo de vida rizosférico	75
IV.1.2. <i>Azospirillum</i> y promoción del crecimiento vegetal.....	77
IV.1.2.1. Factores ambientales que regulan la biosíntesis de AIA.	79
IV.2. Materiales y Métodos	80
IV.2.1. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio de cultivo líquido	80
IV.2.1.1. Evaluación del comportamiento de <i>A. brasilense</i> Az39 en medio MMAB.....	81
IV.2.1.1.1. Condiciones generales de cultivo.....	81
IV.2.1.1.1.1. Evaluación del crecimiento.	81
IV.2.1.1.1.2. Evaluación de la producción de ácido indol-3-acético	82
IV.2.1.2. Evaluación del comportamiento de <i>A. brasilense</i> Az39 en medio LB.	83
IV.2.1.2.1. Condiciones generales de cultivo.....	83
IV.2.1.2.1.1. Evaluación del crecimiento	84
IV.2.1.2.1.2. Evaluación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA).....	84
IV.2.1.2.1.3. Ensayo de formación y cuantificación de biofilms.....	86
IV.2.1.2.1.4. Determinación de exopolisacáridos (EPS) totales.....	87
IV.2.1.3. Análisis estadístico	87

IV.3. Resultados	87
IV.3.1. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio MMAB	87
IV.3.1.1. Crecimiento y desarrollo de <i>A. brasilense</i> Az39.	87
IV.3.1.2. Producción de ácido indol-3-acético (AIA)	89
IV.3.2. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio líquido LB.....	90
IV.3.2.1. Crecimiento y desarrollo de <i>A. brasilense</i> Az39.	90
IV.3.2.2. Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA).....	93
IV.3.2.3. Agregación celular.....	99
IV.3.2.4. Formación de Biofilms	101
IV.3.2.5. Exopolisacáridos totales (EPS)	102
IV.4. Discusión.....	103
IV.4.1. Agregación celular, formación de Biofilms y producción de EPS	107
IV.5. Conclusiones	110
IV.5.1. En medio mínimo MMAB.....	110
IV.5.1.1. A nivel de crecimiento	110
IV.5.1.2. A nivel de biosíntesis de AIA	111
IV.5.2. En medio de cultivo nutricionalmente complejo	111
IV.5.2.1. A nivel de crecimiento	111
IV.5.2.2. A nivel de Biosíntesis de AIA.....	111
IV.5.2.3. Agregación celular, formación de Biofilms y producción de EPS.....	111
CAPÍTULO V: Análisis transcriptómico de <i>A. brasilense</i> Az39 expuesto a la luz.	112
V.1. La transcriptómica	113
V.1.1. El análisis transcriptómico.....	114
V.1.1.1. Construcción de la biblioteca de ARN-seq	117
V.1.1.2. Bioinformática asociada a la secuenciación de ARN	117
V.1.1.3. Nivel de transcripción ARN	117
V.1.1.4. Estudios transcriptómicos en <i>A. brasilense</i>	118
V.1.1.4.1. Mecanismos de promoción del crecimiento y expresión génica.	120
V.2. Materiales y Métodos.....	122
V.2.1. Preparación de la muestra.....	122
V.2.1.1. Extracción de ARN Total por el método Trizol®	122
V.2.1.2. Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN.....	123
V.2.1.3. Tratamiento con DNasa.....	123

V.2.1.4. Depleción de rRna.....	123
V.2.1.5. Construcción y secuenciamiento de las bibliotecas de cDNA	124
V.2.1.6. Análisis del Transcriptoma.....	124
V.3. Resultados	124
V.3.1. Análisis de la secuenciación masiva de ARN.....	124
V.3.1.1. Análisis de la expresión global de genes.....	124
V.3.1.2. Resumen de resultados del análisis transcriptómico.....	143
V.4. Discusión.....	147
V.5. Conclusiones	155
V.5.1. Expresión génica en la división celular y estrés biótico.....	155
V.5.2. Expresión génica de los fitocromos presentes en el genoma de Az39	156
V.5.3. Expresión génica en las rutas de biosíntesis de AIA.....	157
V.5.4. Expresión génica en quórum sensing (QS) flagelación y quimiotaxis.....	157
CAPÍTULO VI: Efecto de la luz sobre <i>A. brasilense</i> Az39 en interacción con <i>Arabidopsis thaliana</i>	159
VI.1. Producción de fitohormonas.	160
VI.1.1. Efectos de auxinas producidas por <i>Azospirillum</i> sp.: Un poco de historia.....	161
VI.1.1.1. La interacción <i>Azospirillum-Arabidopsis</i>	162
VI.2. Materiales y Métodos	163
VI.2.1. Ensayos de inoculación en <i>A. thaliana</i>	163
VI.2.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo.....	163
VI.2.1.2. Condiciones de cultivo de <i>A. brasilense</i> Az39.....	164
VI.2.1.2.1. Inoculación con concentraciones crecientes de células de Az39.....	164
VI.2.1.2.2. Aplicación exógena de concentraciones crecientes de AIA en <i>A. thaliana</i>	164
VI.2.1.2.3. Inoculación con Az39 y otras variantes genotípicas del género <i>Azospirillum</i>	164
VI.2.1.2.4. Efecto de la inoculación con Az39 expuesta a diferentes tipos de luz.....	165
VI.2.1.2.4.1. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio LB	165
VI.2.1.2.4.1.1. Sobrenadantes	166
VI.2.1.2.4.1.2. Fracción celular	167
VI.2.1.2.4.2. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio MS.....	167
VI.2.1.2.4.2.1. Sobrenadantes	168
VI.2.1.2.4.2.2. Fracción celular.....	168
VI.2.2. Análisis estadístico.....	169

VI.3. Resultados	169
VI.3.1. Evaluación del crecimiento de <i>A. thaliana</i> en medio MS	169
VI.3.1.2. Inoculación con concentraciones crecientes de AIA en el medio MS.....	172
VI.3.1.3. Efecto de la inoculación con Az39 y variantes genotípicas de <i>Azospirillum</i>	175
VI.3.1.4. Inoculación de <i>A. thaliana</i> con <i>A. brasilense</i> Az39	176
VI.3.1.4.1. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio LB	177
VI.3.1.4.2. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio MS	183
VI.3.1.4.2.1. Exposición de 8 h a diferentes longitudes de onda	183
VI.4. Discusión.....	186
VI.5. Conclusiones	190
V.5.1. A nivel de la interacción con <i>A. thaliana</i>	190
VI.5.2. Variantes genotípicas de <i>Azospirillum</i> sp.....	190
VI.5.3. Exposición de <i>Arabidopsis</i> a Az39 o a sobrenadantes de cultivos	191
CAPÍTULO VII: Discusión y Conclusiones generales	192
VII. 1. Discusión General	193
VII.2. Conclusiones Generales.....	200
1. A nivel genómico	200
2. A nivel funcional	200
2.1. Sobre las condiciones de cultivo en medio sólido:.....	200
2.2. Sobre las condiciones de cultivo en medio líquido:	201
3. A nivel del análisis transcriptómico.....	201
4. Condiciones de cultivo <i>in vivo</i> con <i>Arabidopsis thaliana</i>	202
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	203
NEXO.....	226
Anexo 1. Medio Luria Bertani [LB] (Luria Bertani, 1951)	226
Anexo 2. Medio LB Rojo Congo [LB-RC] (Molina et al., 2014)	226
Anexo 3. Medio Mínimo MMAB (Vanstockem et al., 1987).....	226
Anexo 4. Medio Mínimo Rojo Congo [MMAB-RC]	227
Anexo 5. Medio Swim	227

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género <i>Azospirillum</i>	4
Tabla 2. Análisis n-BLAST para determinar el porcentaje de identidad y homología de la secuencia codificante para “phyAz39-1” de Az39 con otras secuencias codificantes localizadas en el genoma de microorganismos de la misma especie o de otros géneros bacterianos.....	28
Tabla 3. Análisis n-BLAST para determinar el porcentaje de identidad y homología de la secuencia codificante para “phyAz39-2” de Az39 con otras secuencias codificantes localizadas en el genoma de microorganismos de la misma especie o de otros géneros.	29
Tabla 4. Análisis n-BLAST para determinar el porcentaje de identidad y homología de la secuencia codificante para bphO-Az39 de Az39 con otras secuencias codificantes localizadas en el genoma de microorganismos de la misma especie y género.....	30
Tabla 5. Distancias (cm) desde la fuente a la placa de cultivo y su equivalente en $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	48
Tabla 6. Análisis global de los genes diferencialmente expresados (inducidos y reprimidos) en <i>A. brasilense</i> Az39 en presencia de luz roja (PAR38), azul (PAR38) y blanca (75 W).	124
Tabla 7. Análisis global de los genes expresados diferencialmente (inducidos y reprimidos) en <i>A. brasilense</i> Az39 en presencia de luz roja (PAR38), azul (PAR38) y blanca (75w).....	125
Tabla 8. Resumen del comportamiento de los principales genes, que participan en el proceso de división celular en <i>A. brasilense</i> Az39.....	143
Tabla 9. Resumen del comportamiento de los principales genes que participan en la captación de luz y respuesta a estrés <i>A. brasilense</i> Az39.....	144
Tabla 10. Resumen del comportamiento de los principales genes, que participan en el proceso de quorum y biosíntesis de ácido indol-3-acético.	145
Tabla 11. Resumen del comportamiento de los principales genes, que participan en el proceso de quimiotaxis y biosíntesis flagelar.	146

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Colonias típicas de <i>A. brasilense</i> en medio RC donde las colonias se observan de color rojo escarlata, secas, y comúnmente con un aspecto rugoso.....	6
Figura 2. Aislamiento de colonias de Az39 en medio de cultivo LB-RC (Molina et al., 2014). Estas se observan de color rojo escarlata ya que absorben el indicador rojo congo del medio de cultivo. ...	7
Figura 3. Recuento de <i>Azospirillum brasilense</i> en medio LB-RC Derecha: recuento de colonias en medio LB-RC (Molina et al., 2014) por el método de microgota, donde las colonias se observan de color rojo escarlata, secas y a menudo con aspecto rugoso. Izquierda: detección de microorganismos contaminantes en medio LB-RC.....	8
Figura 4. Mapa génico de los 6 replicones del genoma de <i>A. brasilense</i> Az39 generados por CGView Comparison Tool. Los dos círculos externos muestran las secuencias codificantes, representadas por flechas azules, presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido. Los círculos interiores indican el contenido G+C relativo (en negro) y la desviación G+C (verde/morado) de cada uno de los elementos del genoma. C: crómido; P: plásmido	23
Figura 5. Resultado de la búsqueda por RAST en la que se reporta la secuencia codificante de una proteína del tipo fitocromo (EC 2.7.3.-), ubicada en el plásmido 4 del genoma de <i>A. brasilense</i> Az39.	27
Figura 6. Región cromosomal analizada para phyAz39-1. Las flechas de color rojo indican la secuencia codificante correspondiente a ésta proteína; mientras que la de color marrón indican la secuencia codificante para una diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa (Dominio GGDEF/ EAL) con sensores PAS/PAC. Finalmente, las flechas de color amarillo indican la secuencia de un regulador transcripcional (Familia TetR).....	27
Figura 7. Resultado de la búsqueda por RAST en la que se reporta la secuencia codificante de una proteína del tipo fitocromo (EC 2.7.3.-), ubicada en el plásmido 4 del genoma de <i>A. brasilense</i> Az39.	28
Figura 8. Región cromosomal analizada para el Fitocromo phyAz39-2. Las flechas de color rojo indican la secuencia codificante correspondiente a ésta proteína; mientras que la de color verde indica la secuencia de un regulador de respuesta de metales pesados de unión al ADN).	29
Figura 9. Resultado de la búsqueda por RAST en la que se reporta la secuencia codificante de una proteína del tipo bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (EC 2.7.3.-), ubicada en el plásmido 1 del genoma de <i>A. brasilense</i> Az39.	30
Figura 10. Región cromosomal analizada para el bacteriofitocromo BphO-Az39 de <i>A. brasilense</i> Az39. La flecha de color rojo indica la secuencia codificante correspondiente al bacteriofitocromo.	30
Figura 11. Análisis filogenético de una proteína del tipo fitocromo obtenido a partir del alineamiento múltiple de la secuencia de phyAz39-1. La filogenia fue inferida con el modelo de Poisson y el método de distancia Neighbor-Joining mediante el software MEGA7. Los números en los nodos representan el porcentaje del boot-straping con 1000 repeticiones.	31
Figura 12. Análisis Filogenético del fitocromo obtenido a partir del alineamiento múltiple de la secuencia phyAz39-2. La filogenia fue inferida con el modelo de Poisson y el método de distancia Neighbor-Joining mediante el software MEGA7. Los números en los nodos representan el porcentaje del boot-straping con 1000 repeticiones.....	32
Figura 13. Análisis filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple de la secuencia de la bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (bphO). La filogenia fue inferida con el modelo de Poisson y el método de distancia Neighbor-Joining mediante el software MEGA7. Los números en los nodos representan el porcentaje del boot- straping con 1000 repeticiones.	33

Figura 14. Evaluación de la capacidad de natación (swimming) de <i>A. brasilense</i> Az39. A la izquierda se observa una placa con medio de cultivo Swim envuelta en papel de aluminio, lo que representa el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad (control). A la derecha, se observa una placa sin envolver que será expuesta a una condición de luz. En ambos casos se indica el punto de siembra en la placa.	49
Figura 15. Evaluación de la capacidad fototáctica de <i>A. brasilense</i> Az39. A la izquierda se observa una placa con medio de cultivo Swim envuelta en papel de aluminio lo que representa el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad (control). A la derecha se observa una placa con el mismo medio de cultivo parcialmente cubierta y que será expuesta a la fuente lumínica. En ambos casos se indica el punto de siembra en la placa.	49
Figura 16. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml ⁻¹) en medio de cultivo LB-RC de <i>A. brasilense</i> Az39 expuesta a luz blanca (LB), roja PAR38 (LR), azul PAR38 (LA). En todos los casos el control fue mantenido en condiciones de Oscuridad (O). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar de un total de 4 repeticiones. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	50
Figura 17. Espectro de emisión de la fuente de luz roja a 650 nm [fila superior izquierda], luz azul a 450 nm [fila superior derecha] y luz blanca [fila Inferior]	51
Figura 18. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml ⁻¹) de <i>A. brasilense</i> Az39 en los medios MMAB, MMAB-RC, LB y LB-RC, y expuesto a los diferentes tipos de luz roja PAR38 (B), azul PAR38 (C) y blanca (D). En todos los casos el control fue en condiciones de Oscuridad (A) y los tratamientos fueron incubados por 72 h a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).....	53
Figura 19. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml ⁻¹) de <i>A. brasilense</i> Az39 en los medios LB y LB-RC al 50% y 25% (v/v) expuestos a luz roja PAR38 (B), azul PAR 38 (C) y blanca (D). En todos los casos el control fue desarrollado en condiciones de oscuridad (A). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm a la fuente. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).....	54
Figura 20. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml ⁻¹) de <i>A. brasilense</i> Az39 en medio de cultivo MMAB (AB) y MMAB-RC (AB-RC) modificados por la adición de 25%, 50% y 75% de medio LB (v/v) y expuestos a luz azul PAR38 (A) y blanca (B). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de la fuente de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).....	55
Figura 21. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml ⁻¹) de <i>A. brasilense</i> Az39 en medio de cultivo MMAB (AB) y MMAB-RC (AB-RC) modificados por la adición de 25%, 30%, 40%, 45% y 50% de medio LB (v/v) (A y B) y expuestos a luz blanca (75 W). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).....	56
Figura 22. Parte superior: MMAB modificado por la adición de un 30 % de medio LB. Inset: colonias definidas como L (lisas) y R (rugosas) en la misma dilución de siembra. Parte inferior: MMAB-RC modificado por la adición del 25% de medio LB. Inset: colonias L y R en la misma dilución de siembra. (Fuente lumínica: luz blanca)	58
Figura 23. Medio MMAB modificado por la adición de 25% de medio LB. Inset: colonias L de tamaños no uniforme en la misma dilución de siembra. (Fuente lumínica: luz azul).	59

- Figura 24.** Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en MMAB. Los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C. Las intensidades empleadas fueron 8, 11, 43 y 51 μ W/mm² para luz azul PAR38 (A) y 25, 56, 59,5 y 67 μ W/mm² para luz blanca (B). El control se mantuvo en condiciones de oscuridad. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 59
- Figura 25.** Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en medio MMAB, MMAB-RC, LB y LB-RC, expuesto a luz roja (B), luz azul (C) y luz blanca (D). En todos los casos el control se mantuvo en condiciones de oscuridad (A). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 28 °C y a una distancia de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 61
- Figura 26.** Crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en medio LB-RC, sometido a diferentes tiempos de exposición para cada fuente lumínica. En todos los casos el control se desarrolló en condiciones de oscuridad. Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm desde la fuente. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$). 62
- Figura 27.** Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en medios MMAB, MMAB-RC, LB y LBRC incubadas de manera vertidas (izquierda) en luz roja (A), azul (B) y blanca (C) e invertidas (derecha) en luz roja (D), azul (E) y blanca (F). En todos los casos el control se desarrolló en condiciones de oscuridad y presentó crecimiento. Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 64
- Figura 28.** (A) Determinación de movilidad a nivel de swimming en placas de *A. brasilense* Az39 expuestas a diferentes longitudes de onda. (B) Fotografía ilustrando el movimiento de swimming alcanzado por Az39 en luz blanca (LB), azul (LA), roja (LR) y oscuridad (O). La movilidad se midió como el diámetro de los halos de desplazamiento (en cm), luego de 72 horas de incubación a 36 ± 2 °C. En las barras se representa la media y el desvío estándar del desplazamiento. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a Tuckey ($p < 0,05$). 65
- Figura 29.** (A) Evaluación de la movilidad por natación o swimming mediada por una respuesta fototáctica en placas de *A. brasilense* Az39 expuestas a diferentes longitudes de onda. (B) Fotografía ilustrando el movimiento de swimming alcanzado por Az39 en placas parcialmente expuestas a luz blanca (LB), azul (LA), roja (LR) y oscuridad (O). La movilidad se midió como el diámetro de los halos de desplazamiento (en cm), luego de 72 horas de incubación a 36 ± 2 °C. En las barras se representa la media y el desvío estándar del desplazamiento. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a Tuckey ($p < 0,05$). 67
- Figura 30.** Células de *Azospirillum brasilense* unidas a una superficie de poliestireno unidas entre sí y al soporte inerte, se visualiza por Microscopio electrónico de barrido el material exopolimérico (MEP) excretado por las células (A). Células cultivadas estáticamente formando microcolonias, algunas de las cuales crecen perpendicularmente a la superficie (flecha) y probablemente formarán biopelículas estructuradas (B) 76
- Figura 31.** Representación esquemática de los estadios de formación del biofilms en *Azospirillum* sp., dentro de los que se destacan: asociación leve y débil al sustrato (1 y 2), agregación celular en microcolonias, seguido por la maduración de la biopelícula (3 y 4), y la formación de la biopelícula en la que se desprenden colonias y retornan a la vida planctónica transitoriamente y se dispersan (5). Imagen tomada y modificada de Salcedo et al., (2015). 77
- Figura 32.** Evaluación de la producción de biomasa (DO₅₉₅) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido MMAB modificado por la adición de L-trp (1 mg.ml⁻¹) expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de

36°C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).
 88

Figura 33. Evaluación del crecimiento ($\log_{10} \text{ufc.ml}^{-1}$) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido MMAB modificado por la adición de L-trp y expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36°C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 89

Figura 34. Evaluación de la concentración de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en *A. brasilense* Az39 en medio líquido MMAB modificado por la adición de L-trp y expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36°C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$). 90

Figura 35. Evaluación del crecimiento (DO_{595}) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 91

Figura 36. Evaluación del crecimiento ($\log_{10} \text{ufc.ml}^{-1}$) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 92

Figura 37. Evaluación de la síntesis de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24, 48 y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 94

Figura 38. Evaluación de la concentración de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en medio de cultivo líquido LB modificado por la adición de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de AIA expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 95

Figura 39. Evaluación de la síntesis de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en medio de cultivo inoculado con *A. brasilense* Az39 (A) o sin inocular (B), modificados por la adición exógena de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de (AIA) y 1 mg.ml^{-1} de L-trp, expuestos a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$). 97

Figura 40. Evaluación del porcentaje de agregación (%PA) en *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los

tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	100
Figura 41. Evaluación de la formación de biofilm en <i>A. brasilense</i> Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca (LB) (75 W); azul o (LA) (PAR38); roja o (LR) (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$).	101
Figura 42. Evaluación exopolisacáridos totales en <i>A. brasilense</i> Az39 medio líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca (LB) (75 W); azul (LA) (PAR38); roja (LR) (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	102
Figura 43. Pasos característicos de un experimento de ARN-Seq (Wang et al., 2009).	116
Figura 44. Diagrama de Venn representando genes expresados diferencialmente con un $p < 0,05$ en luz roja, azul y blanca. El número ubicado en los extremos de los círculos representa los genes únicos expresados en cada longitud de onda. Imagen generada con el software http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/	126
Figura 45. Diagrama de Venn representando genes reprimidos (A) y genes inducidos (B) de <i>A. brasilense</i> en condiciones de exposición a luz roja, azul y blanca con un fold-change $\geq \pm 1$. Imagen generada con el software http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/	128
Figura 46. Genes asociados al proceso de división celular, replicación cromosomal y defensa celular de Az39 que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB). Los genes fueron categorizados en clusters funcionales, de acuerdo a su función específica en el metabolismo de <i>A. brasilense</i> Az39.	131
Figura 47. Análisis basado en los valores de RPKM de genes que codifican para proteínas relacionadas con la captación de luz en Az39 que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).	132
Figura 48. Análisis basado en los valores de RPKM de genes implicados en respuesta a estrés de Az39 que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).	134
Figura 49. Análisis basado en los valores de RPKM de genes implicados en la biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).	136
Figura 50. Análisis basado en los valores de RPKM de genes implicados en el proceso de quórum que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) por exposición a luz roja (LR), Luz azul (LA) y Luz blanca (LB).	138
Figura 51. Análisis basado en los valores de RPKM de genes inducidos (A) y reprimidos (B) que participan en los procesos de quimiotaxis y movilidad celular, por exposición a luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB) en comparación con el control mantenido en condiciones de oscuridad.	140
Figura 52. Análisis basado en los valores de RPKM de genes que participan del proceso de biosíntesis flagelar en Az39 que fueron inducidos (Figura A) y reprimidos (Figura B) por exposición a Luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).	142
Figura 53. Esquema general del comportamiento de los genes que participan en la división celular y respuesta a estrés. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión. ...	156
Figura 54. Esquema general del comportamiento de los genes que participan en respuesta a la captación de luz. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión. ...	156

Figura 55. Esquema general del comportamiento de los genes que participan en diversas rutas de biosíntesis de AIA en Az39. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión.	157
Figura 56. Esquema general del comportamiento de los genes que participan QS, biosíntesis flagelar y quimiotaxis en Az39. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión.	158
Figura 57. Plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS (a) y en medio de cultivo MS modificado por la adición de 10^3 (b), 10^6 (c) y 10^8 ufc.ml ⁻¹ (d) de Az39 durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C.	169
Figura 58. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de <i>A. thaliana</i> en medio MS modificado por la inoculación con diferentes concentraciones de Az39 y cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p<0,05$).	171
Figura 59. Incremento en el número de raíces laterales y pelos radiculares en diferentes condiciones de crecimiento de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS [control] (a) y en medio de cultivo MS modificado por la adición 10^8 ufc.ml ⁻¹ de Az39 (b) cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C.	172
Figura 60. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS modificado por la adición exógena de diferentes concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA) y cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).	173
Figura 61. Promedio de raíces laterales de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS modificado por la adición exógena de 10 µg.ml ⁻¹ de AIA y 10^8 ufc.ml ⁻¹ y cultivadas por 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).	174
Figura 62. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS modificado por la adición exógena de diferentes cepas de Az39, y cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).	176
Figura 63. Evaluación de la síntesis de AIA (µg.ml ⁻¹) en <i>A. brasilense</i> Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 48 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p<0,05$).	177
Figura 64. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]), medio de cultivo MS control (C), sobrenadantes de cultivos expuestos a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y sobrenadante mantenido en condiciones de oscuridad (O) durante 48 horas. Cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C, durante 4-6 h. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p<0,05$).	179
Figura 65. Plántulas de <i>A. thaliana</i> , crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de medio de cultivo LB estéril (a), medio de cultivo MS [control] (b), sobrenadantes de cultivos expuestos a luz blanca (c), luz azul (d) y luz roja (e) durante 48 horas. Cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C, durante 4-6 días. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p<0,05$).	180

Figura 66. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]) , medio de cultivo MS control (C), células de cultivos expuestos a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y sobrenadante mantenido en condiciones de oscuridad (O) durante 48 horas. Cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C, durante 4-6 días. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).	182
Figura 67. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]) , medio de cultivo MS control (Agua), MS modificado por la adición de sobrenadante y expuesto a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y en condiciones de oscuridad (O), durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	184
Figura 68. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de <i>A. thaliana</i> en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]), medio de cultivo MS control (Agua), MS modificado por la adición de la bacteria y expuesto a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y en condiciones de oscuridad (O), durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media ± el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).	185
Figura 69. Esquema general del efecto de la luz en el crecimiento y desarrollo de Az39 y el efecto de la presencia de esta bacteria en interacción con <i>Arabidopsis thaliana</i>	199

RESUMEN

La luz es un factor ambiental necesario para el crecimiento de muchos organismos, principalmente aquellos fotosintéticos. Luego del descubrimiento de proteínas receptoras de luz en bacterias no fotosintéticas, surgió la incógnita acerca de la función que desempeñan estas proteínas en el metabolismo y estilo de vida de éste grupo de bacterias. Nuestra hipótesis de trabajo se basó en que la luz modifica el crecimiento y desarrollo de *Azospirillum brasilense* Az39, una de las cepas más utilizadas para la formulación de inoculantes en Argentina. Para validar esta hipótesis, se propuso, realizar un análisis genotípico y funcional del efecto de la luz en ésta bacteria. Inicialmente, se analizó el genoma de Az39 para la búsqueda de secuencias relacionadas con la respuesta bacteriana a la luz. En una segunda etapa de trabajo y en condiciones de cultivo *in vitro* la bacteria se cultivó en medio sólido, semi-sólido y líquido y expuesta a luz blanca 75W (LB), azul PAR38 (LA), roja PAR38 (LR) o mantenida en condiciones de oscuridad (O); para el caso del medio sólido, a temperaturas variables (28-36°C), diferentes distancias desde la fuente lumínica (10,18,24 y 28 cm) o intensidades, tiempos de exposición (2,4,8,12 y 24 h), medios de cultivo complejo (LB) y mínimo (MMAB). En el caso del medio semi-sólido se evaluó la movilidad (swimming) y en el caso del medio líquido la producción de biomasa (DO_{595} nm), el número de células ($ufc.ml^{-1}$), la producción de ácido indol-3-acético (AIA), el porcentaje de agregación celular (%PA), la formación de biofilms (DO_{560} nm) y la síntesis de exopolisacáridos (EPS). De manera complementaria, se realizó un análisis transcriptómico, mediante CLC de la bacteria expuesta a las diferentes condiciones de luz o mantenida en oscuridad y por último se correlacionó las respuestas de la bacteria a la exposición a diferentes luces a nivel del comportamiento de plántulas de *Arabidopsis thaliana* inoculadas. Nuestros resultados indican que Az39 contiene en su genoma 2 secuencias para la síntesis de proteínas del tipo fitocromo y una bacteriofitocromo Hemo-oxigenasa. En cultivo sólido, la exposición a LB y LA fue letal para el crecimiento de Az39, no así a la LR (similar al control); en medio nutricionalmente complejo, la bacteria fue menos tolerante a LB y LA mientras que a 28°C no creció en éste medio, ni tampoco en medio mínimo. A una distancia de la fuente de 10 y 18 cm, la bacteria no creció y 24 h de exposición a LB resultaron letales para la bacteria. En medio líquido, el crecimiento no resultó letal como en el medio sólido y la producción de AIA fue superior en LB en medio complejo. El %PA y la formación de biofilms, fue superior en LA, aunque aquí se observó la menor concentración de EPS. A nivel transcriptómico, la mayoría de genes que se sobre-expresaron por exposición a LB, estaban involucrados con procesos de división celular, estrés por calor o frío, quórum sensing y quenching, biosíntesis flagelar, etc.. La bacteriofitocromo hemo-oxigenasa, se indujo y el gen *ipdc* se reprimió, ambos en presencia de las 3 luces. Por último, a nivel *in planta*, se comprobó que concentraciones similares a 1.10^8 $ufc.ml^{-1}$ de Az39 o $10 \mu g.ml^{-1}$ de AIA, inducen un acortamiento de la raíz principal e incremento del número de raíces laterales en *A. thaliana*. Por otro lado, concentraciones cercanas a $20 \mu g.ml^{-1}$ disminuyen el último parámetro. El crecimiento y desarrollo de Az39 es afectado por LB y particularmente por LA y dicho comportamiento depende de las condiciones de cultivo a las que la bacteria es expuesta.

ABSTRACT

Light is an environmental factor necessary for some organisms growth, mainly photosynthetic ones. After the discovery of light receptor proteins in non-photosynthetic bacteria, the question arose about the function that they play these proteins in the metabolism and lifestyle of this group of bacteria. Our hypothesis was that light modifies the growth and development of *Azospirillum brasilense* Az39, one of the most used strains for the inoculants formulation in Argentina. To test this hypothesis, genotypic and functional analysis of the light effect on this bacterium was proposed. Initially, the Az39 genome was analyzed for the search of sequences related to the bacterial response to light. A second stage was under in vitro culture conditions. Az39 was cultured in solid, semi-solid and liquid medium. In each case, cultures were exposed to white light 75W (LB), blue PAR38 (LA), red PAR38 (LR) or maintained in dark conditions (O). Two different solid medium were tested: a complex media (LB) and minimum (MMAB). These culture were incubated at variable temperatures (28-36 ° C), different distances from the light source (10, 18, 24 and 28 cm), exposure times (2, 4, 8, 12 and 24 h). In semi solid condition, mobility (swimming) was evaluated. While, in liquid medium different parameters were tested: biomass production (OD595 nm), number of cells (ufc.ml⁻¹), indole-3-acetic acid (IAA) production, percentage of cellular aggregation (%PA), biofilms formation (OD₅₆₀ nm) and synthesis of exopolysaccharides (EPS). Additionally, a transcriptomic analysis was carried out, using CLC, in this experiment Az39 was exposed to different light conditions or kept in darkness. Finally, bacteria responses to exposure to different lights were correlated with inoculated *Arabidopsis thaliana* seedlings behavior. Our results indicate that Az39 contains in its genome 2 sequences for synthesis of phytochrome type proteins and a bacteriophytochrome Hemo-oxygenase. In solid culture, the exposure to LB and LA was lethal for the growth of Az39, not to the LR (similar to the control). In a nutritionally complex medium, Az39 were less tolerant to LB and LA, whereas at 28 °C they did not grow in this medium, this did not happen in minimum medium. Moreover, when distance from the source was 10 and 18 cm, this bacterium did not grow and 24 h of exposure to LB were lethal. In liquid medium, the growth was not lethal as in the solid medium and AIA production was higher in LB in complex medium. Besides %PA and biofilms formation was higher in LA. Although lower EPS concentration was observed here. At transcriptomic level, the majority of genes that were overexpressed by exposure to LB were involved with cell division processes, heat stress or cold, quorum sensing and quenching, flagellar biosynthesis, etc. Bacetrioifitochrome hemo-oxygenase, induced and the *ipdc* gene was repressed, both in the presence of the 3 lights. Finally, at the plant level, it was found that concentrations similar to 1.10⁸ cfu.ml⁻¹ of Az39 or 10 µg.ml⁻¹ of IAA induce shortening of the main root and increase in the number of lateral roots in *A. thaliana*. On the other hand, concentrations close to 20 µg.ml⁻¹ decrease the last parameter. The growth and development of Az39 is affected by LB and particularly by LA and said behavior depends on the culture conditions to which the bacterium is exposed.

GLOSARIO

Abreviación	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico copia
AIA	ácido indol-3-acético
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARN-seq	Secuenciación de ARN
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
BLUF	Sensor de luz azul (FAD)
Bph	Bacteriofitocromo
C	Carbono
CCD	Dispositivo de carga acoplada
CLB	Caldo Luria Bertani
cm	centímetros
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitocina trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleótido
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
DO	Densidad Óptima
dTTP	Desoxitimina trifosfato
EPS	Exopolisacáridos
FBN	Fijación Biológica del nitrógeno
FeCl ₃	Cloruro férrico
g/L	Gramos por litro
GLC	Cromatografía líquida gaseosa
h	Hora
ha	Hectárea

H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HK	Histidín Kinasa
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IBA	Ácido indol Butírico
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
IMyZA	Instituto de microbiología y Zoología Agrícola
IPyA	Indol-3-piruvato
KEEG	Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas
Kpb	Mil par de base
LB	Luria Bertani
LB-RC	Luria bertani con rojo congo
L-Trp	Triptófano
LOV	Sensor luz, oxígeno y voltaje
M	Molar
mg.ml ⁻¹	Miligramos por mililitro
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
N	Nitrógeno
NaOH	Hidróxido de Sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
Nfb	Caldo libre de nitrógeno (<i>Nitrogen-free broth</i>)
NGS	Secuenciación de segunda generación
nm	Nanometro
nt	Nucleótidos
O ₂	Oxígeno singlete
p/v	Peso en volumen
pb	Pares de base

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PF	Peso fresco
PFGE	Electroforesis en gel de campo pulsátil
PGPB	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal por control biológico
PGPR rizobacteria)	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (Plant Growth promoting rizobacteria)
PHB	poli- β -hidroxi-butirato
PHY	Fitocromo
PS	Peso seco
PSHR rizobacteria)	Rizobacterias Reguladoras de la homeostasis en plantas (Plant Stress Homeo- regulating rizobacteria)
PYP	Proteína fotoactiva amarilla
RC	Rojo Congo
RPKM	Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads
Rpm	Revoluciones por minuto
RR	Regulador de respuesta
UV	Radiación ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
WGS	Whole genome shotgun
A	Alfa
°C	Grados centígrados
μ l	Microlitro
μ l	microlitro

ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS

Para la descripción del trabajado realizado, esta tesis se ha estructurado en los capítulos que se describen a continuación:

Capítulo I. Introducción general, Hipótesis y Objetivos.

En este capítulo se presentan la introducción general y revisión bibliográfica acerca de bacterias no fotosintéticas y su capacidad de responder a estímulos lumínicos como así también al secuenciamiento del genoma de *Azospirillum brasilense* Az39. Además se presenta la hipótesis y objetivos de esta tesis doctoral.

Capítulo II. Análisis genómico y funcional del genoma de *Azospirillum brasilense* Az39

En este capítulo se presentan los resultados del análisis genómico y funcional de Az39, utilizando herramientas bioinformáticas, comparándolos con otras cepas del mismo género como así también especies. Dentro del análisis funcional, se detallan las secuencias del tipo receptoras de luz

Capítulo III. Comportamiento de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo sólido y semi-sólido expuesto a diferentes calidades de luz

En este tercer capítulo se presentan los resultados *in vitro* en medio de cultivo sólido (Diferentes medios de cultivos, Temperaturas de incubación, distancia a la fuente, Tiempo). También se analizó la capacidad de desplazamiento en las mismas condiciones de cultivo

Capítulo IV. Comportamiento de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido y expuesto diferentes calidades de luz.

En este capítulo se presentan los resultados *in vitro* en medio de cultivo líquido (Producción de biomasa, Recuento celular por mililitro, Producción de ácido indol-3-acético, Porcentaje de Agregación, Producción de Biofilm, Exopolisacáridos totales)

Capítulo V. Análisis transcriptómico de *A. brasilense* Az39 expuesto a la luz.

En este capítulo se presentan los resultados de la evaluación de la transcriptómica durante el crecimiento de Az39 expuesto a Luz blanca (75 W), luz azul y roja PAR38 y el control mantenido en condiciones de oscuridad y el posterior análisis de la expresión de los genes de interés.

Capítulo VI. Efecto de la luz sobre *A. brasilense* Az39 en interacción con *Arabidopsis thaliana*

En este capítulo se presentan los resultados *in vivo* de la inoculación con Az39 (bacteria o sobrenadante) a nivel radicular

Capítulo VII. Discusión y conclusiones generales

En este capítulo se hace una discusión general de los resultados más relevantes obtenidos de esta tesis doctoral.

CAPÍTULO I: Introducción general

I.1. Introducción general

El suelo es un soporte natural que alberga un sinnúmero de organismos superiores y microorganismos. Se utiliza el término rizósfera para describir la parte del suelo que se encuentra en contacto directo con las raíces de las plantas, de la que a su vez, se induce el desarrollo de microorganismos por la presencia de exudados radicales (Gárate y Bonilla, 2000). Las bacterias de la rizósfera, denominadas rizobacterias, poseen capacidad de colonizar el interior o exterior de las raíces de muchas especies vegetales y se pueden separar entre las que forman una relación simbiótica con la planta y las que no lo hacen, denominadas de *vida libre*, que se asocian de manera mutualista cerca o sobre las raíces como bacterias epifíticas o dentro de ellas como endofíticas (Kloepper et al., 1989). Cuando las bacterias de *vida libre* se consideran benéficas para el crecimiento de las plantas se las denomina de manera general rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria), (Kloepper et al., 1993). Bashan y Holguin (1998) introdujeron un nuevo concepto que divide este grupo entre las PGPR, que promueven el crecimiento mediante mecanismos directos sobre las plantas y las bacterias promotoras del crecimiento por biocontrol o Biocontrol-PGPR (del inglés, Biocontrol-Plant Growth Promoting Rhizobacteria) que promueven el crecimiento por mecanismos indirectos. Cassán et al., (2009) sugirieron la existencia de un tercer grupo relacionado con expresión de mecanismos bacterianos para la mitigación del estrés abiótico en plantas, denominado PSHR (del inglés, Plant Stress Homeo-regulating rhizobacteria) o reguladoras de la homeostasis en condiciones de estrés abiótico.

La identificación y posible manipulación de las asociaciones entre PGPR y plantas superiores, ha sido considerada una estrategia fundamental para la agricultura en los últimos 40 años (Díaz-Zorita et al., 2008). Entre las asociaciones más exitosas de la naturaleza se destacan las de leguminosas con bacterias simbiotes de los géneros *Bradyrhizobium* o *Ensifer* (ex-*Sinorhizobium*) y la asociación benéfica entre gramíneas y bacterias de *vida libre* de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, (Döbereiner y Pedroza, 1987). La bibliografía en general considera a *Azospirillum* sp., como uno de los géneros bacterianos más importantes responsables de mejorar significativamente el crecimiento y desarrollo, así como el rendimiento de numerosas especies cultivables y de importancia agroecológica en todo el mundo (Okon, 1985; Baldani et al., 1987).

Aun cuando *Spirillum lipoferum* fue descrito por Beijerinck en 1925, esta bacteria perteneciente a la subclase de las α -proteobacterias (Young, 1992) estuvo olvidada por varias décadas. Fueron las observaciones posteriores realizadas por Peña-Cabriales y Döbereiner en 1976 (Döbereiner et al., 1976) las que iniciarían la época moderna del estudio de este microorganismo. Estudios taxonómicos de *S. lipoferum* (Krieg et al., 1977) condujeron a su posterior reclasificación en un nuevo género, denominado en la actualidad como *Azospirillum* (Tarrand et al., 1979). Desde su re-descubrimiento, y a lo largo de varias décadas, este género ha sido uno de los más caracterizados entre las rizobacterias asociadas a plantas y el más empleado con fines agrícolas para especies no-leguminosas en varios países del mundo. Desde el punto de vista taxonómico, en la actualidad *Azospirillum* incluye 20 especies que se detallan a continuación en la Tabla 1:

Tabla 1. Especies del género *Azospirillum*

Género- especie	Referencias
<i>Azospirillum brasilense</i>	Tarrand et al., 1979
<i>Azospirillum lipoferum</i>	Beijerinck 1925; Tarrand et al., 1979
<i>Azospirillum largimobile</i>	Skerman et al., 1983; Ben Dekhil et al., 1997
<i>Azospirillum halopraeferens</i>	Reinhold et al., 1987
<i>Azospirillum massiliensis</i>	Murray y Stackebrandt (1995)
<i>Azospirillum doebereineriae</i>	Eckert et al., 2001
<i>Azospirillum oryzae</i>	Xie y Yokota 2005
<i>Azospirillum melinis</i>	Peng et al., 2006
<i>Azospirillum canadense</i>	Mehnaz et al., 2007
<i>Azospirillum zea</i>	Mehnaz et al., 2007
<i>Azospirillum rugosum</i>	Young et al., 2008
<i>Azospirillum palatum</i>	Zhou et al., 2009
<i>Azospirillum picis</i>	Lin et al., 2009
<i>Azospirillum thiophilum</i>	Lavrinenko et al., 2010
<i>Azospirillum formosense</i>	Lin et al., 2012
<i>Azospirillum fermentarium</i>	Lin et al., 2013
<i>Azospirillum humicireducens</i>	Zhou et al., 2013
<i>Azospirillum himalayense</i>	Tyagi y Singh 2014
<i>Azospirillum soli</i>	Lin et al., 2015
<i>Azospirillum agricola</i>	Lin et al., 2016

**Azospirillum massiliensis*: especie candidata

Del total de especies del género *Azospirillum* descritas hasta el momento, se encuentran fijadoras y no fijadoras de nitrógeno. En la actualidad, las dos especies más estudiadas son aquellas inicialmente descritas, *A. lipoferum* y *A. brasilense*; sin embargo, *A. brasilense* es la única utilizada en América del Sur para la formulación de inoculantes destinados al tratamiento de diversos cultivos de interés agronómico (Cassán y Díaz-Zorita, 2016).

I.1.1. Características morfo-fisiológicas del género

Son bacterias gramnegativas o gram variables que miden aproximadamente 0,6-1,7 x 2,1-3,8 μm , y a menudo presentan extremos puntiagudos. *Azospirillum* sp. produce y acumula gránulos intracelulares de poli- β -hidroxibutirato (PHB) empleados por la propia célula como fuente de carbono y energía durante períodos de inanición. El PHB puede constituir desde el 25 al 50% del peso seco de las células cultivadas en medio sin nitrógeno. En células cultivadas con sales de amonio como única fuente de nitrógeno, el polímero constituye sólo 0,5-1,0% del peso de la célula (Okon et al., 1976). La morfología de las células depende de las condiciones nutricionales y de la edad del cultivo; se observan formas vibroides de 0,8-1,0 x 2,0-5,0 μm de tamaño, y se asocia además la aparición de formas quísticas o formas C, como vía de resistencia a las condiciones de estrés ambiental y del mismo modo como mecanismo de supervivencia en la rizósfera (Bashan et al., 1991). También esto puede ocurrir en medios alcalinos, en presencia de condiciones de exceso de oxígeno o de algún otro tipo de estrés. Son microorganismos móviles en medios líquidos por un solo flagelo polar. En medios de cultivos de consistencia sólida a 30 °C, en cambio se identifican numerosos flagelos laterales de menor longitud. Crece bien en presencia de oxígeno y una fuente de nitrógeno (como sales de amonio o glutamato) y se caracterizan por la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en condiciones de microaerofilia en *vida libre* (diazotrofismo). Son microorganismos no fotosintéticos, es decir que carecen de maquinaria metabólica que le permita llevar a cabo el proceso de fotosíntesis; sin embargo estudios preliminares *in silico* (Rivera et al., 2014) revelan la presencia de proteínas receptoras de luz que podrían tener un rol específico en el estilo de vida de esta bacteria. *Azospirillum* sp. presenta principalmente un metabolismo aeróbico (reacción de la enzima oxidasa positiva), es decir, posee como aceptor final de electrones al oxígeno, aunque algunas cepas, en cambio, utilizan otras moléculas, tales como nitrato o nitrito. La temperatura óptima para el crecimiento varía en un rango de 33-41 °C y el pH de 5,5 a 7,5. Crece bien en presencia de sales de ácidos orgánicos, tales como el malato, succinato, lactato o piruvato. También puede utilizar la D-fructosa y ciertos carbohidratos como fuentes alternativas de carbono y algunas especies como *A. lipoferum*, requieren además, de biotina como factor de crecimiento.

I.1.1.1. Aislamiento e identificación.

El aislamiento de los individuos de este género, ha resultado por lo general muy simple a partir de muestras complejas, tales como suelo rizosférico, superficie de raíces o rizoplaneo, o inclusive desde el interior de los tejidos vegetales. El medio de cultivo universalmente utilizado para el enriquecimiento de *Azospirillum* sp. a partir de muestras complejas, es el Nfb (del inglés *Nitrogen-free broth*), como su nombre lo indica, libre de nitrógeno, semi-agarificado y con adición de malato o ácido L-málico como única fuente de carbono para favorecer el carácter diazotrófico de los microorganismos (Döbereiner, 1976); sin embargo, en este medio se aíslan predominantemente las especies *A. lipoferum* y *A. brasilense*. Una variante metodológica para el aislamiento e identificación de *Azospirillum* sp. surgió en Argentina en la década de los 80 y se basó en la utilización del medio RC (Rojo Congo) cuyas fuentes nutricionales se asemejan al medio NFb desarrollado por Döbereiner, (1976), pero en el que las colonias de *Azospirillum* sp. toman un color rojo escarlata debido a la presencia del indicador rojo congo, que permite una clara diferenciación con respecto a otros géneros bacterianos incapaces de tomar este indicador (Rodríguez-Cáseres, 1982). La limitación de este medio desde el punto de vista del control de calidad de productos comerciales formulados con ésta bacteria, radica en que al ser un medio de composición definida, los microorganismos contaminantes están limitados para crecer debido a la fuente de carbono propuesta (L-málico) lo que dificulta verificar su presencia por el desarrollo de la colonia, su color y morfología.

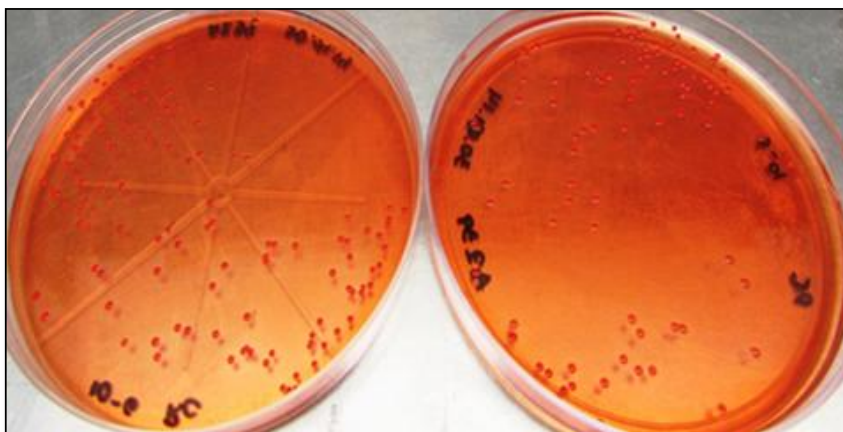


Figura 1. Colonias típicas de *A. brasilense* en medio RC donde las colonias se observan de color rojo escarlata, secas, y comúnmente con un aspecto rugoso.

Recientemente, Molina et al., (2014) propusieron la utilización de un medio de cultivo de fácil preparación, que permite integrar el procedimiento de recuento de *A. brasilense* con la identificación de microorganismos contaminantes en una misma secuencia de trabajo, sobre la base de la utilización del medio LB (Bertani, 1951) modificado por la adición del indicador Rojo Congo (LB-RC). Este medio ofrece dos ventajas considerables con respecto al medio Rojo-Congo (RC), considerado selectivo y diferencial para el género *Azospirillum*: es de fácil preparación y no es selectivo para contaminantes, por lo que permite el desarrollo de microorganismos de este tipo con mayores requerimientos nutricionales.



Figura 2. Aislamiento de colonias de Az39 en medio de cultivo LB-RC (Molina et al., 2014). Estas se observan de color rojo escarlata ya que absorben el indicador rojo congo del medio de cultivo.

A continuación en la Figura 3, se observa el crecimiento de contaminantes presentes en cultivos de *Azospirillum* sp. crecidos en medio de cultivo LB-RC. La visualización de éstos resulta simple y rápido.

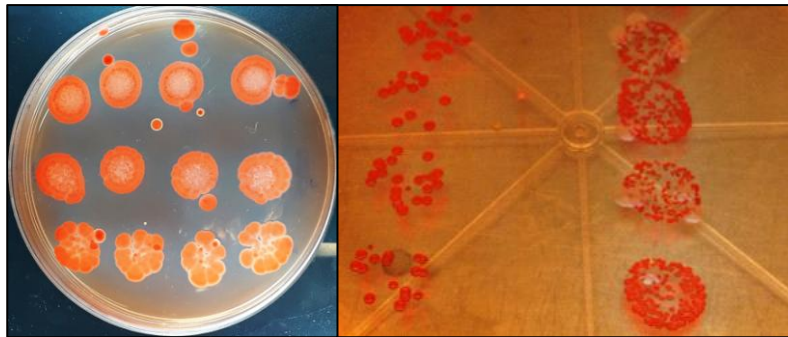


Figura 3. Recuento de *Azospirillum brasilense* en medio LB-RC Derecha: recuento de colonias en medio LB-RC (Molina et al., 2014) por el método de microgota, donde las colonias se observan de color rojo escarlata, secas y a menudo con aspecto rugoso. Izquierda: detección de microorganismos contaminantes en medio LB-RC.

I.1.1.2. *A. brasilense* Az39

A. brasilense Az39 fue aislada en la localidad de Marcos Juárez, Córdoba (Argentina) en la década del 80 por el Ingeniero Agrónomo Enrique Rodríguez Cáseres, dentro de los que se consideró un programa para la identificación de microorganismos de potencial uso en Agricultura del INTA. Así, fue seleccionada dentro de un centenar, como una de las cepas más efectivas para incrementar el rendimiento y productividad de trigo, sorgo y maíz en diferentes condiciones agronómicas de nuestro país y con un rendimiento promedio entre el 10-30% superior a los controles sin inocular. A partir de éstos ensayos, Az39 fue recomendada por el SENASA y por numerosas empresas nacionales de bioinsumos para la formulación de inoculantes. Debido a esto, se ha convertido en una cepa modelo y de crucial importancia para el desarrollo de más investigaciones enfocadas al análisis genómico y funcional (Rivera et al., 2014). Desde el punto de vista fisiológico, los mecanismos responsables de la promoción del crecimiento vegetal han sido evaluados por Perrig et al., (2007) y dentro de los mecanismos identificados se considera que la fijación biológica de nitrógeno y la producción de fitohormonas, entre ellas las pertenecientes al grupo de las auxinas serían los de mayor importancia comparativa. En experimentos posteriores, Cassán et al., (2009) establecieron la capacidad de ésta bacteria para promover la germinación y crecimiento temprano de semillas de trigo, soja y maíz como parte de una respuesta fitoestimuladora a la inoculación.

I.1.1.3. Inoculantes formulados con *A. brasilense* Az39

Transcurridas más de cuatro décadas desde su aislamiento, selección y recomendación para la formulación de inoculantes, *A. brasilense* Az39 ha demostrado una gran capacidad para cumplir con la premisa por la que fue seleccionada y por ello ha sido adoptada mayoritariamente por la industria nacional para la formulación de inoculantes destinados a una gran variedad de cultivos, pero fundamentalmente maíz, trigo y soja, en este último caso, en sistemas de co-inoculación. Reportes de Micucci (2010) determinaron un incremento

promedio del 7.0 % [aprox. 500 kg.ha⁻¹] en el rendimiento de maíz inoculado con Az39 después de 8 campañas de cultivo y en más de 150 sitios experimentales de Argentina, con una frecuencia de éxito superior al 80 % de los casos. El mercado mundial de inoculantes crece con una tasa sostenida cercana al 10 % por año con una expectativa de alcanzar los \$ 1.295 millones en el 2020 (Transparency Market Research, 2014). En América del Sur, existen 104 productos biológicos que contienen *Azospirillum* sp. disponibles para su comercialización en la región. La producción se realiza para más de 50 empresas y se formula principalmente en estado líquido. La mayoría de ellos se producen en Argentina (85 productos) y solo dieciséis (16) en Brasil, dos (2) en Uruguay y uno (1) en Paraguay. Todos los productos disponibles para su comercialización en el mercado argentino se producen en Argentina, pero en Brasil y Uruguay, los productos se fabrican a nivel local o se importan de Argentina. En Paraguay, la producción se produce localmente y también se importa de Argentina y Brasil. La cepa Az39 de *A. brasilense*, es el principio activo en el 65% (68 productos) de uso general. Además, *A. brasilense* es el único producto utilizado para la formulación de inoculantes en América del Sur. Aunque se han recomendado 13 cultivos para el uso de estos productos biológicos, principalmente se aplica en cultivos de maíz (73 productos) y trigo (64 productos). Sorgo (*Sorghum bicolor*) (29), girasol (13), soja (7), gramíneas y cereales de invierno para pastoreo (4), arroz (3), cebada (3), algodón (*Gossypium hirsutum*) (3), avena (*Avena sativa*) (2), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (1), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (1) y lechuga (*Lactuca sativa*) (1), también son el resto de los cultivos en los que se aplican estos productos comerciales que contienen *A. brasilense*. Según los datos de 2014, se comercializaron aproximadamente 3.0 millones de dosis de inoculantes de azospirilla que cubren casi 3.0 millones de ha en Sudamérica. En Argentina, estos productos son más utilizados para la producción de cultivos de trigo y también en combinación con los inoculantes de rizobios para la producción de soja (Cassan y Días-Zorita, 2016).

I.1.2. El secuenciamiento genómico

En los últimos 40 años, el avance de tecnologías de secuenciación ha permitido el estudio y comprensión de los genomas de diferentes seres vivos. Han surgido diferentes tecnologías de secuenciación buscando el desarrollo de nuevas estrategias que permitan la secuenciación del ADN con una mayor resolución hasta la obtención del genoma completo (Feng et al., 2015).

El “método Sanger” (Sanger y Coulson, 1975), fue la primer estrategia que se utilizó para el secuenciamiento genómico. Esta técnica, además de ser revolucionaria permitió el desarrollo del Proyecto Genoma Humano y además, la evolución de las técnicas de secuenciación, como las tecnologías de "segunda generación" entre las que se destacan la Pirosecuenciación 454 (Roche), Solexa (Illumina) y SOLiD (Applied Biosystems). Estas tecnologías se basan en el principio de la amplificación por PCR en emulsión de fragmentos de ADN, para hacer que la señal luminosa sea detectada por cámaras de carga acoplada. La secuenciación 454 Roche, fue la tecnología utilizada para secuenciar el genoma de *A. brasilense* Az39.

I.1.2.1. Genomas bacterianos y secuenciación

La secuenciación de los genomas de organismos procariontes, ha ido aumentando en los últimos años debido a que ha disminuido considerablemente el costo de la tecnología (Liao et al., 2015); sin embargo, aunque accesible no es un trabajo sencillo debido a que un proyecto de secuenciación requiere de controles de calidad y medidas de pre-procesamiento, ensamblaje de novo y/o ensamblaje basado en referencia, anotación automatizada con o sin mejora manual y mejora de la calidad del genoma. Existen actualmente, una variedad de herramientas bioinformáticas para realizar el ensamblaje, la anotación y la mejora del genoma (Koren et al., 2014; Magoc et al., 2013; Seemann, 2014; Swain et al., 2012). Depende de la experiencia y herramientas bioinformáticas disponibles que los científicos puedan lograr resultados significativos (Nocq et al., 2013). A la fecha, los proyectos de secuenciación de procariontes son: 16.736 proyectos completos y publicados, 174.300 son borradores permanentes, 85.358 son proyectos incompletos y 1097 son proyectos targets (<https://gold.jgi.doe.gov/>).

I.1.2.2. Análisis genómico de *A. brasilense* Az39

En el año 2012, nuestro laboratorio, lideró un consorcio internacional para la secuenciación del genoma de *A. brasilense* Az39. Éste proyecto finalizó con la obtención de la secuencia completa de tal genoma en el año 2014 (Rivera et al., 2014) Los resultados obtenidos permitieron estimar un tamaño del genoma de 7.39 Mpb con 6410 secuencias distribuidas en 6 replicones (un cromosoma, tres crómidos y dos plásmidos). La secuencia completa del genoma fue depositada en NCBI-Gen Bank con el número de acceso CP007793 para el cromosoma y CP007794-98 para los otros 5 replicones. Mediante el uso de herramientas

comparativas del tipo RAST (Aziz et al., 2008) y KEGG (Kanehisa et al., 2004) se comprobó la presencia de genes asociados a diversos mecanismos de promoción del crecimiento, tales como la fijación biológica de nitrógeno, la biosíntesis de biofilms y sistemas de secreción Tipo I, II y VI, así como la biosíntesis de fitohormonas y entre ellas el ácido indol-3-acético (AIA). El análisis *in silico*, además determinó la presencia de secuencias codificantes para proteínas receptoras de luz que podrían tener un rol específico en el estilo de vida de esta bacteria.

I.1.3. La luz en la naturaleza

La luz es una fuerza impulsora de la vida en el planeta tierra, pero también es una amenaza para la supervivencia de los organismos aeróbicos, debido a su efecto fotodinámico. Es una importante fuente de energía y por ello, existen ciertos procesos en la naturaleza que han evolucionado, fundamentalmente en los organismos fototróficos, con el fin de regular la recolección y conversión de la energía lumínica en energía metabólica, como ocurre en la fotosíntesis. Sin embargo, este factor ambiental, esencial para la vida, es también una amenaza para ella, debido a los efectos nocivos sobre ácidos nucleicos y proteínas o el daño fotoquímico directo sobre diversos componentes celulares que determina la interrupción del ciclo de vida. En presencia de luz, es posible la formación incidental de oxígeno singlete (O_2), una especie reactiva de oxígeno; tanto en células fotosintéticas, como así también en células no fotosintéticas, debido a la presencia simultánea de luz, oxígeno y compuestos fotosensibilizadores, lo que provoca un estado de estrés foto-oxidativo sobre las células. Así, considerando que la luz puede dañar gravemente estas estructuras, es importante para ellas y en general para los organismos detectar y responder apropiadamente a la presencia de luz. Los efectos nocivos se relacionan normalmente con la radiación electromagnética de alta energía y por lo tanto son más significativos en la región del ultravioleta (UV) y la parte azul del espectro de la luz solar.

I.1.3.1. El efecto de la luz en bacterias.

Como se dijo anteriormente, la luz, además de ser la fuente de energía más importante de la biosfera, es en sí misma una señal esencial que controla el crecimiento, desarrollo y comportamiento de muchos organismos. Es un componente ambiental dominante de muchos hábitats, tanto terrestres como acuáticos y puede condicionar la continuidad de la vida en un

determinado ambiente. Dentro de los procariotas, existen bacterias que no dependen energéticamente de la presencia de luz para vivir y otras que al igual que ocurre en las plantas superiores, que si dependen y que son capaces de llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis y por ello se denominan bacterias fotosintéticas. Las que forman parte de este grupo, realizan la fotosíntesis anoxigénica, poseen bacterioclorofilas a/b y carotenoides que proporcionan color marrón, púrpura, rojo, su aparato fotosintético se localiza en cromatóforos y obtienen energía por fotofosforilación. Se dividen en dos grupos dependiendo del donador de electrones: del Azufre y no del Azufre, de las que podemos mencionar como géneros representativos: *Ectothiorhodospira*, *Thiospirillum*, *Chromatium*, *Rhodospirillum*, *Rhodobacter*. Con respecto a las bacterias no fotosintéticas, carecen de un aparato fotosintético verdadero, por lo que la luz se considera para estos microorganismos, como una señal ambiental o una importante amenaza, ya que puede ser letal en la mayoría de los casos.

I.1.3.2. Estrategias bacterianas relacionadas con la captación de luz.

Los procariotas ocupan micro-hábitats que difieren en la cantidad y calidad de exposición a la luz; por lo tanto, sus sistemas fotosensores pueden optimizarse para detectar o capturar la luz en el espectro disponible para ellos (Kiang et al., 2007). Casi todas las proteínas fotorreceptoras tienen una estructura modular con uno o más dominios de entrada y de salida. El dominio de entrada se une a un cofactor o cromóforo para dar lugar a una molécula que absorbe la radiación UV y/o la luz visible. El dominio de salida puede ser enzimático, de unión a proteínas o al ADN. Las bacterias fotosintéticas tienen tanto un aparato fotosintético que convierte luz en energía química, como proteínas fotorreceptoras capaces de sensar la intensidad y longitud de onda de la luz, y transducir esta información a múltiples vías celulares. A partir del análisis de la secuencia de los genomas bacterianos se descubrió que los fotorreceptores están presentes en una gran cantidad de bacterias no fotosintéticas, además de aquellas con tal capacidad (Purcell y Crosson, 2008; van der Horst et al., 2007). Los fotorreceptores presentes en estos microorganismos pueden clasificarse, de acuerdo a la secuencia de aminoácidos y el cromóforo asociado, en seis familias: dominios PHY o fitocromo (tetrapirrol lineal), dominios LOV (flavinas), dominios BLUF (flavinas), PYP o proteína amarilla fotoactiva (photoactive yellow protein) (ácido p-cumárico) y rodopsinas sensoriales (retinoides). Aunque múltiples proteínas fotosensoras podrían estar integradas en

una sola red de transducción de señales, como se mostró recientemente para dos proteínas de respuesta a luz azul que regulan genes involucrados en la fotosíntesis en *Rhodobacter sphaeroides*, éste hecho no se ha demostrado todavía para otras proteínas fotosensoras en procariotas (Metz et al., 2012). Los fotorreceptores más abundantes en bacterias son los del tipo fitocromo. Estas proteínas se unen covalentemente a un cromóforo del tipo bilina-, permitiendo así la detección de luz rojo o rojo lejano (Bhoo et al., 2001). Los fitocromos se han encontrado en el 17% de todos los genomas bacterianos secuenciados (Gomelsky et al., 2011). Los fitocromos de las plantas y cianobacterias generalmente se unen a la fotocromobilina y a la fitocianobilina, respectivamente; mientras que los fitocromos bacterianos o bacteriofitocromos se unen a la biliverdina (Smith, 2000; Yeh et al., 1997). Los bacteriofitocromos conocidos hasta ahora exhiben un fotocromismo al rojo exclusivamente o rojo lejano, generándose fotoconversión reversible entre dos conformaciones estables, una forma Pr-que absorbe luz rojo y una forma Pfr que absorbe luz rojo-lejano. La mayoría de los fitocromos bacterianos tienen un Dominio C-terminal de histidina quinasa fusionado a otro de unión a biliverdina en el N-terminal (Metz et al., 2012).

I.1.3.3. El rol de los fotorreceptores en bacterias.

A partir de la era post-genómica en procariotas, el inesperado descubrimiento de los fotorreceptores en ciertos grupos de bacterias, llevó a una activa búsqueda sobre la función que cumplen los mismos en el metabolismo y estilo de vida bacteriano; sin embargo, las funciones biológicas y de regulación de las proteínas fotosensoras son poco conocidas para la mayoría de las bacterias no fotosintéticas. En el caso del patógeno foliar *Pseudomonas syringae*, se conoce que presenta tres genes que codifican proteínas fotosensoras, LOV histidina quinasa (LOV-HK) y dos bacteriofitocromos sensores de luz rojo/rojo lejano, BphP1 y BphP2 (Swartz et al., 2007), pero aún así el rol de la luz en el ciclo de vida de este patógeno no se ha establecido todavía, aunque se piensa que este factor ambiental podría proporcionar claves para el movimiento y la reubicación, la supervivencia, e incluso relacionado con la capacidad de virulencia de esta bacteria. Para el caso de *Deinococcus radiodurans*, el bacteriofitocromo, regula la síntesis de un pigmento cuya función se cree es la de proteger las células del daño celular inducido en una condición de estrés lumínico; mientras que un bacteriofitocromo de *Pseudomonas aeruginosa* fue asociado a un rol similar en condiciones de estrés térmico

(Barkovits et al., 2011). Por otro lado, se ha encontrado que entre los fitocromos presentes en bacterias fotosintéticas anoxigénicas, el rol de estas moléculas sería el de activar un interruptor entre la fotosíntesis y el metabolismo respiratorio, regulando así la producción de sistemas fotosintéticos y la síntesis de los sistemas captadores de luz. En cianobacterias, las proteínas Cph2 y Cph1, regulan la tasa de crecimiento con luz roja y roja lejana respectivamente, mientras que Cph2 puede inhibir la fototaxis hacia luz azul (Fiedler et al., 2004). Las cianobacterias también tienen fitocromos del tipo cianobacteriocromo, capaces de regular la producción de pigmentos y la fototaxis. La caracterización de la vía de transducción de señales asociada a LOV-HK muestra que esta proteína señala un sistema de respuesta a estrés presente en todas las α -proteobacterias. Estudios alcanzados en dos alfa-proteobacterias, han revelado resultados sorprendentes. En *Brucella* la luz activa a un fotoreceptor histidina quinasa del tipo LOV (LOV-HK) que regula la virulencia de la bacteria (Swartz et al., 2007). Al mismo tiempo en *R. leguminosarum* la luz inhibe la síntesis de EPS y las proteínas flagelares afectando la capacidad de la bacteria para formar biofilm e incrementado la formación de nódulos productivos en raíces de plantas de arveja (Bonomi et al., 2012). Otros grupos han reportaron resultados similares mostrando que la luz afecta la movilidad, adhesión y virulencia en diversas bacterias relacionadas con las plantas como *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringae* y *Xanthomonas campestris* (Oberpichler et al., 2008; Wu et al., 2013; Kraiselburd et al., 2012).

1.1.3.3.1. Fotoreceptores en *Azospirillum* sp.

El descubrimiento de las proteínas fotorreceptoras en bacterias no fotosintéticas, y su capacidad para detectar y responder a la luz, ha generado incógnitas, que no se han resuelto dentro de la fotobiología. Aunque el efecto de la luz roja en la fisiología de los procariontes fotosintéticos es bien conocido, hay muy poca información sobre el efecto de luz roja en bacterias no fotosintéticas. *A. brasilense* es una bacteria no fotosintética perteneciente a la familia *Rhodospirillaceae*. La secuencia del genoma de diferentes cepas de *A. brasilense* muestra la presencia de 2 genes capaces de codificar proteínas del tipo PHY o bacteriofitocromo (Wisniewski-Dyé et al., 2012; Rivera et al., 2014). Luego del primer reporte sobre el rol del bacteriofitocromo en una bacteria no-fotosintética por Davis et al., (1999), Kumar et al., (2012) publicaron el segundo reporte en una cepa de ese género, en *A. brasilense*

Sp7 en el que describieron un posible rol del bacteriofitocromo sobre la respuesta bacteriana a estrés fotodinámico inducido por luz roja. Similares resultados fueron descritos previamente en *Deinococcus radiodurans* (Davis et al., 1999) donde el bacteriofitocromo estaba involucrado en el proceso de mitigación a estrés a través de la síntesis de carotenoides, pero a diferencia de lo que ocurrió en este microorganismo, en el caso de *A. brasilense* Sp7 no estaría relacionado con la inducción de la biosíntesis de tales compuestos. Con excepción de los trabajos aquí mencionados, no existen otros reportes disponibles que asocien el efecto de diferentes tipos de luz sobre el crecimiento, desarrollo y estilo de vida de *Azospirillum*, por lo que se podría considerar una línea de trabajo poco desarrollada hasta la fecha.

En resumen, podemos decir que a pesar de la inmensa cantidad de información disponible sobre el género *Azospirillum* en la bibliografía, sabemos muy poco sobre la base molecular y genómica que determina la capacidad de esta bacteria para adaptarse a las condiciones ambientales relacionadas con la luz, sobre todo en asociación con plantas superiores y así mantener su estilo de vida y/o promover su crecimiento. Sobre la base de estos antecedentes, hemos propuesto las siguientes hipótesis de trabajo.

I.2. Hipótesis

I.2.1. Hipótesis Principal

La luz modifica el comportamiento de *A. brasilense* Az39, tanto a nivel de su crecimiento y desarrollo, como en su capacidad de interaccionar con especies vegetales a través de la producción de compuestos reguladores del crecimiento.

I.3. Objetivos

I.3.1. Objetivo General

1. Evaluar el efecto de la luz en el crecimiento y desarrollo en *A. brasilense* Az39, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para no-leguminosas en la República Argentina.

I.3.2. Objetivos Específicos

1. Analizar el genoma de *A. brasilense* Az39, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para no-leguminosas en la República Argentina, e identificar posibles secuencias relacionadas con la adaptación o la respuesta bacteriana a la luz.
2. Secuenciar el transcriptoma *A. brasilense* Az39 y analizar la expresión de genes en diferentes condiciones de crecimiento relacionadas con la luz.
3. Evaluar el crecimiento de *A. brasilense* Az39 en diferentes condiciones de luz y correlacionar su desarrollo, con la capacidad bacteriana de modificar su comportamiento y estilo de vida, producir ciertas fitohormonas y promover el crecimiento de plantas inoculadas.
4. Modificar a nivel molecular, ciertas funciones metabólicas relacionadas con esta respuesta y establecer su correlación e importancia en los procesos de interacción planta-microorganismo.

CAPÍTULO II: Análisis genómico y funcional del genoma de *A. brasilense* Az39

II.1. Importancia del género *Azospirillum* sp. en la República Argentina

Entre las décadas del 80 y del 90 se desarrolló en el INTA-IMYZA (Castelar, Buenos Aires) un intenso programa para seleccionar cepas de *Azospirillum* sp. a partir de diversos cultivos de gramíneas cultivadas en diferentes suelos de la República Argentina. A partir de este trabajo, se aislaron 64 cepas y entre ellas *A. brasilense* Az39 a partir de suelo rizosférico de plantas de trigo cultivadas en la localidad de Marcos Juárez (Córdoba). Entre los años 1987 y 1996 se evaluó *a campo* el impacto de la inoculación con esta cepa en el cultivo de trigo y maíz (pradera pampeana) y se determinó que el rendimiento promedio aumentaba entre un 13-33% respecto a los controles sin inocular (Rodríguez Cáseres et al., 1996). A mediados de la década del 90 el SENASA conjuntamente con algunas empresas nacionales, recomendaron la utilización de la cepa Az39 de *A. brasilense* para la formulación de inoculantes para gramíneas en la República Argentina. Luego de más de una década, Puente et al., (2005) re-evaluaron la capacidad de esta cepa para aumentar el rendimiento de diferentes cultivos en condiciones agronómicas con resultados positivos; mientras que Perrig et al., (2007) evaluaron en condiciones *in vitro* los mecanismos potencialmente responsables de la capacidad de Az39 para promover el crecimiento y desarrollo vegetal. Finalmente, Cassán et al., (2009) evaluaron *in planta* tales mecanismos y determinaron que tanto la fijación de nitrógeno, como la producción de fitohormonas, principalmente auxinas serían mayoritariamente responsables de la interacción positiva. Alrededor del año 20000, Az39 es considerada la cepa promotora de crecimiento de no-leguminosas con mayor historia de uso agrícola en Argentina. A pesar de la enorme cantidad de información agronómica y fisiológica acumulada, la comprensión a nivel molecular de los mecanismos responsables de tal capacidad aún no había sido dilucidada. Es así que en el año 2012, se conforma un consorcio Internacional integrado por diferentes entidades científicas del mundo, tales como el Instituto de Ecologie Microbienne (Lyon, Francia); el TGAC (The Genome Analysis Centre) [Nottingham, UK]; la Katholieke Universiteit Leuven (Leuven, Belgica); el Instituto Leloir; el INDEAR (Instituto de Agrobiotecnología Rosario); el INTA (Instituto Nacional de Agrobiotecnología) y la UNRC de Argentina, a través del laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta Microorganismo (LFVIPM). El proyecto culminó de manera exitosa con la obtención y publicación de la secuencia completa del genoma de esta cepa en el año 2014 (Rivera et al., 2014). A partir del genoma secuenciado y anotado, se logró llevar a cabo un análisis genómico

y funcional adquiriendo así conocimientos básicos sobre las secuencias involucradas en diversos mecanismos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal y el estilo de vida rizosférico en esta bacteria, entre ellas, algunas relacionadas con la respuesta a la luz.

II.1.1. Secuenciación Masiva

La secuenciación del ADN es ampliamente utilizada, y es una herramienta indispensable para la investigación en cualquier campo de las ciencias biológicas.

Desde el primer genoma bacteriano, *Haemophilus influenzae*, que fue secuenciado completamente en 1995, más de 1000 secuencias genómicas completas se han determinado en bacterias. La tecnología de secuenciación del ADN ha mejorado dramáticamente desde la primera generación, con la secuenciación de ADN de Sanger, a los protocolos de secuenciación actuales de nueva generación los cuales reducen drásticamente el tiempo y el costo de la secuenciación de ADN. Uno de los primeros métodos desarrollados, fue el método de "más y menos" (Sanger y Coulson, 1975) el cual era una técnica relativamente rápida y simple que hizo posible la determinación de la secuencia del genoma del bacteriófago Φ 174 (Sanger et al., 1977). Otro método rápido y simple dependía de la degradación química específica del ADN (Maxam y Gilbert, 1977) y tenía la ventaja sobre el método de "más y menos" ya que se podía aplicar a ADN de doble cadena y se cortaba en bases específicas de la secuencia. Luego llegó la técnica de secuenciación de ADN de Sanger, la que ha sido un método importante para la secuenciación de genomas bacterianos desde sus inicios. El método automatizado de Sanger es considerado como una tecnología de 'primera generación' y sus limitaciones han animado a los científicos a desarrollar nuevas tecnologías de secuenciación. Los nuevos métodos se conocen como la secuenciación de segunda generación (NGS). Estas tecnologías de secuenciación de "segunda generación" se basan en diversas estrategias que se combinan a nivel de la preparación del molde, la secuenciación, la posterior alineación del genoma y los consecuentes procedimientos de ensamblaje. A continuación se detalla una de las maneras de secuenciación de segunda generación, Roche 454 (Pirosecuenciación) mediante la cual se secuenció el genoma de *Azospirillum brasilense* Az39.

II.1.1.1. Tecnologías de Secuenciación de ADN: Segunda generación

II.1.1.1.1. Sistema Roche 454. Pirosecuenciación

La plataforma Roche 454 fue el primer sistema de segunda generación con éxito comercial. Este secuenciador utiliza la tecnología de pirosecuenciación (Ronaghi et al., 1996). Esta tecnología se basa en la detección de pirofosfato liberado durante la incorporación de nucleótidos. Para la secuenciación con 454, lo primero que se hace es la creación de una biblioteca de ADN mediante fragmentación. Brevemente, el ADN genómico bacteriano es forzado a movilizarse a través de un pequeño orificio por el que se seleccionan fragmentos de ADN de 300 a 800 pb. Después de la reparación del ADN y pulido final para la generación de extremos romos, se añaden adaptadores de ADN, a cada uno de los fragmentos a nivel a de sus extremos. Luego de esto, cada fragmento se une a la superficie de una perla de agarosa de 28 μm de diámetro y es seguido de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en emulsión y con un cebador de secuencia complementaria a uno de los adaptadores (Berka et al., 2005). Como resultado, varios miles de copias de la misma secuencia de molde se generan en cada perla. Tras la emulsión, el ADN se desnaturaliza y las perlas se depositan en placas con recubrimiento de titanio. El diámetro de los pozos de la placa "PicoTiter" está diseñado para permitir sólo una perla por pocillo. Posteriormente se añaden las enzimas, sulfurilasa y luciferasa que son necesarias para la pirosecuenciación. Durante la pirosecuenciación, dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) individuales se añaden secuencialmente en un orden predeterminado con la ayuda de ATP sulfurilasa, luciferasa, luciferina y ADN polimerasa. La cantidad de luz generada es proporcional al número de dNTPs añadido. Las imágenes bioluminiscentes son registrados por un dispositivo de carga acoplada (CCD). En el proceso de pirosecuenciación, la polimerasa va incorporando nucleótidos complementarios (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) al amplicón que sirve de molde a partir de un cebador que hibrida con el adaptador ligado durante la creación de la biblioteca. Luego de la incorporación del nucleótido correspondiente, éste libera un pirofosfato, que es convertido en ATP por una ATP sulfurilasa, y mediante la luciferasa presente en la reacción, se emite una señal lumínica. La cantidad de luz generada es proporcional al número de dNTPs añadidos. Las imágenes bioluminiscentes son registrados por un CCD. Después de cada medición, la placa se lava y comienza el ciclo con la incorporación del siguiente nucleótido. Debido a que la relación lineal entre la intensidad de la luz y el número de dNTP incorporado sólo puede contener un máximo de 6

nucleótidos, la pirosecuenciación tiene altas tasas de error (inserciones y eliminaciones) en repeticiones homopolímero (Margulies et al., 2006; Metzker, 2010). La longitud de lectura de Roche 454 fue inicialmente 100-150 pb en 2005, y podían leerse 20 Mb por corrida (Margulies et al., 2006; Ronaghi et al., 1996). En el 2008 se puso en marcha el sistema Titanium 454 GS-FLX el cual podía alcanzar una longitud de lectura de 700 pb con una exactitud de 99,9% después del filtro y de salida de datos de 0,7 G por corrida, en 24 horas. A finales del 2009, Roche combinó el GS Júnior en un sistema de plataforma dentro del sistema de secuenciación 454 lo que simplificó la preparación de la biblioteca y el procesamiento de datos, y así la salida fue aumentada a 14 G por corrida (Ronaghi et al., 1998; Metzker, 2010). La ventaja más sobresaliente de Roche es su velocidad: se tarda sólo 10 horas desde el inicio hasta la finalización de la secuenciación. La longitud de lectura es una característica distinguida en comparación con otros sistemas de NGS. Además, es una de las tecnologías que menor tasa de error comete. La mayor parte de estos errores son pequeños InDels (inserciones o deleciones), que son causados por la presencia de homopolímeros. La intensidad de la señal emitida por un homopolímero de 6 bases debería ser el doble que la de uno de 3 bases; sin embargo, la relación de la intensidad de esa señal no es lineal y la precisión con la que se estima el homopolímero disminuye con la longitud de éste. Una solución a este problema es el aumento de la cobertura, aunque esto no resuelve los homopolímeros mayores de 10 nt. Al igual que ocurre en la secuenciación Sanger, la tasa de error aumenta con la posición en la secuencia. En el caso de la tecnología 454 esto se debe a la reducción de la eficiencia de la enzima o a la pérdida de esta, lo que provoca una reducción en la intensidad de señal (Kircher y Kelso, 2010; Metzker, 2010).

II.1.1.1.2. Secuenciamiento del genoma completo de *Azospirillum brasilense* Az39.

Como se mencionó anteriormente, la secuenciación del genoma de Az39 se llevó a cabo mediante la combinación de whole genome shotgun (WGS) y 8-K paired-end con un pirosecuenciador Roche 454 GS FLX Titanium (cobertura del genoma de 21X), se estimó un tamaño del genoma de 7.39 Mpb distribuidos en 6 replicones. Las lecturas de secuenciación se ensamblaron *de novo* mediante el ensamblador Newbler v2.8 y se obtuvieron seis scaffolds mayores a 160 kpb cada uno. El cierre de los gaps intra e inter-scaffolds se realizó con el programa de la plataforma Geneious R7 y la validación final del ensamblado del genoma

mediante un mapeo óptico con el OpGen Argus en TGAC [Reino Unido]. De acuerdo con los datos bioinformáticos y el análisis por electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE de sus siglas en inglés), se reveló la presencia de seis replicones en *A. brasilense* Az39 (un cromosoma, tres crómidos y dos plásmidos), una característica común de los genomas de *Azospirillum*. Por último, la anotación del genoma se realizó usando el programa Prokaryotic Genomes Automatic Annotation Pipeline (PGAAP) de NCBI. El genoma completo *A. brasilense* Az39 consiste de 6410 secuencias distribuidas en los seis replicones. Además, al igual que otras especies del mismo género, Az39 contiene múltiples operones ribosomales de los cuales 8 están completos, mientras que uno ha perdido la subunidad 5S del ARNr. También se identificaron 87 loci de ARNt. Mediante el uso de herramientas comparativas RAST (Aziz et al., 2008) y KEGG (Kanehisa et al., 2004) se identificaron genes putativos implicados en mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y del estilo de vida rizosférico, entre ellos genes relacionados a la fijación de nitrógeno, biosíntesis de fitohormonas y otros reguladores del crecimiento de plantas, formación de biofilms y sistemas de secreción tipo I, II y VI, así como de diferentes tipos de bacteriofitocromos. La secuencia completa del genoma de *A. brasilense* Az39, se encuentra en NCBI GenBank con el número de acceso CP007793 para el cromosoma y CP007794 a CP007798 para los otros replicones y proporciona una base genómica sólida para elucidar los mecanismos específicos de las interacciones planta-*Azospirillum*-ambiente y el desarrollo de herramientas moleculares que permitan un mayor grado de comprensión de este modelo.

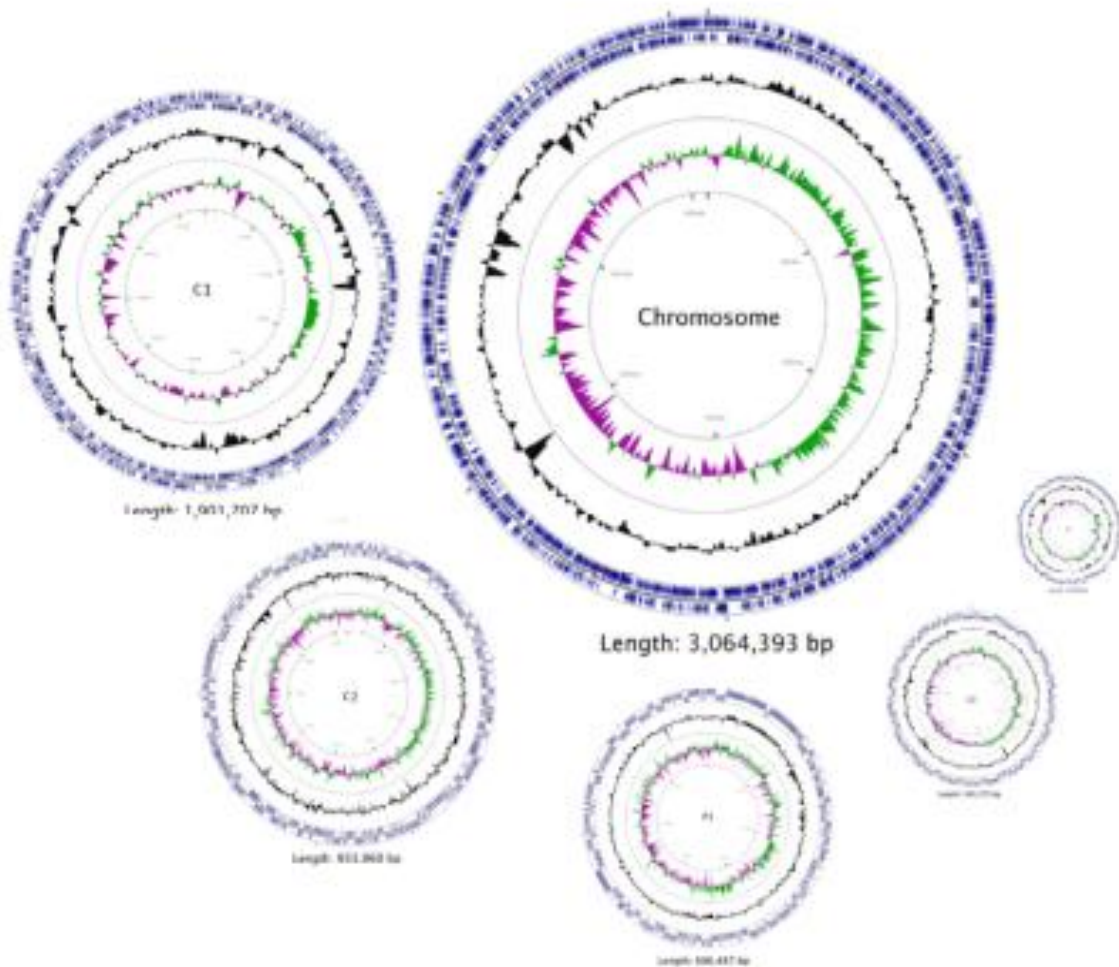


Figura 4. Mapa g3nico de los 6 replicones del genoma de *A. brasilense* Az39 generados por CGView Comparison Tool. Los dos c3rculos externos muestran las secuencias codificantes, representadas por flechas azules, presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido. Los c3rculos interiores indican el contenido G+C relativo (en negro) y la desviaci3n G+C (verde/morado) de cada uno de los elementos del genoma. C: cr3mico; P: pl3smido

En la Figura 4 se observa el genoma de *A. brasilense* Az39. El mismo est3 constituido por seis replicones, 1 cromosoma, 2 cr3midos y 3 pl3smidos. Los tamaos de los replicones y su contenido G+C son de: 3.064.393 pb (68.4%) para el cromosoma; 1.901 pb (68.4%); 933.9 pb (68.6%); 641.5 pb (69.2%) para los cr3midos 686.487 pb (69.5%) y 163.1 pb (65.6%) para los pl3smidos.

II.1.2. Análisis *in silico*

El aumento exponencial de la cantidad de datos biológicos que se obtienen con las nuevas tecnologías de secuenciación, ha determinado la aparición de nuevas herramientas bioinformáticas que permiten analizar tales datos de manera rápida y eficiente, obteniendo la mayor cantidad de información útil para el investigador sin que este requiera conocimientos específicos en bioinformática (Cook et al., 2016). El NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica o del inglés National Centre for Biotechnology Information) proporciona un servicio de anotación de genomas de organismos procariotas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) en la base de datos GenBank y ha establecido una relación con otras bases de datos con el fin de desarrollar normas o protocolos homologados para la anotación de los genomas procariotas (Klimke et al., 2011). Las bases de datos como NCBI o EMBL almacenan gigantescas cantidades de información que dejan a disposición de los usuarios para analizar de manera individual o para realizar análisis comparativos, tanto a nivel de genomas como de genes o grupos de genes particulares.

II.1.2.1. Anotaciones Rápidas utilizando Tecnología de Subsistemas (RAST)

El servicio de anotaciones rápidas utilizando tecnología de subsistemas, RAST (Aziz et al., 2008), consiste de un servidor de anotación automática de genomas microbianos, edificados sobre el marco proporcionado por el sistema SEED. El SEED integra continuamente diferentes tipos de datos genómicos de una variedad de fuentes. Estos incluyen genomas públicos anotado por RAST (Aziz et al., 2008), anotaciones de usuario expertos, datos de modelado metabólicos (Henry et al., 2010; Devoid et al., 2013), datos de expresión, referencias bibliográficas que verifican anotaciones (Canese et al., 2002) y los enlaces a los datos de otros recursos populares, incluyendo Swiss-Prot (Apweiler et al. 2013), GenBank (Benson et al., 2013), IMG (Markowitz et al., 2012), KEGG (Kanehisa et al., 2012), y DDC (Marchler-Bauer et al., 2013). El SEED también permite a los usuarios navegar por la colección actual de los subsistemas, que son proteínas agrupadas según en su función específica (Overbeek et al., 2005). La adición continua de nuevos subsistemas que cubren previamente las regiones no anotadas de los genomas, y el continuo control de calidad de los subsistemas existentes son fundamentales para la mejora de las anotaciones en SEED y su propagación a través de FIGfams en RAST (Overbeek et al., 2005; Aziz et al., 2008; Devoid et

al., 2013; Meyer et al., 2009; Davis et al., 2013). Los genomas públicos y privados anotados en RAST son introducidos en SEED y se incluyen en la curación de SEED. SEED=>FIGfam=>RAST=>SEED el ciclo está en el corazón de las anotaciones a basadas en SEED.

II.1.2.2. KEGG (Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto)

La Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto, o del inglés Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, es un recurso bioinformático que integra 15 bases de datos principales y es utilizado para la comprensión y utilidades de la célula o el organismo a partir de la información generada del genoma (Kanehisa et al., 2012, 2004). Este sistema de autosuficiencia se convierte en una representación por ordenador de la célula y el organismo, y tal vez la biósfera, así que permite el análisis in sílico de sistemas biológicos. KEGG es ampliamente utilizado para el análisis de varios tipos de datos de biología molecular con el fin de obtener pistas de funciones de orden superior (Kanehisa et al., 2012).

En este capítulo abordaremos el primer objetivo específico de la Tesis relacionado con el análisis bioinformático del genoma de *A. brasilense* Az39 y la identificación de posibles secuencias relacionadas con la adaptación o respuesta bacteriana a la luz.

II. 2. Materiales y Métodos

II.2.1. Análisis bioinformático del genoma de *A. brasilense* Az39.

Se analizó el genoma en busca de secuencias relacionadas con la capacidad bacteriana para captar o responder a la luz. El análisis se hizo sobre la base de modelos previamente estudiados y propuestos para otros microorganismos. Estas secuencias se identificaron en el genoma de Az39 y se compararon con aquellas homólogas presentes en la cepa tipo *A. brasilense* Sp245, otras cepas de la misma especie, del mismo género o incluso otros géneros bacterianos. Para ello, se utilizaron las bases de datos KEGG [<http://www.genome.jp/kegg/>] (Kanehisa et al., 2004; 2012) y RAST [<http://rast.nmpdr.org/>], este último a nivel del servidor de anotación automático de genomas microbianos edificados sobre el marco proporcionado por el sistema SEED (Aziz et al., 2008).

De manera adicional, se realizó la comparación de las secuencias codificantes para proteínas del tipo fotoreceptoras u otras con funciones afines en otros organismos, de la misma especie o pertenecientes a otros géneros bacterianos para conocer su grado de homología y potencialmente asociar alguna función metabólica de éstas proteínas en *A. brasilense* Az39.

II.2.2. Análisis comparativo

A partir de las secuencias del tipo fitocromo (PHY) (2) y Bacteriofitocromo (BphO) (1) identificadas en el genoma de Az39; las mismas se compararon con aquellas presentes en el genoma de otros organismos pertenecientes a la misma especie, género e inclusive con microorganismos pertenecientes a otros géneros bacterianos. Las secuencias de proteínas se obtuvieron a partir de NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) y RAST (<http://rast.nmpdr.org/>). La construcción de los árboles filogenéticos se llevó a cabo mediante el uso del software MEGA 7 (Kumar et al., 2016). El análisis filogenético se realizó mediante el método de Neighbor-Joining (Saitou et al., 1987) y se validaron con el método de bootstrapping con 1000 repeticiones (Felsenstein, 1985).

II.3. Resultados

De aquellos fotoreceptores descritos para microorganismos y mencionados previamente en la introducción general (PHY, LOV, BLUF, PYP y rodopsinas sensoriales) solo se pudo identificar tres (3) secuencias, todas relacionadas con el dominio fitocromo (PHY) en el genoma de *A. brasilense* Az39. Estas, corresponden a dos (2) secuencias codificantes para proteínas del tipo fitocromo y una (1) para una bacterio-fitocromo hemo-oxigenasa (BphO), no descrita previamente por la literatura (Kumar et al., 2012). A continuación, se resume la información de la búsqueda en el servidor de anotación automático de genomas microbianos RAST edificados sobre el marco proporcionado por el sistema SEED.

II.3.1. Secuencia codificante “phyAz39-1”

La descripción de la anotación en el genoma de Az39 para esta secuencia es: >fig|192.14.peg.6139-A.*brasilense* Az39 y se corresponde con una proteína del tipo Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-). La secuencia se localiza físicamente en el plásmido 4 del genoma de Az39.

**Annotation Overview for [fig|192.31.peg.6139](#) in *Azospirillum brasilense* Az39:
Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)**

current assignment	Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	EC Number	2.7.3.-
taxonomy id	192	contig	AbAz39_p4 (641,573bp) ▼
internal links	genome browser feature evidence sequence		
annotation history	show	run tool	Psi-Blast ▼ run tool
CDD link	show cdd		
edit functional role	Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)		
propagation lock	Unlocked Toggle lock		

Figura 5. Resultado de la búsqueda por RAST en la que se reporta la secuencia codificante de una proteína del tipo fitocromo (EC 2.7.3.-), ubicada en el plásmido 4 del genoma de *A. brasilense* Az39.

En la Figura 5, se observa la región del genoma de Az39 en la que se localiza la secuencia codificante del phyAz39-1 (Figura 4: ID: fig|192.31.peg.6139). El tamaño de la secuencia es de 2544 bp o 848 aminoácidos.

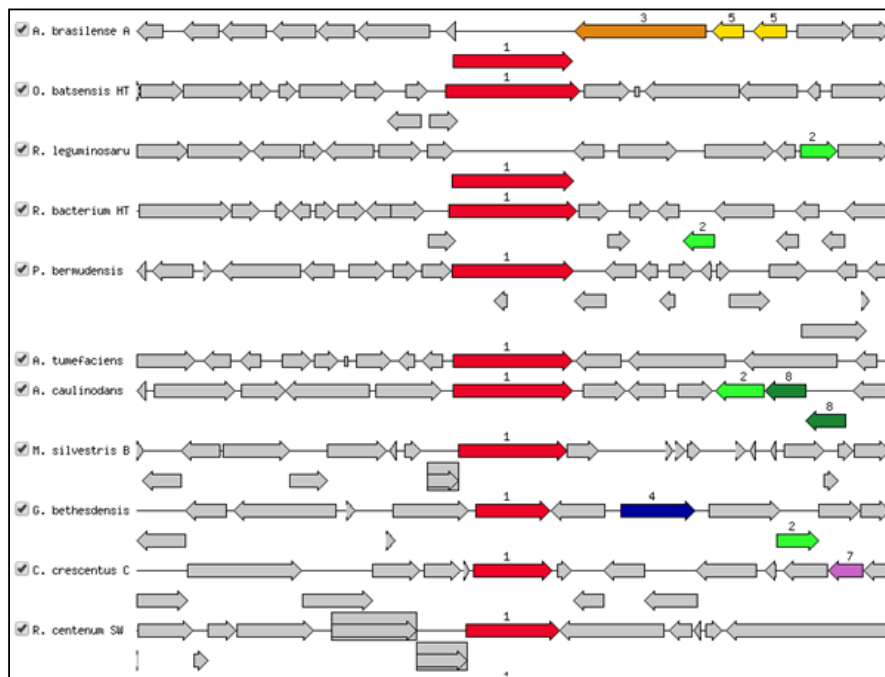


Figura 6. Región cromosomal analizada para phyAz39-1. Las flechas de color rojo indican la secuencia codificante correspondiente a ésta proteína; mientras que la de color marrón indican la secuencia codificante para una diguanilato ciclasa/fosfodiesterasa (Dominio GGDEF/ EAL)

con sensores PAS/PAC. Finalmente, las flechas de color amarillo indican la secuencia de un regulador transcripcional (Familia TetR).

La secuencia presenta identidad y homología con otros microorganismos del género *Azospirillum* y de otros géneros no relacionados como se detalla en esta figura y en la Tabla 2.

Tabla 2. Análisis n-BLAST para determinar el porcentaje de identidad y homología de la secuencia codificante para “phyAz39-1” de Az39 con otras secuencias codificantes localizadas en el genoma de microorganismos de la misma especie o de otros géneros bacterianos.

Microorganismo	Secuencia codificante	% ID	% C	E
<i>A.brasilense</i> Sp245	>fig 1064539.6.peg.6151	98	99	0.0
<i>A.brasilense</i> Sp7	>fig 1064539.6.peg.6296	97	99	e-172
<i>A.brasilense</i> B510	>fig 137722.8.peg.2116	61	74	0.0
<i>A. tumefaciens</i> C58	>fig 176299.3.peg.21	41	59	0.0
<i>A.brasilense</i> FP2	>fig 1262469.4.peg.2907	41	59	7,00E-83

Referencias: ID: identidad; C: cobertura; E: valor E

II.3.2. Secuencia codificante “phyAz39-2”

La descripción de la anotación en el genoma de Az39 para esta secuencia es: >fig|192.31.peg.6241-*A.brasilense* Az39 y se corresponde con una proteína del tipo Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)]. La secuencia se localiza físicamente en el plásmido 4 del genoma de Az39.

Annotation Overview for [fig|192.31.peg.6241](#) in *Azospirillum brasilense* Az39:
Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)

current assignment Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	EC Number 2.7.3.-
taxonomy id 192	contig AbAz39_p4 (641,573bp)
internal links genome browser feature evidence sequence	run tool Psi-Blast <input type="button" value="run tool"/>
annotation history <input type="button" value="show"/>	
CDD link show cdd	
edit functional role Phytochrome, two-component sensor histidine kinase (EC 2.7.3.-)	
propagation lock Unlocked Toggle lock	

Figura 7. Resultado de la búsqueda por RAST en la que se reporta la secuencia codificante de una proteína del tipo fitocromo (EC 2.7.3.-), ubicada en el plásmido 4 del genoma de *A. brasilense* Az39.

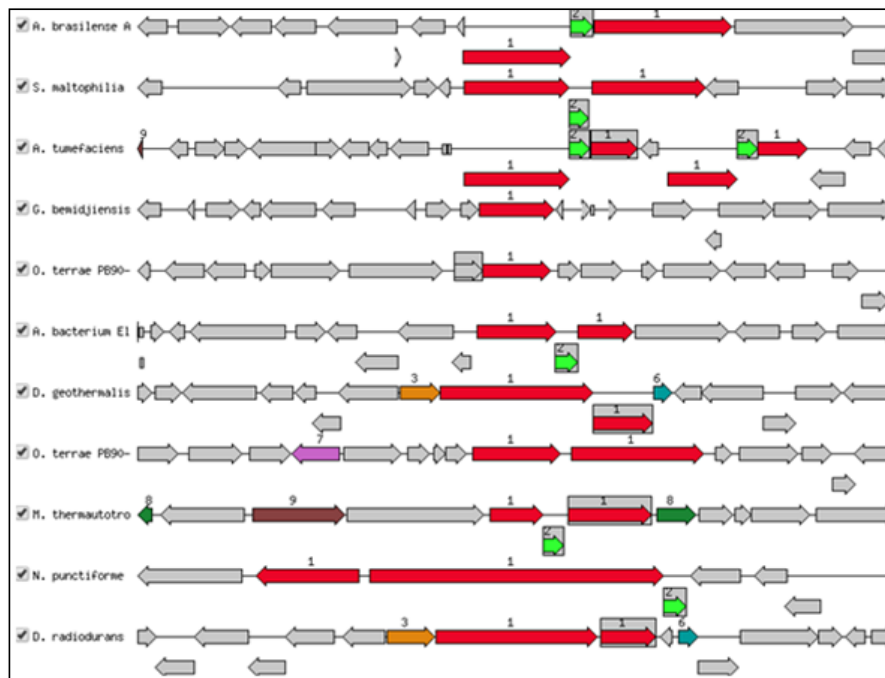


Figura 8. Región cromosomal analizada para el Fitocromo phyAz39-2. Las flechas de color rojo indican la secuencia codificante correspondiente a ésta proteína; mientras que la de color verde indica la secuencia de un regulador de respuesta de metales pesados de unión al ADN). La secuencia presenta identidad y homología con otros microorganismos del género *Azospirillum* y de otros géneros no relacionados como se detalla en esta figura y en la Tabla 3.

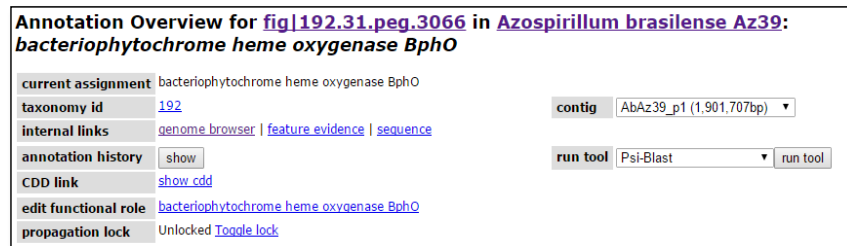
Tabla 3. Análisis n-BLAST para determinar el porcentaje de identidad y homología de la secuencia codificante para “phyAz39-2” de Az39 con otras secuencias codificantes localizadas en el genoma de microorganismos de la misma especie o de otros géneros.

Microorganismo	Secuencia codificante	% ID	% C	E
<i>A. brasilense</i> Sp245	>fig 1064539.6.peg.6296	96	98	0.0
<i>A. brasilense</i> Sp7	>fig 192.20.peg.73	94	97	0.0
<i>A. brasilense</i> FP2	>fig 1262469.4.peg.2907	94	96	0.0
<i>G. bemidjiensis</i>	>fig 404380.3.peg.1140	57	71	6,00E-85
<i>A. brasilense</i> B510	>fig 137722.8.peg.3768	55	68	0.0
<i>D. geothermalis</i>	>fig 68909.1.peg.1312	55	71	7,00E-76
<i>A. tumefaciens</i> C58	>fig 176299.3.peg.348	49	63	0.0
<i>N. punctiforme</i> PCC 73102	>fig 63737.4.peg.22	38	56	e-175
<i>D. radiodurans</i>	>fig 243230.1.peg.2864	34	49	2,00E-94

Referencias: ID: identidad; C: cobertura; E: valor E

II.3.3. Secuencia bacterio-fitocromo hemooxigenasa “BphO-Az39”

La descripción de la anotación en el genoma de Az39 para esta secuencia es: fig|192.31.peg.3066-A.*brasilense* Az39 y se corresponde con una proteína del tipo Bacteriophytochrome heme oxygenase *BphO* (EC 2.7.3.-)].



Annotation Overview for [fig|192.31.peg.3066](#) in *Azospirillum brasilense* Az39:
bacteriophytochrome heme oxygenase BphO

current assignment	bacteriophytochrome heme oxygenase BphO	contig	AbAz39_p1 (1,901,707bp)
taxonomy id	192	run tool	Psi-Blast <input type="button" value="run tool"/>
internal links	genome browser feature evidence sequence		
annotation history	<input type="button" value="show"/>		
CDD link	show cdd		
edit functional role	bacteriophytochrome heme oxygenase BphO		
propagation lock	Unlocked Toggle lock		

Figura 9. Resultado de la búsqueda por RAST en la que se reporta la secuencia codificante de una proteína del tipo bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (EC 2.7.3.-), ubicada en el plásmido 1 del genoma de *A. brasilense* Az39.

En la Figura 9, se observa la secuencia identificada mediante el uso de RAST, la que codifica para una proteína del tipo bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (bphO), ubicada en el subsistema relacionado con estrés Oxidativo. (Figura 6: ID: fig|192.31.peg.3066) y con un tamaño de 558 bp o 186 aminoácidos. Este bacteriofitocromo se encuentra localizado en el plásmido 1 del genoma y no se identificaron secuencias homólogas en otros microorganismos.

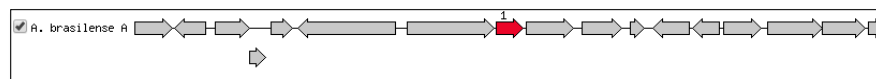


Figura 10. Región cromosomal analizada para el bacteriofitocromo BphO-Az39 de *A. brasilense* Az39. La flecha de color rojo indica la secuencia codificante correspondiente al bacteriofitocromo.

La secuencia presenta identidad y homología con otros microorganismos, pero solo del género *Azospirillum*, como se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Análisis n-BLAST para determinar el porcentaje de identidad y homología de la secuencia codificante para bphO-Az39 de Az39 con otras secuencias codificantes localizadas en el genoma de microorganismos de la misma especie y género.

Microorganismo	Secuencia codificante	% ID	% C	E
<i>A. brasilense</i> Sp245	>fig 1064539.6.peg.3220	96	98	e-124
<i>A. brasilense</i> Sp7	>fig 192.20.peg.3881	95	98	e-115
<i>A. brasilense</i> FP2	>fig 1262469.4.peg.2202	95	97	e-115
<i>A. liporefum</i> 4B	>fig 862719.5.peg.2411	67	76	4,00E-74
<i>A. brasilense</i> B510	>fig 137722.8.peg.363	66	73	2,00E-62
<i>A. amazonene</i> Y2	>fig 1003237.4.peg.3945	51	70	0.24

Referencias: ID: identidad; C: cobertura; E: valor E

II.4. Análisis comparativo

Las secuencias que codifican para proteínas receptoras de luz del tipo fitocromo, presentes en microorganismos del género *Azospirillum* y pertenecientes a otros géneros bacterianos se analizó con el objetivo de compararlas y establecer el grado de homología entre sí, así como su grado de conservación. A continuación, se resume la información obtenida, mediante la construcción de árboles filogenéticos, obtenidos para cada una de las secuencias presentes en el genoma de Az39.

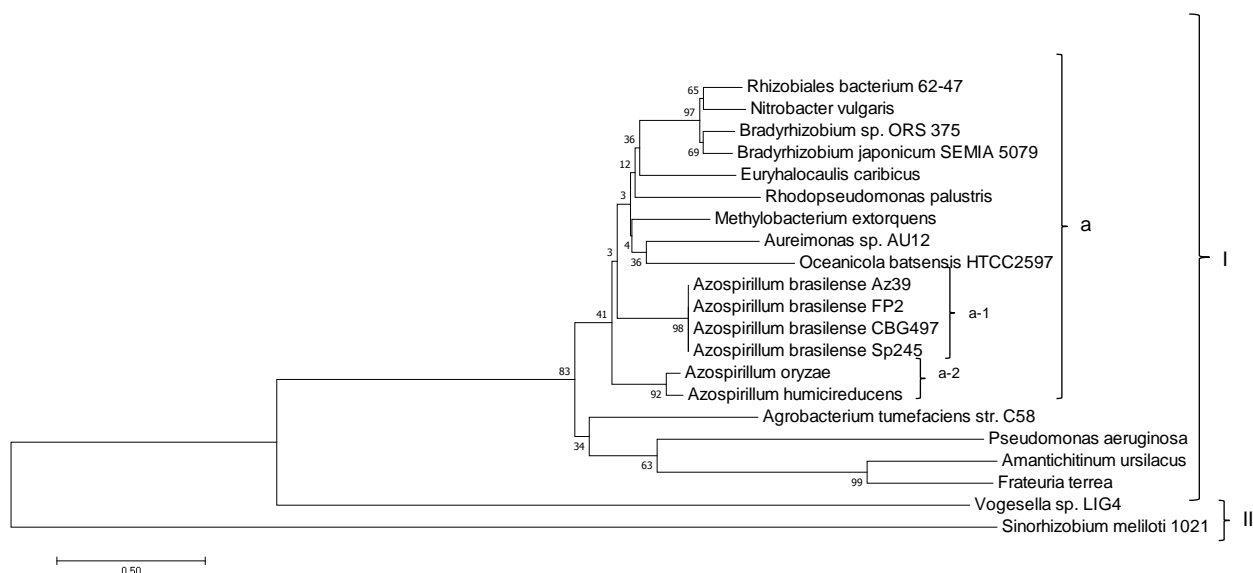


Figura 11. Análisis filogenético de una proteína del tipo fitocromo obtenido a partir del alineamiento múltiple de la secuencia de phyAz39-1. La filogenia fue inferida con el modelo de Poisson y el método de distancia Neighbor-Joining mediante el software MEGA7. Los números en los nodos representan el porcentaje del boot-straping con 1000 repeticiones.

La Figura 11 muestra el análisis filogenético realizado en Az39 a partir de la secuencia de la proteína del fitocromo con sistema de dos componentes del tipo sensor histidina quinasa (phyAz39-1) obtenida de la base de datos NCBI. En ella se presentan dos (2) ramas o clados y en el grupo I (a-1) quedó *A. brasilense* Az39 junto a otras cepas del mismo género y especie, tales como FP2, CBG497 y Sp245, lo que nos sugiere que las secuencias presentes en estos microorganismos tienen cierta homología. Por otro lado, en la rama (a-2), quedaron agrupadas otras especies del mismo género: *A. oryzae* y *A. humicireducens* con un porcentaje de identidad menor. El ancestro evolutivo de microorganismos de la sección a-1, difiere del ancestro para aquellos ubicados en la parte a-2 y esto confirma, que si bien, ambos grupos de bacterias pertenecen al mismo género, la secuencia codificante para el fitocromo phyAz39-1 diverge evolutivamente.

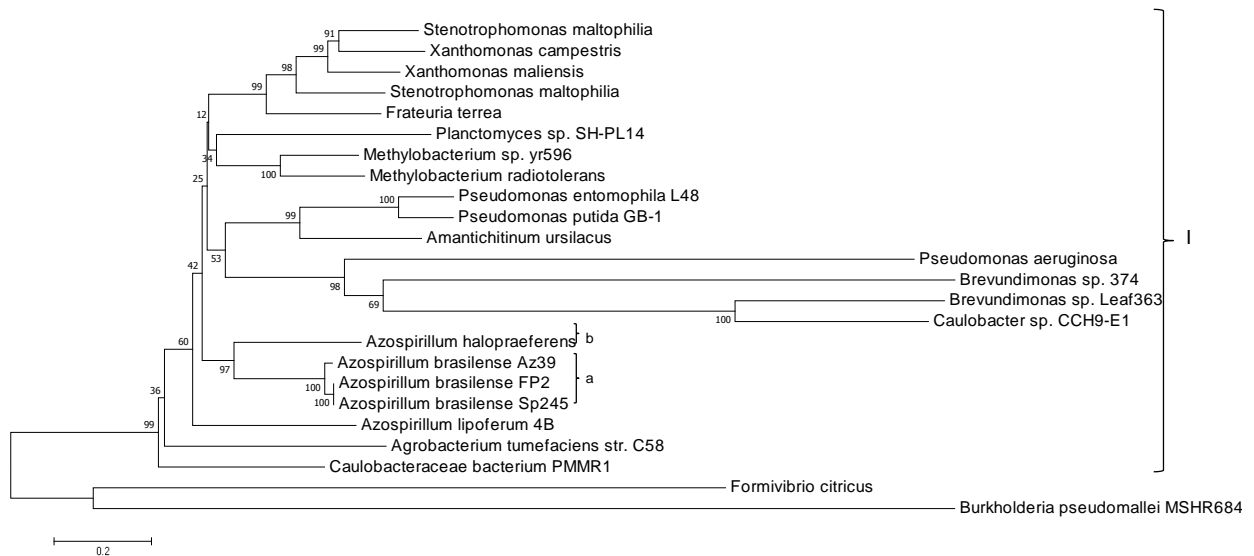


Figura 12. Análisis Filogenético del fitocromo obtenido a partir del alineamiento múltiple de la secuencia phyAz39-2. La filogenia fue inferida con el modelo de Poisson y el método de distancia Neighbor-Joining mediante el software MEGA7. Los números en los nodos representan el porcentaje del boot-straping con 1000 repeticiones.

La Figura 12 muestra el análisis filogenético realizado en Az39 a partir de la secuencia de una proteína del tipo fitocromo con sistema de dos componentes del tipo sensor histidina quinasa (phyAz39-2) obtenida de la base de datos NCBI. El árbol se divide en dos (2) ramas y de acuerdo al análisis, se observó que la secuencia de aminoácidos codificante para el phyAz39-2

presente en *A. brasilense* Az39 (sección a) comparte el ancestro evolutivo con Sp245 y FP2; en estos dos últimos se observó que la secuencia codificante para la proteína tipo fitocromo presenta una similitud evolutiva. Esto nos permite inferir que la secuencia presente en el genoma de Sp245 y FP2, es la misma; sin embargo, diferente a la que se encuentra en el genoma de Az39. Por otro lado, quedó en una sub-rama separada *A. halopraeferens*, el que comparte el mismo ancestro que los microorganismos ubicados en la sub-rama a.

A continuación, se muestra el árbol filogenético construido a partir de las secuencias de aminoácidos correspondientes a la bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (bphO).

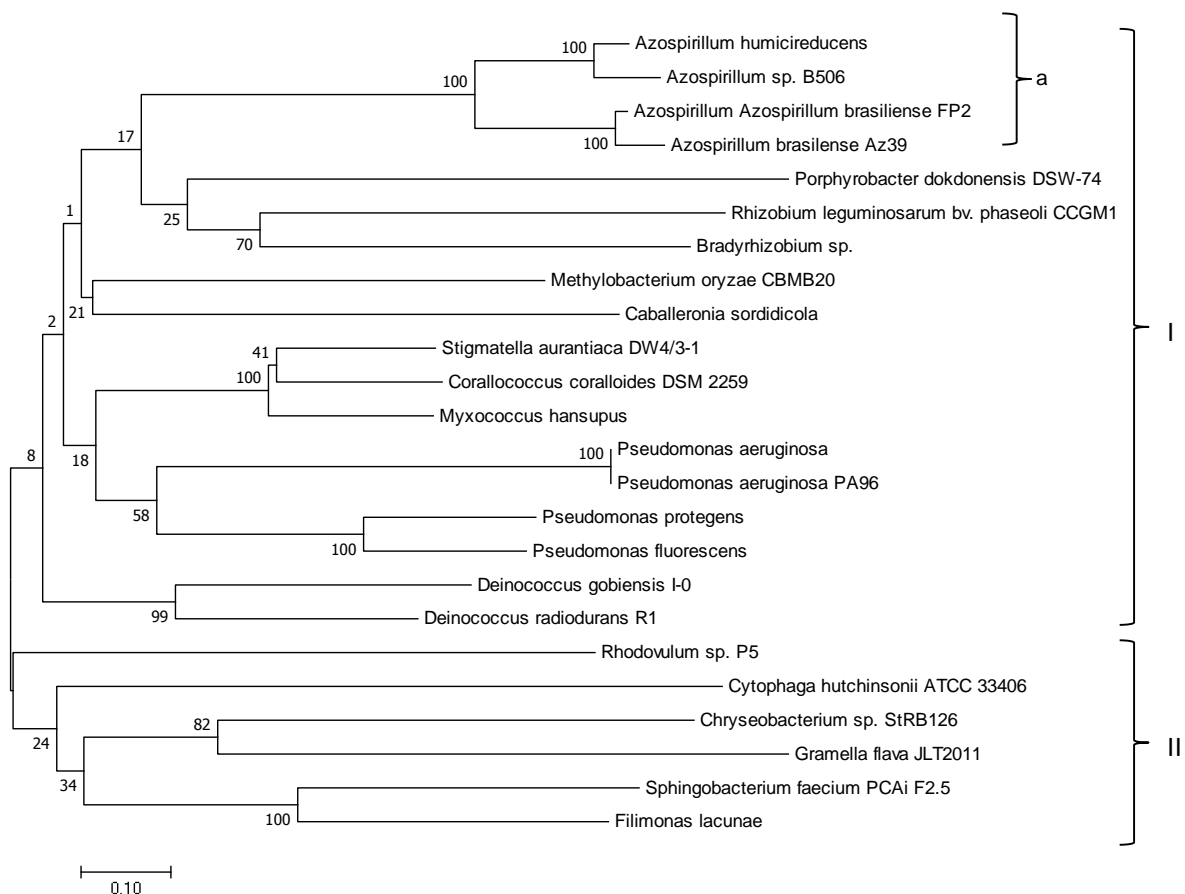


Figura 13. Análisis filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple de la secuencia de la bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (bphO). La filogenia fue inferida con el modelo de Poisson y el método de distancia Neighbor-Joining mediante el software MEGA7. Los números en los nodos representan el porcentaje del boot- straping con 1000 repeticiones.

En la figura se observa el análisis filogenético basado en la secuencia obtenida de la base de datos de NCBI. El árbol se divide en dos (2) clados o ramas que divergen evolutivamente uno de otro de acuerdo a su secuencia de aminoácidos codificante para el bacteriofitocromo bphO. Así dentro de la rama I (parte a), se encuentran microorganismos del género *Azospirillum* sp. Dentro de esta agrupación filogenética, por un lado quedó *A. brasilense* Az39 y FP2, y por otra parte *A. brasilense* sp. B506 junto a *Azospirillum himicireducens*. Estos dos grupos de bacterias, pertenecientes al género *Azospirillum*, se diferenciaron filogenéticamente, uno de otro de acuerdo a la secuencia bphO; sin embargo comparten un ancestro en común. Si bien, las secuencias codificantes presentes de diferentes cepas del género *Azospirillum*, comparten el mismo ancestro, la similitud que existe entre ellas, difiere por lo tanto se podría decir que no es exactamente la misma secuencia en cada una de las especies y cepas de este género analizadas.

II.5. Discusión

Los fotorreceptores más abundantes en bacterias son los fitocromos (Gomelsky et al., 2011). Estas proteínas se unen covalentemente a un cromóforo de biliverdina, permitiendo así la detección de luz roja o roja lejana (Bhoo et al., 2001). Los fitocromos se han encontrado en el 17% de todos los genomas bacterianos secuenciados (Gomelsky et al., 2011). Los fitocromos de las plantas y las cianobacterias generalmente se unen fitocromobilina y fitocianobilina, respectivamente (Smith, 2000; Yeh et al., 1997), mientras que los bacteriofitocromos se unen a la biliverdina (Bhoo et al., 2001). A partir de la información obtenida por el análisis del genoma de *A. brasilense* Az39 una bacteria no fotosintética promotora del crecimiento de plantas, se pudo verificar la presencia de dos (2) secuencias codificantes para proteínas del tipo fitocromo (phyAz39-1, phyAz39-2) y 1 secuencia que codifica para una hemo-oxigenasa (bphO) no descrita previamente en la literatura (Kumar et al., 2012). En el caso del phyAz39-1 y phyAz39-2, ambas secuencias se ubican físicamente en el plásmido 4 (P4) del genoma de Az39; mientras que la secuencia BphO-Az39 se ubica en el plásmido 1 (P1). El rol de las proteínas codificadas por estos genes, aún no se han estudiado en profundidad, por lo que se desconoce en líneas generales su función específica dentro del metabolismo de la bacteria. Secuencias similares a las codificadas por phyAz39-1 y phyAz39-2 se encuentran en otros microorganismos y con algunos de ellos presentan un elevado porcentaje de homología, como

en el caso de phyAz39-1 que presenta cerca de un 98% de homología con la secuencia similar ubicada en el genoma de *A. brasilense* Sp245 y un 97% con otra secuencia de *A. brasilense* Sp7. Cabe aclarar que en otros microorganismos tales como *Oceanicola batsensis*, *Azorhizobium caulinodans*, y *R. leguminosarum* bv. *Viciae* 3841, fueron identificadas secuencias candidatas pero con un bajo porcentaje de homología (50, 41 y 50% respectivamente) con la secuencia correspondiente a la de Az39.

En el caso de la secuencia denominada phyAz39-2 tiene un alto nivel de homología con secuencias similares identificadas en el genoma de *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* FP2 y *A. brasilense* Sp7 (96, 94 y 94% respectivamente) y si bien la secuencia se encuentra en otros microorganismos, el nivel de homología es muy bajo. La función de estas proteínas sobre el crecimiento y estilo de vida de *A. brasilense* Az39, aún no ha sido definida y es un campo en exploración en la actualidad; sin embargo en otros microorganismos ha sido determinado algún rol particular para este tipo de proteínas. Los sistemas típicos de dos componentes (TCS) consisten en dos proteínas, un sensor histidin quinasa (HK) y un regulador de respuesta (RR) y se consideran potenciales dianas de fármacos antibacterianos (Casino et al., 2010; Raghavan y Groisman, 2010; Gross y Beier, 2012, Velikova et al., 2013). De acuerdo a la conformación de los sistemas de dos componentes, comúnmente se produce la co-expresión de ambas proteínas disminuyendo las posibilidades de interferencia entre sensores y reguladores no afines (Laub y Goulian, 2007). Sin embargo, con frecuencia es común encontrar en los genomas bacterianos proteínas "huérfanas" del sistema de dos componentes donde existe un sensor que no precisamente está acompañado por un regulador de respuesta y viceversa. Esto sugiere que los sensores al detectar una señal ambiental cualquiera sea (Temperatura, luz, estado nutricional) podrían llegar a interactuar con más de un regulador de respuesta (Raghavan y Groisman, 2010). La abundancia de proteínas sensoriales y reguladoras huérfanas varía entre las bacterias, en *Escherichia coli* solo representa el 1%, mientras que en *Caulobacter crescentus*, el 57% de los genes del sistema de dos componentes, son huérfanos (Skerker et al., 2005). Tal como se mencionó anteriormente, uno de los fitocromos presentes en Az39, phyAz39-1 codifica para un sensor histidin quinasa y se encuentra flanqueado por un gen que codifica para GGDEF/EAL con dominio PAS/PAC (Cadena del ADN opuesta), como ya se ha descrito; sin embargo, no se detecta la presencia de un regulador de respuesta, como si se observa en la secuencia phyAz39-2. A partir de lo reportado anteriormente y ante la

detección de una determinada longitud de onda, la bacteria sería capaz de transducir esta señal a un regulador o varios reguladores de respuesta no afines vía phyAz39-1. El fitocromo de *Pseudomonas*, es un sensor huérfano histidin quinasa y puede fosforilar uno o más reguladores de respuesta. Como una quinasa huérfana, también podría desempeñar un papel en la comunicación cruzada entre diferentes vías de transducción de señal (Rodrigue et al., 2000). En la proximidad de phyAz39-1 se ubica una GGDEF/EAL y esta proteína podría estar relacionada con la regulación de los niveles intracelulares de c-di-GMP.

La capacidad bacteriana de manipular los niveles intracelulares de c-di-GMP es depende de la expresión inducible de los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis o hidrólisis de c-di-GMP, las diguanilato ciclasas (DGC) o las fosfodiesterasas (PDE). Ambas, son sensibles a la luz y se activan con luz roja y azul, respectivamente (Tarutina et al., 2006; Ryu et al., 2017), sin embargo se carece de información acerca de si estas proteínas estarían relacionadas con el bacteriofitocromo en el caso de Az39. En la actualidad, sabemos que el GMP cíclico (c-di-GMP) regula diversos aspectos de fisiología y comportamiento bacteriano que incluyen movilidad, fijación superficial, formación y dispersión de biopelículas, ciclo celular, producción de metabolitos secundarios y virulencia (Römling et al., 2013).

En *R. sphaeroides*, el bacteriofitocromo BphG1 es poco convencional, ya que contiene dominios de salida GGDEF y EAL, los cuales están implicados, en la síntesis y la degradación del segundo mensajero bacteriano c-di-GMP, respectivamente. Las proteínas GGDEF-EAL estudiadas hasta la fecha muestran actividad de diguanilato ciclasa o fosfodiesterasa, pero no ambas. La proteína BphG1 es el primer fitocromo con una actividad enzimática fotoactivada no cinasa y la primera enzima "bifuncional" capaz de sintetizar e hidrolizar c-di-GMP (Tarutina et al., 2006). Por otro lado, también se destacó la presencia de un bacteriofitocromo, el cual estaría conformado desde el punto de vista estructural, por dos partes, una sensora y otra reguladora de respuesta, como comúnmente suelen encontrarse estos sistemas de dos componentes distribuidos en la naturaleza. En reportes de la literatura sobre reguladores de respuesta de este tipo, como el que se encuentra en *Bordetella pertussis*, el sistema de dos componentes está conformado por BvgS y BvgA, implicados en la regulación de la expresión de genes de virulencia, donde BvgS es una proteína sensora transmembrana que puede autofosforilarse y fosforilar a BvgA (Uhl et al., 1996). Aunque originalmente se identificó como un regulador positivo de la expresión del gen de virulencia, ahora está claro que BvgA

se encuentra en la cima de una gran jerarquía reguladora que controla la activación y/o represión de más de 150 genes, cuyos productos se predice que participarían en funciones fisiológicas tales como el transporte de electrones y la biosíntesis de aminoácidos (Weiss et al., 1983; Weiss y Falkow, 1984; Knapp y Mekalanos, 1988; Bootsma et al., 2002; Hot et al., 2003). Yeh et al., (1997), revelaron la función del fitocromo como un sistema de dos componentes que se regula en presencia de luz rojo/rojo lejano mediante una fosforilación reversible de un pequeño regulador de respuesta denominado Rcp1. La cianobacteria *Synechocystis* sp. cepa PCC 6803 presenta un sistema regulador de dos componentes (Cph1-Rcp1), cuyo sensor muestra una identidad de aminoácidos con el fitocromo de las plantas (Mizuno et al., 1996). Diez pares de bases corriente abajo del codón de parada de *cph1* existe otro marco de lectura abierto designado *rcp1*, que codifica un polipéptido de 147 aminoácidos de gran similitud con el dominio receptor de proteínas de la superfamilia CheY de reguladores de respuesta (Yeh et al., 1997). La estrecha vinculación física de *cph1* y *rcp1* sugiere que los dos genes están en el mismo operón y que la transcripción del operón *cph1 rcp1* estaría regulado positivamente por la ausencia de luz. Por otro lado, se ha informado que Rcp1 puede funcionar como una fosfotransferasa o puede tener distintas actividades reguladoras al igual que CheY. Sin embargo, hasta el momento sólo se ha reportado un trabajo por Kumar et al., (2012), es el que describen la presencia de dos bacteriofitocromos en *A. brasilense* Sp7 y aseguran que estos no intervienen en la biosíntesis de pigmentos carotenoides en respuesta a la incidencia a luz roja.

En el genoma de Az39, hemos identificado una secuencia que codifica para una bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (BphO-Az39) que presenta cierta homología con secuencias similares de otras cepas de la misma especie, tales como *A. brasilense* Sp245, *A. brasilense* Sp7, *A. brasilense* FP2 (96%, 95% y 95 % respectivamente). Biliverdina IX α es un derivado tetrapirrol lineal de hemo. La mayoría de las bacterias, incluidas *E. coli* y *A. brasilense*, sintetizan hemo; sin embargo no todas codifican para una hemooxigenasa específica para hacer biliverdina IX α (Ryu et al., 2017). Tras una exhaustiva búsqueda de bibliografía, solo podemos mencionar que se desconoce la función que desempeña esta secuencia en *A. brasilense* o en microorganismos no fotosintéticos, tales como la cepa Az39.

II.5.1. Abordaje filogenético bioinformático

El análisis Filogenético realizado, permitió inferir la divergencia evolutiva de estas secuencias presentes en el genoma de Az39, y, por sobre todas las cosas profundizar o conocer la función que desempeñan en otros microorganismos. La secuencia BphO de Az39, de acuerdo a reportes bibliográficos, podría codificar para una proteína del tipo hemo-oxigenasa; sin embargo no existen reportes bibliográficos hasta el momento que detallen una función determinada en el metabolismo de alguna cepa perteneciente *A. brasilense*, ni tampoco en otras bacterias del mismo género. Wegele et al., (2004), determinaron que la función biológica de esta proteína es la de generar isómeros de biliverdina en bacterias del género *Pseudomonas*. En otros trabajos, a partir de la obtención de mutantes en la secuencia bphO de *P. aeruginosa* se reportó que esta proteína cumple un rol adicional además de proporcionar el cromóforo para el fitocromo bacteriano. Esto es bastante razonable ya que se ha informado en estudios previos, que las hemo-oxigenasas (HOs) tienen una amplia variedad de funciones en otros organismos (Kikuchi et al., 2005). En las bacterias patógenas, las hemo-oxigenasas, están frecuentemente involucradas en la adquisición de hierro en condiciones de depleción de este compuesto en el ambiente (Schmitt, 1997). Para *P. aeruginosa*, se ha descrito una hemo-oxigenasa adicional (pigA). Ambas proteínas, PigA y BphO, exhiben aproximadamente el 20% de identidad entre sí; sin embargo, PigA escinde el hemo del sustrato en una posición diferente a BphO, posiblemente para prevenir la "interferencia" con el sistema de fitocromo (Wegele et al., 2004). Un papel de reemplazo de bphO en la adquisición de hierro de hemo casi se puede descartar porque un mutante pigA es incapaz de utilizar hemo como una fuente de hierro, lo que indica que bphO no puede sustituir a la pérdida de pigA (Ratliff et al., 2001). Otro producto de la reacción de las hemo-oxigenasas es el monóxido de carbono, que sirve como un segundo mensajero en mamíferos. Actualmente, se desconoce si este compuesto, producido endógenamente en las bacterias puede tener funciones similares (Ryter et al., 2002). Una segunda parte del análisis filogenético que se obtuvo con las otras dos secuencias codificantes para proteínas del tipo fitocromo en Az39, también nos permitió inferir acerca de la divergencia evolutiva y como una misma secuencia codificante puede diferir en el genoma de un microorganismo u otro, más allá de pertenecer al mismo género bacteriano e inclusive a la misma especie. Los sistemas de transducción de señales de dos componentes están ampliamente difundidos en las bacterias y participan en procesos de regulación celular tales

como la virulencia, la detección de quórum, la quimiotaxis, la utilización de nutrientes y la regulación del ciclo celular, así como la adaptación a los cambios ambientales (Gao et al., 2009). El análisis filogenético de las secuencias phyAz39-1 y phyAz39-2, arrojó la presencia de secuencias similares en microorganismos pertenecientes a *A. brasilense*, tales como Sp245, FP2, CBG497. Hasta el momento no existen reportes que nos permitan inferir acerca de la función que cumplen estas proteínas en estos microorganismos; pero teniendo en cuenta la similitud que exhiben, se podría asumir que la función biológica que llevan a cabo en cada organismo, sería similar; sin embargo, se ha reportado que el fitocromo de *D. radiodurans* y *P. aeruginosa* son altamente homólogos entre sí, pero no se pueden relacionar en cuanto a la función, ya que *P. aeruginosa* no produce ningún pigmento tipo carotenoide. Además, la organización genómica de ambos operones de fitocromo es ligeramente diferente ya que el operón de *D. radiodurans* consta de tres genes: bphO (heme oxigenasa), bphP (apo-fitocromo) y bphR (regulador de respuesta). El rol de las proteínas codificadas por estos genes, aún no se ha estudiado en profundidad, por lo que se desconoce en líneas generales su función específica dentro del metabolismo de microorganismos no fotosintéticos.

II.6. Conclusiones parciales

De este capítulo de Tesis se pudo concluir que:

1. *A. brasilense* Az39, la cepa utilizada en la formulación de inoculante para no-leguminosas en Argentina contiene dos secuencias codificantes para proteínas del tipo fitocromo (phyAz39-1 y phyAz39-2) con funcionalidad de un sistema de dos componentes del tipo histidín-quinasa y una secuencia codificante de una proteína del tipo bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (bphO-Az39) sin un rol propuesto.
2. El análisis filogenético de las secuencias identificadas en el genoma de *A. brasilense* Az39 permitió agrupar a esta bacteria en el mismo clado o clado cercano con microorganismos pertenecientes al mismo género bacteriano; sin embargo, no existen reportes bibliográficos publicados previamente en los microorganismos analizados para los que se haya asignado una posible función metabólica a tales proteínas, por lo que sigue siendo aun un campo de investigación poco explorado.

CAPÍTULO III: Comportamiento de *A. brasilense* Az39 en medio sólido y semi-sólido expuesto a diferentes calidades de luz

III.1. *A. brasilense* Az39 en la naturaleza.

Los microorganismos han desarrollado una diversidad de estrategias para adaptarse a los cambios espaciales y temporales en el medio ambiente (van der Horst et al., 2004). Algunas de estas estrategias implican cambios en los patrones de expresión génica y, por lo tanto, la implementación de respuestas adaptativas a largo plazo. Además, muchas bacterias pueden responder de forma rápida y transitoria a los cambios en el medio. Desde el punto de vista ecológico, *Azospirillum* sp. puede encontrarse libre en el suelo, en la rizosfera, sobre la superficie de raíces o en el rizoplaneo, como microorganismo epifítico, así como también en el interior de los tejidos vegetales, como microorganismo endofítico (Kado, 1991). Dentro de este tipo de asociación, se consideran tallos, hojas y principalmente semillas de cereales y gramíneas forrajeras. También se ha aislado de plantas de coco, verduras, frutas, leguminosas, plantas de tubérculos y en lagos de agua dulce (Bashan y de-Bashan, 2010). El crecimiento de este microorganismo en la rizósfera está determinado fundamentalmente por la disponibilidad de sustratos que estén presentes en el medio rizosférico y que sean necesarios para su desarrollo. Diversas sustancias de origen vegetal y microbiano presentes en la rizósfera pueden afectar el desarrollo de estas bacterias mediante efectos estimuladores e inhibidores del crecimiento.

III.1.1. Comportamiento de *Azospirillum* sp. frente a diversas condiciones ambientales

Como se mencionó anteriormente bacterias del género *Azospirillum* sp. son microorganismos rizosféricos que prefieren la rizosfera y los sitios o espacios cercanos a la raíz y no el suelo sin influencia de las plantas, donde sobrevive pobremente. Sin embargo, una fracción de la población es capaz de persistir en el suelo bajo estas condiciones (Bashan, 1998). Existe suficiente evidencia de la capacidad que poseen microorganismos pertenecientes al género *Azospirillum* para responder a diferentes condiciones ambientales en el espacio en el que se encuentran, tales como la temperatura, variaciones de pH, disponibilidad de nutrientes, presencia de competidores biológicos, concentración de metales, restos de pesticidas, herbicidas, entre otros factores presentes bajo las condiciones de crecimiento (Bashan et al., 2004; Malhotra y Srivastava 2008). Así, la capacidad de poder acumular grandes cantidades de PHA (poli- β -hidri-alcanoatos), o formar agregados masivos, flóculos o formas C (quistes), sintetizar determinadas moléculas del tipo fitohormonas bajo condiciones de estrés,

permitirían a estos microorganismos evadir condiciones no favorables para la supervivencia, prolongando su tiempo de vida en ausencia de la influencia directa de las plantas (Bashan et al., 2004).

III.1.1.1. Influencia de la luz en el sistema suelo

La luz puede penetrar varios centímetros por debajo de la superficie del suelo. El crecimiento, desarrollo y comportamiento de las raíces de las plantas se ven marcadamente afectados por la luz a pesar de su estilo de vida subterráneo, como así también aquellos microorganismos asociados a la raíz o habitantes de la rizosfera (Mo et al., 2015). Se sabe que las raíces, órganos subterráneos de todas las plantas terrestres, no crecen en un ambiente completamente oscuro o privado de luz. En realidad, la luz solar puede penetrar varios milímetros debajo de la superficie del suelo, afectando el desarrollo de la arquitectura de las raíces y guiando la dirección de crecimiento de las mismas (Woolley y Stoller, 1978; Tester y Morris, 1987). Cuando la luz del sol alcanza el suelo, los caracteres espectrales de la luz se alteran con la profundidad debajo de la superficie. Esta transmisión de fotones entre las partículas del sustrato y las plantas, terminan siendo captadas por los microorganismos presentes en el suelo y afectando a aquellos grupos con hábitos de crecimiento cercanos a la superficie del suelo. En general, parece que cantidades de luz fisiológicamente y ecológicamente significativas rara vez penetran más de 4-5 mm a través del suelo y cualquier penetración más allá de los 10 mm generalmente no sería significativa (Tester y Morris, 1987); sin embargo, los fotones de correspondientes a la fracción del rojo y rojo lejano del espectro, podrían penetrar más profundamente que los fotones de la fracción azul. Por otro lado, ha sido recientemente comprobado que el tejido vascular de las plantas superiores puede conducir la luz hacia las raíces y su zona de influencia donde, nuevamente, la luz roja a roja lejana alcanzarían una distancia de penetración mayor que la de la luz azul, logrando hacer contacto y ejerciendo un efecto mayor sobre aquellos organismos presentes en la rizósfera (Sun et al., 2003, 2005; Klein, 2016).

III.1.2. *Azospirillum* en condiciones naturales y su utilización en prácticas agrícolas.

En la actualidad, *Azospirillum* sp. es uno de los géneros mejor estudiados entre las rizobacterias no-fotosintéticas promotoras del crecimiento vegetal. Un logro importante de la

investigación básica realizada sobre esta bacteria, ha sido su utilización para la formulación de inoculantes en más de 3.0 millones de hectáreas en Sudamérica, (Cassán y Díaz Zorita, 2016). En las últimas dos décadas en particular, se han desarrollado diferentes prácticas de inoculación con esta bacteria y otras bacterias promotoras del crecimiento destinadas al tratamiento de cultivos en condiciones agronómicas, dentro de las que se incluyen el tratamiento de semillas al momento de la siembra (inoculación clásica o convencional); el tratamiento anticipado de semillas (tratamiento industrial); la aplicación de bacterias en línea de siembra (inoculación en surco) o la inoculación foliar, entre otros. En todos los casos, los inoculantes formulados con esta bacteria han tenido mayoritariamente como cultivos blanco, cereales y gramíneas invernales y estivales, y ciertas leguminosas en asociación con rizobios, lo que se conoce como co-inoculación.

En particular, la co-inoculación de semillas de soja o el tratamiento foliar con *Azospirillum* luego de la inoculación tradicional con rizobios, ha mejorado el desarrollo de la planta en condiciones controladas y el rendimiento de éste cultivo en condiciones agronómicas (Puente et al., 2017 y 2018). Con respecto a la inoculación foliar, podemos mencionar que *Azospirillum* sp. permanece en la superficie de la hoja al menos por 72 horas antes de colonizar los tejidos de las plantas (Puente et al., 2017) y en tales condiciones, los factores ambientales a los que la planta es expuesta, tales como la luz, temperatura, potencial hídrico de la hoja, presencia o ausencia de nutrientes etc., son limitantes para la supervivencia bacteriana y el proceso de colonización, luego de la inoculación. Para bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* sp., es escasa o casi nula la información referida al efecto de la luz visible o de diferentes longitudes de onda sobre el crecimiento, viabilidad o movilidad de la bacteria en ambientes naturales o en condiciones experimentales controladas y solo hay un reporte descrito en la literatura por Kumar et al., (2012), quienes informan que uno los bacteriofitocromos (AbBph1) sería requerido por *A. brasilense* Sp7 para lograr la supervivencia de la bacteria en medio de cultivo mínimo bajo exposición a luz roja; sin embargo, no estaría involucrado en la síntesis de pigmentos del tipo carotenoides como ocurre en *D. radiodurans* (Davis et al., 1999). Esto claramente indica la necesidad inminente de comprender la respuesta bacteriana a diferentes longitudes de onda en condiciones controladas o *in vitro*, como etapa de ajuste y paso necesario para comprender el efecto de la luz en condiciones más complejas del suelo o *in planta*.

III.1.3. Movilidad en *Azospirillum* sp.

Tal como ya se ha mencionado previamente, las bacterias del género *Azospirillum* tienen capacidad de moverse en medio de cultivo líquido mediante la utilización de un flagelo polar o en medio semisólido por la presencia de múltiples flagelos laterales (Moens et al., 1995). En las bacterias móviles, las respuestas adaptativas transitorias incluyen la capacidad de las mismas para nadar o movilizarse hacia zonas con prevalencia de condiciones favorables (taxis), como en el caso de la quimiotaxis, cuando las bacterias se mueven siguiendo gradientes positivos de efectores químicos, aerotaxis cuando responden a gradientes de oxígeno o fototaxis cuando responden a gradientes de luz, etc, por otro lado, ciertas bacterias tienen capacidad de alejarse de ciertas condiciones consideradas perjudiciales para ellas, lo que se considera un mecanismo de respuesta evasiva o de escape (Wadhams y Armitage, 2004).

En este capítulo se abordó el tercer objetivo específico de la Tesis relacionado con la evaluación del crecimiento de *A. brasilense* Az39 en diferentes condiciones de cultivo asociadas con la exposición a la luz. Inicialmente, se analizará el comportamiento de la bacteria en medio de cultivo sólido y semi-sólido.

III.2. Materiales y Métodos

III.2.1. Material Biológico

A. brasilense Az39, se obtuvo de la Colección de Cultivos del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA-IMyZA, Castelar, Buenos Aires.

III.2.2. Evaluación del comportamiento de Az39 en Medio de Cultivo sólido

III.2.2.1. Condiciones generales de cultivo.

A partir de una placa de *A. brasilense* Az39, se tomó una colonia aislada típica y se colocó en un tubo de ensayo con medio de cultivo Luria Bertani (LB) estéril (Bertani, 1951); se llevó a la cámara de cultivo durante 24 h a 36°C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial tardía (DO₅₉₅ 1.2). Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó 40 µl del pre-inóculo y se trasvasó a un tubo conteniendo medio LB estéril que nuevamente se incubó a 36°C y oscuridad, hasta alcanzar una fase exponencial (DO₅₉₅ aprox. 1,7) equivalente

a un título de $4 \cdot 10^8$ ufc.ml⁻¹. Este sistema se utilizó como modelo experimental para la provisión de inóculo en la mayoría de los ensayos de ajuste metodológico desarrollados en etapas iniciales, los que incluyeron: (1) evaluación del tipo y calidad de luz utilizada para la exposición de la bacteria así como la (2) selección del medio de cultivo (3) tiempo de exposición y otros parámetros de ajuste que se describirán a continuación de acuerdo al orden de importancia. Los componentes y características del medio LB, están descritos en **Anexo n°1**.

III.2.2.1.1. Tipo y calidad de luz

Estos ensayos se realizaron con el objetivo de seleccionar el tipo de fuente lumínica y longitud de onda que determinan un efecto sobre el crecimiento y desarrollo de *A. brasilense* Az39. Para ello, a partir del cultivo puro de Az39 obtenido tal como se describió previamente, se realizó diluciones seriadas en solución fisiológica estéril hasta obtener una concentración de 10^{-7} . Luego, de cada dilución se sembró una alícuota de 20 µl por triplicado para el recuento a través de la técnica de microgota (Rivera et al., 2014), en placas de Petri conteniendo medio LB, modificado con la adición de 15 mg.l⁻¹ de Indicador Rojo Congo (LB-RC), según Molina et al., (2014). Luego de la siembra, las placas se depositaron en cámara de cultivo a 36°C de acuerdo a los siguientes tratamientos:

1. Oscuridad
2. Luz blanca [75 wt]
3. Luz roja [PAR 38]
4. Luz azul [PAR 38]
5. Luz Roja + Azul [PAR 38] en una relación 22:6

La exposición a las diferentes fuentes lumínicas se realizó durante 72 h y a una distancia desde la fuente de 22,5 cm. En el caso del tratamiento en condiciones de oscuridad, la placa fue envuelta en papel de aluminio y mantenida en las mismas condiciones experimentales del resto de los tratamientos. Para medir las longitudes de onda generadas en cada condición experimental, se utilizó un espectrofotómetro marca Vernier, modelo Spectro Vis-Plus (USA) y la intensidad de cada una de estas longitudes de onda se midió con un Luxómetro Tenmars, modelo TM-201 (Taiwan). Los componentes y características del medio de cultivo LB-RC y del indicador Rojo Congo están descritos en los **Anexo n°2**

III.2.2.1.2. Medios de cultivo

El objetivo de este experimento fue evaluar la respuesta de la bacteria cultivada en diferentes medios de cultivo, nutricionalmente complejos o mínimos a diferentes longitudes de onda. Para ello, a partir de un cultivo puro de Az39 se realizó diluciones seriadas hasta el orden de 10^{-7} como se describió. Alícuotas de 20 μ l de cada dilución se sembró por triplicado en diferentes medios de cultivo, para su evaluación y comparación. Los medios utilizados fueron: LB (medio Luria Bertani) considerado nutricionalmente rico; medio LB modificado por la adición de 15 mg.l^{-1} de Indicador Rojo Congo (LB-RC); medio MMAB, considerado nutricionalmente mínimo (Vanstockem et al., 1987), y MMAB modificado por la adición de adición de 15 mg.l^{-1} de Rojo Congo (MMAB-RC). Una segunda estrategia experimental se direccionó a comprobar si la presencia de ciertos componentes del medio LB podían cambiar la respuesta bacteriana a la luz y para ello se utilizaron diluciones al 25% y 50% (v/v) del medio original, en presencia o ausencia del indicador rojo congo. Por otro lado y con una lógica similar se utilizó medio mínimo MMAB que se modificó (enriqueció) con el agregado de relaciones volumétricas crecientes de medio LB al 25, 50 y 75% en presencia y ausencia del indicador Rojo Congo en luz blanca (75 W) o azul PAR38. En los casos anteriores, se expuso a luz blanca (75 w), roja (PAR38) y azul (PAR38) se realizó como se describió en III.2.2.1 y para cada experimento se incluyó un control mantenido en oscuridad a una distancia de la fuente de 22,5 cm, a 36°C. **Anexo n°3 y 4**

III.2.2.1.3. Temperatura de incubación

Este experimento se realizó con el objeto de determinar si la temperatura de incubación del microorganismo es un factor que modifica la respuesta bacteriana a la exposición a la luz. Para ello, a partir del cultivo puro de Az39 se realizó diluciones seriadas en solución fisiológica estéril como se describió previamente. Una alícuota de 20 μ l de cada dilución se sembró en los medios LB, LB-RC; MMAB y MMAB-RC a 28°C y 36°C, para el recuento celular a través de la técnica de microgota. La exposición a luz blanca, roja y azul se realizó como se describió en el ítem III.2.2.1 y para cada experimento se incluyó un control mantenido en oscuridad, a una distancia de la fuente de 22,5 cm

III.2.2.1.4. Tiempo de exposición

Este experimento se hizo con el objeto de determinar el tiempo mínimo necesario para generar un cambio visible en el crecimiento bacteriano por la de exposición a las diferentes fuentes lumínicas. Para ello, se partió de un cultivo puro de Az39 del que se realizó diluciones decimales en solución fisiológica estéril, tal como se describió. De cada dilución se sembró por triplicado alícuotas de 20µl en placas de Petri conteniendo medio agarizado LB-RC, de acuerdo al procedimiento de recuento por microgota. Luego de sembradas, las placas se dispusieron en cámara de cultivo y fueron cubiertas de la luz (envueltas con papel de aluminio) luego de 2, 4, 8 y 24 h de exposición. Desde el inicio del experimento, se mantuvo una placa expuesta a cada longitud de onda y otra en oscuridad (envuelta en papel aluminio) como controles. La exposición a las diferentes fuentes lumínicas se realizó como se describió en el ítem III.2.2.1, a una distancia de la fuente de 22,5 cm a 36°C.

III.2.2.1.5. Disposición de las placas en la cámara de cultivo.

Este experimento se hizo con el objeto de evaluar si la forma de cultivo determinaba cambios en la respuesta de la bacteria a la luz. A partir de un cultivo puro de Az39 se realizó diluciones decimales en solución fisiológica estéril como se describió. Luego se sembró por triplicado alícuotas de 20 µl en placas de Petri conteniendo los medios LB, LB-RC, MMAB y MMAB-RC y se dispusieron en cámara de cultivo de tres maneras diferentes: vertidas (con la tapa hacia arriba), invertidas (con la tapa hacia abajo) y vertidas sin la tapa. Para todos los casos, el control se realizó en condiciones de oscuridad a la misma temperatura de cada tratamiento. Las fuentes lumínicas fueron las mismas que las detalladas en el ítem III.2.2.1.1 y la distancia desde la fuente, así como el tiempo y temperatura de incubación se describen en el inciso III.2.2.1.2.

III.2.2.1.6. Distancia a la fuente lumínica.

Este experimento se hizo con el objeto de evaluar si la distancia de exposición a la luz, como intensidad de exposición, determinaba cambios en la respuesta de la bacteria a cada longitud de onda. Por ello, a partir del cultivo puro de Az39 se realizó diluciones decimales en solución fisiológica hasta una concentración de 10^{-7} , como se describió. Luego, se sembró por triplicado alícuotas de 20 µl en placas de Petri conteniendo medio MMAB, y se expuso a luz azul (PAR

38) o blanca (75 w) a diferentes distancias desde la fuente y a una temperatura constante de 36°C. El control se realizó en condiciones de oscuridad como se describió. La distancia desde la fuente hasta la placa de cultivo fue establecida en cuatro puntos para cada longitud de onda, lo que representó cuatro valores de intensidad para cada longitud de onda como se detalla a continuación en la Tabla 5.

Tabla 5. Distancias (cm) desde la fuente a la placa de cultivo y su equivalente en $\mu\text{W}/\text{mm}^2$

Longitud de onda	Distancia (cm)/Intensidad ($\mu\text{W}/\text{mm}^2$)			
Luz blanca 75 w	10 cm/67 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	18 cm/59,5 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	22,5 cm/56 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	27 cm/25 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$
Luz azul PAR38	10 cm/51 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	18 cm/43 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	22,5 cm/11 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$	27 cm/8 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$

III.2.2.2. Evaluación de la movilidad por swimming (natación)

Con el objetivo de asociar algún tipo de respuesta fisiológica de *A. brasilense* Az39 por la exposición a diferentes longitudes de onda, se llevó a cabo una serie de experimentos destinados a evaluar la capacidad de la bacteria para movilizarse por un mecanismo de natación o "swimming" por exposición a luz blanca, roja y azul y en relación al mismo comportamiento en condiciones de oscuridad. Para esto, a partir de un cultivo puro de *A. brasilense* Az39 en fase exponencial obtenido en medio de cultivo líquido LB (Bertani, 1951), se sembró 1 μl de pre-inóculo en medio de cultivo Swim (Atkinson et al., 2006) modificado por la adición de 0,3 % de agar (p/v), para observar la capacidad de natación del microorganismo o "swimming". Luego de la siembra, las placas fueron incubadas a una temperatura de 36 ± 2 °C y expuestas a luz blanca (75 w), azul (PAR38), roja (PAR38) y oscuridad (control) durante 72 h. Los resultados fueron cuantificados midiendo el diámetro (cm) del halo de desplazamiento de acuerdo al procedimiento descrito por Atkinson et al., (2006). Este ensayo se llevó a cabo por triplicado para cada condición de cultivo. A continuación se describe el método mediante el cual se llevo a cabo el experimento. Los componentes y características del medio de cultivo Swim, están descritos en **Anexo n°5**

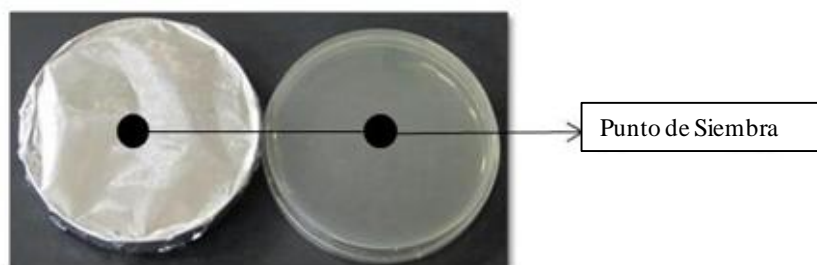


Figura 14. Evaluación de la capacidad de natación (swimming) de *A. brasilense* Az39. A la izquierda se observa una placa con medio de cultivo Swim envuelta en papel de aluminio, lo que representa el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad (control). A la derecha, se observa una placa sin envolver que será expuesta a una condición de luz. En ambos casos se indica el punto de siembra en la placa.

III.2.2.3. Evaluación de la fototaxis en medio semisólido.

Una segunda estrategia experimental se basó en verificar la capacidad de Az39 para detectar modificaciones en el medio de cultivo por la sub-exposición o exposición parcial a una condición lumínica como factor “atractante” o fototáctico para la bacteria. Para esto, las placas con medio de cultivo conteniendo 0,3 % de agar (p/v), como se describió en III.2.2.2, se dividieron en partes iguales y se sembró una alícuota de 1 μ l de un cultivo puro de *A. brasilense* Az39 en fase exponencial en el centro hipotético de una de las mitades de la placa como se observa en la Figura 15. La mitad inoculada fue cubierta con papel de aluminio para generar condiciones de limitación de luz; mientras que la otra mitad de la placa fue expuesta a luz blanca, azul o roja, de acuerdo al tratamiento. Como control, se utilizó placas envueltas por completo con papel de aluminio. Todas las placas se incubaron a 36 ± 2 °C durante 72 h y los resultados fueron cuantificados midiendo el diámetro (cm) del halo de desplazamiento en la mitad cubierta de la placa. Este ensayo se realizó por triplicado para cada condición experimental.

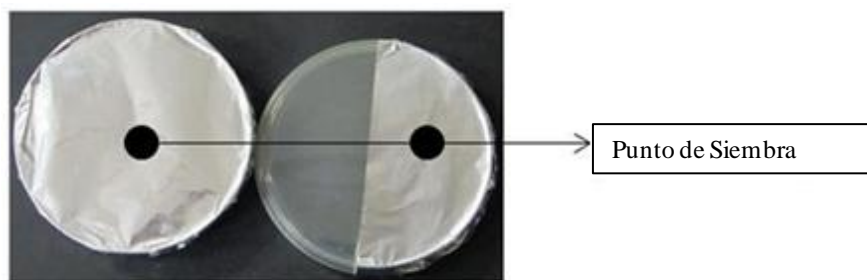


Figura 15. Evaluación de la capacidad fototáctica de *A. brasilense* Az39. A la izquierda se observa una placa con medio de cultivo Swim envuelta en papel de aluminio lo que representa el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad (control). A la derecha se observa una placa con el mismo medio de cultivo parcialmente cubierta y que será expuesta a la fuente lumínica. En ambos casos se indica el punto de siembra en la placa.

III.2.3. Análisis estadístico de la información

Para la interpretación de los datos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y un Test HSD Tukey, con un nivel de confianza del 95%. Los análisis fueron realizados mediante el software InfoStat-Statisticaly. Las gráficas fueron desarrolladas empleando el software GraphPad Prism 5.0.

III.3. Resultados

III.3.1. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio agarizado

III.3.1.1. Tipo y calidad de luz

El objetivo de este experimento fue establecer la capacidad de *A. brasilense* Az39 para crecer en medio sólido expuesto a diferentes longitudes de onda. La Figura 16 muestra el efecto de los diferentes tipos de luz sobre el crecimiento de Az39 en medio LB-RC.

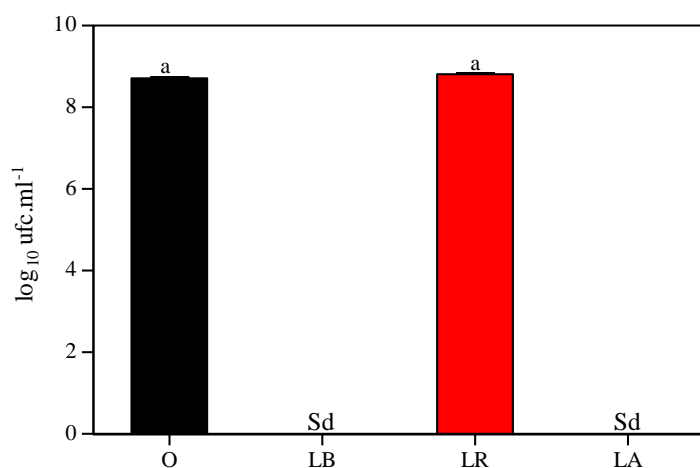


Figura 16. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) en medio de cultivo LB-RC de *A. brasilense* Az39 expuesta a luz blanca (LB), roja PAR38 (LR), azul PAR38 (LA). En todos los casos el control fue mantenido en condiciones de Oscuridad (O). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar de un total de 4 repeticiones. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

En ensayos preliminares (datos no mostrados), se observó que la mezcla de luz roja y azul resultaba letal para esta bacteria, lo cual llevó a determinar cual componente de la mezcla era el responsable de dicho efecto. En tal sentido y como se observa en la Figura 16, la luz azul

generó un efecto inhibitorio para el crecimiento, al igual que la luz blanca. Por el contrario, no se registró diferencias significativas ($p < 0.05$) a nivel de la producción de biomasa o el número de células por unidad de volumen, cuando esta bacteria fue expuesta a la luz roja o se mantuvo en condiciones de oscuridad. Como parte de la búsqueda del tipo de longitud de onda responsable del efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano, se procedió a evaluar los espectros de emisión de cada una de las fuentes lumínicas con las que se llevaron a cabo los experimentos.

III.3.1.2. Espectros de Emisión

La Figura 17 contiene los espectros de emisión obtenidos de las fuentes lumínicas empleadas en los experimentos, luz roja (PAR38), azul (PAR) 38 y luz blanca (75 W).

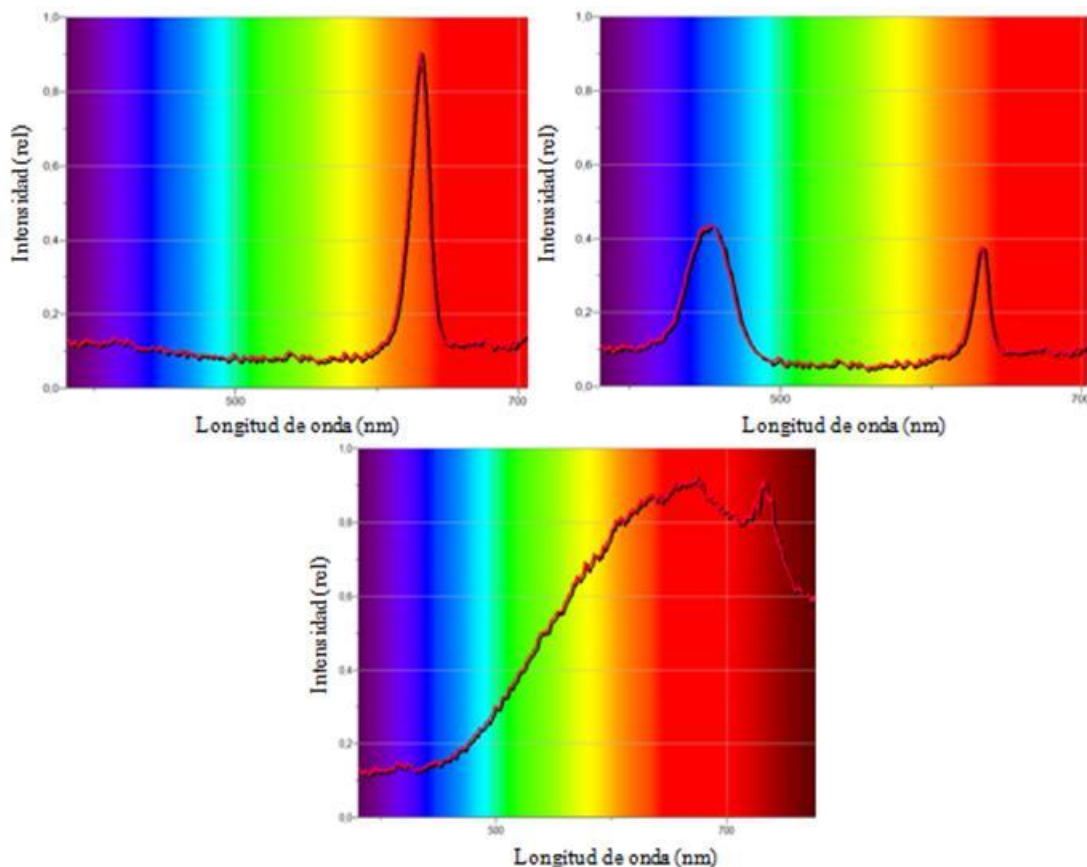


Figura 17. Espectro de emisión de la fuente de luz roja a 650 nm [fila superior izquierda], luz azul a 450 nm [fila superior derecha] y luz blanca [fila Inferior]

En la Figura 17 se observa el espectro de emisión de luz roja (PAR 38) en el cual se determinó la presencia de un pico de intensidad a 650 nm. En el caso de la luz azul (PAR 38) el pico se determinó entre 450 y 500 nm, pero adicionalmente se observó un segundo pico de menor intensidad a los 650 nm, que correspondería a la luz roja (PAR 38). Este pico, si bien despreciable en magnitud, sería el resultado de la utilización de filtros monocromadores, para la obtención de la luz azul a partir de una mezcla de luz azul y roja (22:6). En cuanto a la luz blanca, no se observó un pico predominante, ya que dicha luz está compuesta por todas las longitudes de onda existentes; sin embargo, se destaca un aumento gradual de la intensidad a partir de los 480 nm, lo que correspondería con la zona de intersección de la luz azul y quizás la longitud de onda de mayor letalidad para esta bacteria.

III.3.1.3. Medios de cultivo

El objetivo de este experimento fue evaluar la respuesta de la bacteria a diferentes longitudes de onda y cultivada en medios nutricionalmente complejos o mínimos. La Figura 18 resume el efecto de cada longitud de onda sobre el crecimiento de *A. brasilense* Az39, cultivado en los medios nutricionalmente mínimos MMAB y MMAB-RC o complejos LB y LB-RC

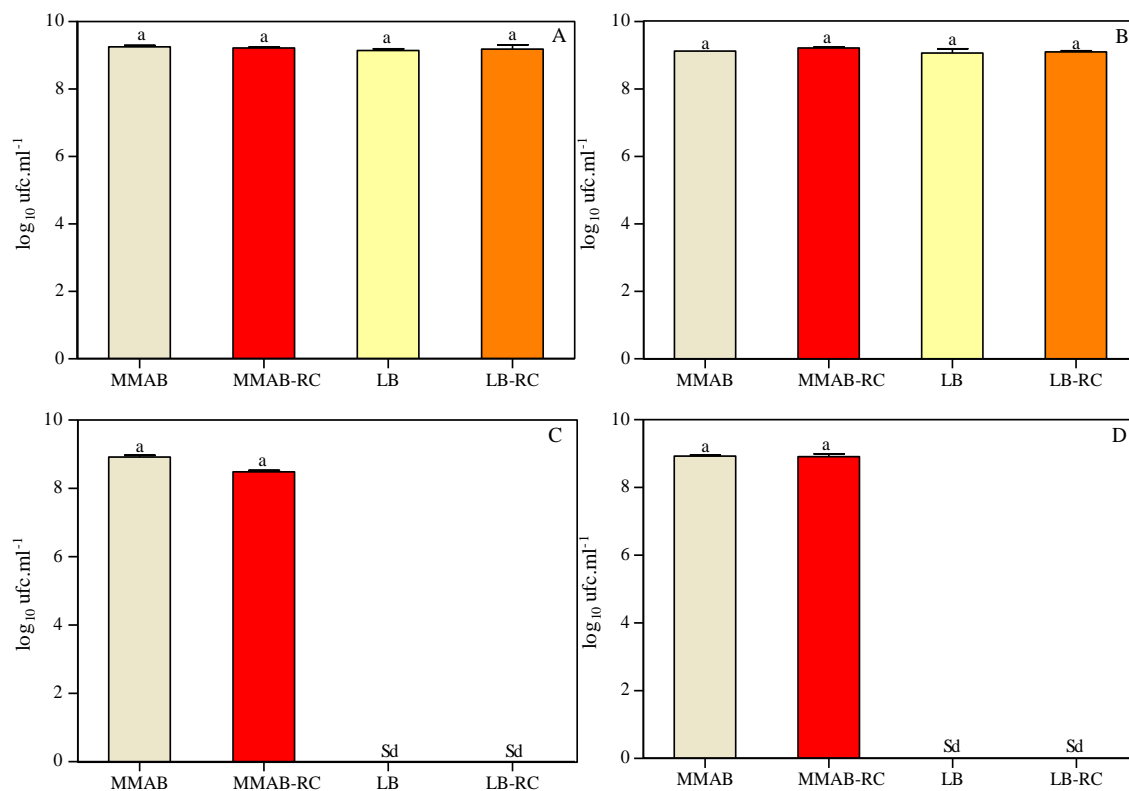


Figura 18. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en los medios MMAB, MMAB-RC, LB y LB-RC, y expuesto a los diferentes tipos de luz roja PAR38 (B), azul PAR38 (C) y blanca (D). En todos los casos el control fue en condiciones de Oscuridad (A) y los tratamientos fueron incubados por 72 h a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

El crecimiento de *A. brasilense* Az39 no resultó afectado por la exposición a luz roja. No se observó diferencias estadísticamente significativas entre el control mantenido en condiciones de oscuridad y éste tratamiento a nivel del número de bacterias por unidad de siembra. Por otro lado, la luz azul PAR38 resultó letal para este microorganismo, cuando el mismo creció en los medios nutricionalmente complejos LB y LB-RC. Este mismo comportamiento se observó cuando la bacteria fue expuesta a la luz blanca. En contrapartida, no se evidenció un efecto deletéreo sobre el crecimiento de la bacteria, cuando la misma fue expuesta a la luz azul o blanca pero cultivada en medio mínimo MMAB o MMAB-RC. Sobre la base de estos resultados, se realizó una serie de ensayos complementarios para determinar si la composición del medio de cultivo era la responsable de tal diferencia.

III.3.1.4. Dilución del medio nutricionalmente complejo

La Figura 19 muestra el efecto del tipo de luz sobre el crecimiento de *A. brasilense* Az39 en medios LB y LB-RC diluïdos al 25%, 50% y 75%, con agua destilada estéril (v/v).

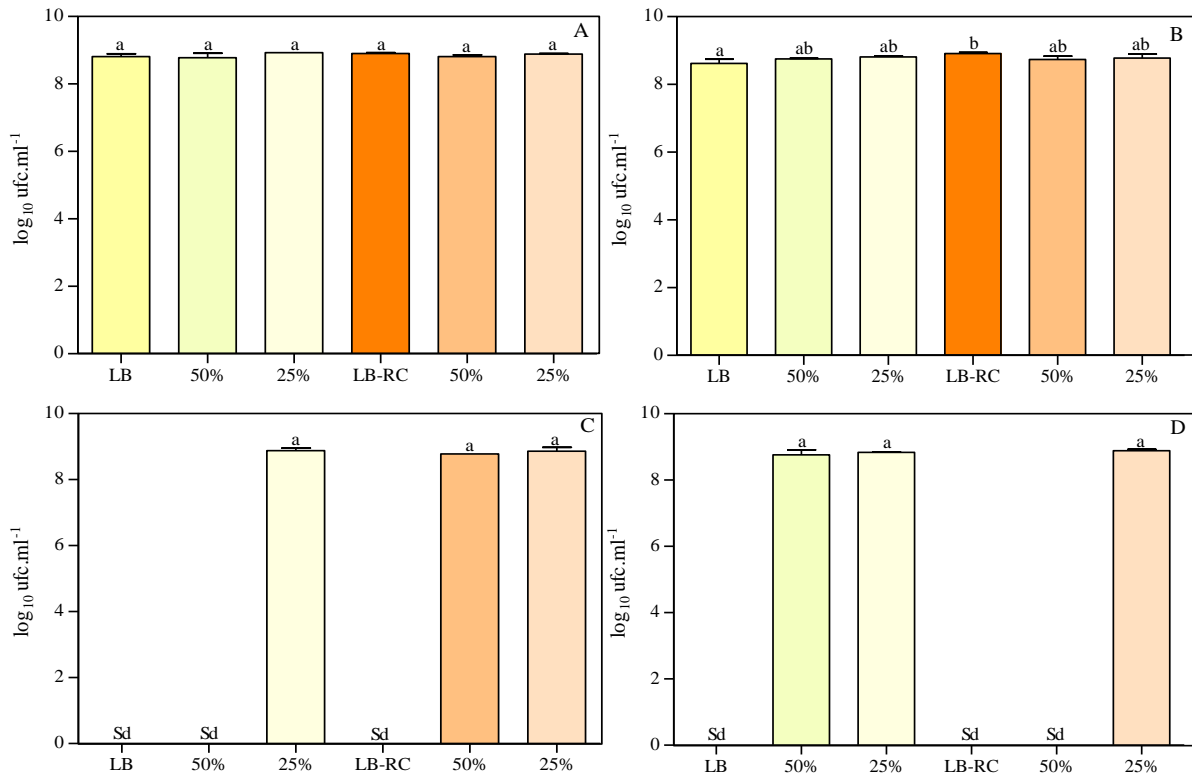


Figura 19. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en los medios LB y LB-RC al 50% y 25% (v/v) expuestos a luz roja PAR38 (B), azul PAR 38 (C) y blanca (D). En todos los casos el control fue desarrollado en condiciones de oscuridad (A). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm a la fuente. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como lo muestra la Figura 19, el crecimiento de *A. brasilense* Az39 expuesto a la luz roja, no resultó afectado y tuvo un comportamiento similar al control, mantenido en condiciones de oscuridad. Por otro lado, la luz azul resultó letal para este microorganismo cuando el mismo creció en los medios LB y LB-RC diluídos al 50% de la formulación original y a diferencia de la luz blanca que solo inhibió el crecimiento en el medio LB sin diluir. Por otro lado, cuando la bacteria creció en medio LB modificado con la adición de indicador Rojo Congo, se visualizó dos comportamientos al ser expuesta a la luz azul y blanca. Por un lado, frente a la luz azul, cuando creció en LB-RC diluído al 50% se observó desarrollo; mientras que al crecer expuesta a luz blanca, no se observó crecimiento en este medio de cultivo. De manera general

y con los resultados obtenidos asumimos que el efecto que genera cada tipo de luz sobre la bacteria es dependiente del medio de cultivo en el que ésta crece.

III.3.1.5. Enriquecimiento del medio mínimo

La Figura 20 muestra el efecto de la luz azul y blanca sobre el crecimiento de *A. brasilense* Az39 en medio mínimo MMAB modificado por la adición de diferentes proporciones del medio complejo LB. Tales adiciones se realizaron al 25%, 50% y 75% de medio LB (v/v).

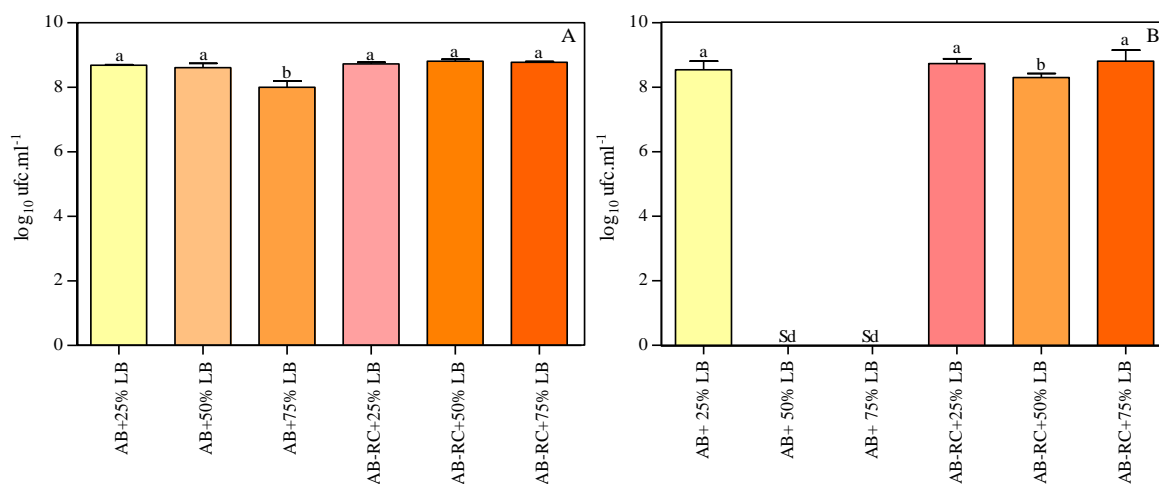


Figura 20. Evaluación del crecimiento ($\log_{10} \text{ ufc.ml}^{-1}$) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo MMAB (AB) y MMAB-RC (AB-RC) modificados por la adición de 25%, 50% y 75% de medio LB (v/v) y expuestos a luz azul PAR38 (A) y blanca (B). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de la fuente de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 20, el crecimiento de *A. brasilense* Az39 solo resultó afectado por la adición de un 75% de medio LB al medio mínimo MMAB en presencia de luz azul. Por otro lado cuando la bacteria fue expuesta a luz blanca, se observó una completa inhibición del crecimiento en medio MMAB modificado por la adición de 50% y 75% de medio LB. Por otro lado, solo hubo cambios significativos de sensibilidad en el medio formulado con el indicador Rojo Congo cuando se adicionó un 50% de medio LB al medio mínimo, pero esta tendencia se revirtió en la mayor proporción adicionada. Hasta aquí se podría inferir que el efecto de enriquecimiento del medio de cultivo sensibilizó gradualmente a las bacterias expuestas a la

luz blanca y en menor medida a las expuestas a luz azul y que la presencia del indicador RC podría cambiar éste comportamiento. Hasta aquí, se puede suponer que mientras más rico desde el punto de vista nutricional es el medio de cultivo en el que crece Az39, menos tolerante es a la condición de luz blanca o azul y probablemente ésto se deba a que en presencia de ciertos tipos y cantidades de nutrientes, el crecimiento de la bacteria y sobre todo la producción de compuestos de pared celular o extracelulares le otorgaría una condición inespecífica de tolerancia a la luz. En base a estos resultados, se consideró el desarrollo de un ensayo adicional que se resume en la Figura 21.

La Figura 21 muestra el efecto de la luz blanca sobre el crecimiento de *A. brasilense* Az39 en MMAB y MMAB-RC modificados por la adición de 25%, 30%, 40%, 45% y 50% de medio de cultivo LB (v/v). El objetivo de este experimento fue determinar la mínima proporción de medio LB que adicionado al medio mínimo es capaz de modificar el crecimiento y desarrollo de la bacteria, cuando es expuesta a luz blanca.

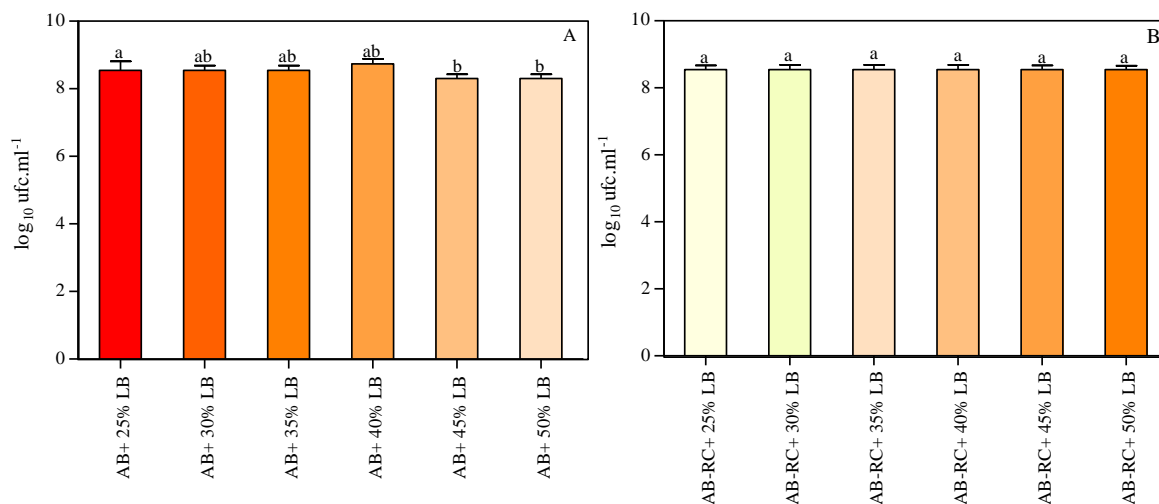


Figura 21. Evaluación del crecimiento ($\log_{10} \text{ufc.ml}^{-1}$) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo MMAB (AB) y MMAB-RC (AB-RC) modificados por la adición de 25%, 30%, 40%, 45% y 50% de medio LB (v/v) (A y B) y expuestos a luz blanca (75 W). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 21, el crecimiento de *A. brasilense* Az39 cuando se expuso a la luz blanca, disminuyó en medio MMAB modificado por la adición de medio LB (45-50%) en alrededor un 15%, aunque la luz blanca no tendría un efecto inhibitorio en medio MMAB modificado por la adición de medio LB y del indicador Rojo congo, ya que no se observó diferencias estadísticamente significativas en el recuento celular alcanzado en estas condiciones de crecimiento.

Considerando que la exposición de la bacteria a luz azul y blanca solo determinó un efecto inhibitorio del crecimiento por la adición de proporciones mayores al 50% de medio LB en medio mínimo MMAB (Figura 20 y 21) se llevó a cabo un análisis de las colonias obtenidas en cada tratamiento para comprobar, si independientemente del efecto de inhibición, se observaban cambios morfológicos entre los tratamientos. Ésto resume en Figuras 22 y 23.

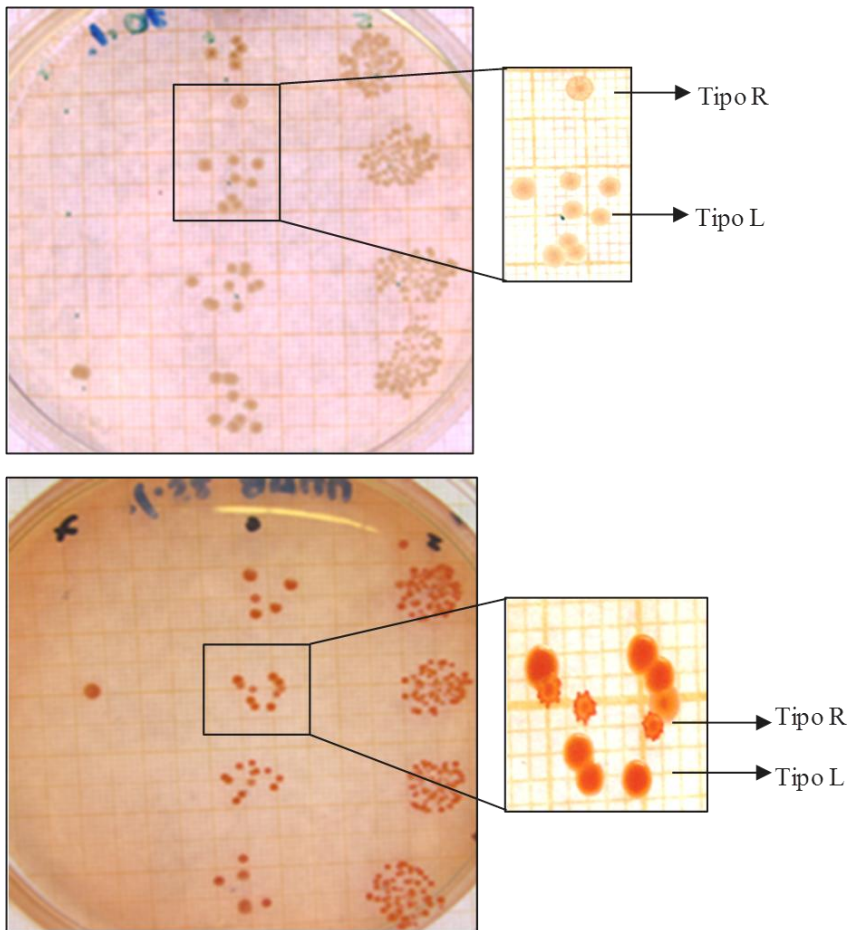


Figura 22. Parte superior: MMAB modificado por la adición de un 30 % de medio LB. Inset: colonias definidas como L (lisas) y R (rugosas) en la misma dilución de siembra. Parte inferior: MMAB-RC modificado por la adición del 25% de medio LB. Inset: colonias L y R en la misma dilución de siembra. (Fuente lumínica: luz blanca)

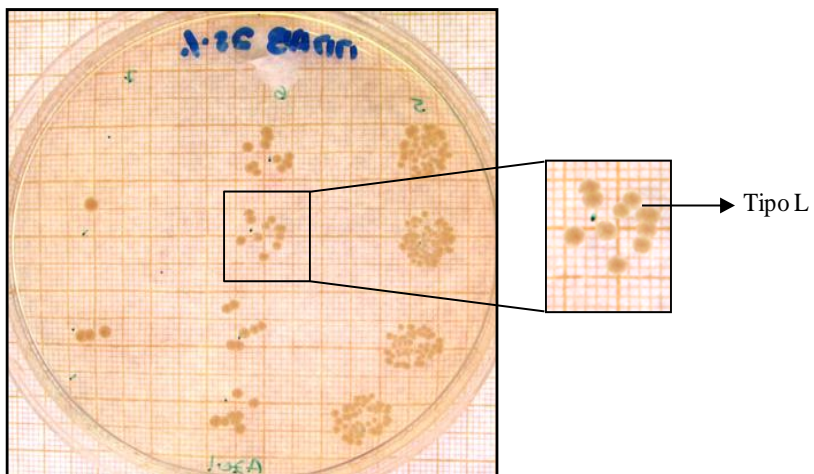


Figura 23. Medio MMAB modificado por la adición de 25% de medio LB. Inset: colonias L de tamaños no uniforme en la misma dilución de siembra. (Fuente lumínica: luz azul).

Del análisis realizado surge el hecho de que en condiciones de cultivo en medio mínimo MMAB modificado por proporciones entre 25-45 % de medio LB, la exposición a luz blanca determina un dimorfismo de colonias caracterizado por la presencia de colonias lisas (L) y rugosas (R), en una relación aproximada de 2:1; mientras que en medio MMAB modificado con un 50% de medio LB las colonias se observaron en su totalidad del tipo rugosas. Por el contrario, en luz azul, en medio MMAB modificado con concentraciones crecientes de medio LB y con o son indicador rojo congo, las colonias fueron del tipo lisa (L) en la totalidad de los casos.

III.3.1.6. Distancia a la fuente lumínica

Este experimento se hizo con el objeto de evaluar si la distancia de exposición a la luz, como intensidad de exposición, determinaba cambios en la respuesta de la bacteria a cada longitud de onda. La Figura 24 muestra el efecto de la luz azul (Par38) y blanca (75 W) sobre el crecimiento de *A. brasilense* Az39 en medio MMAB tras la exposición a diferentes intensidades.

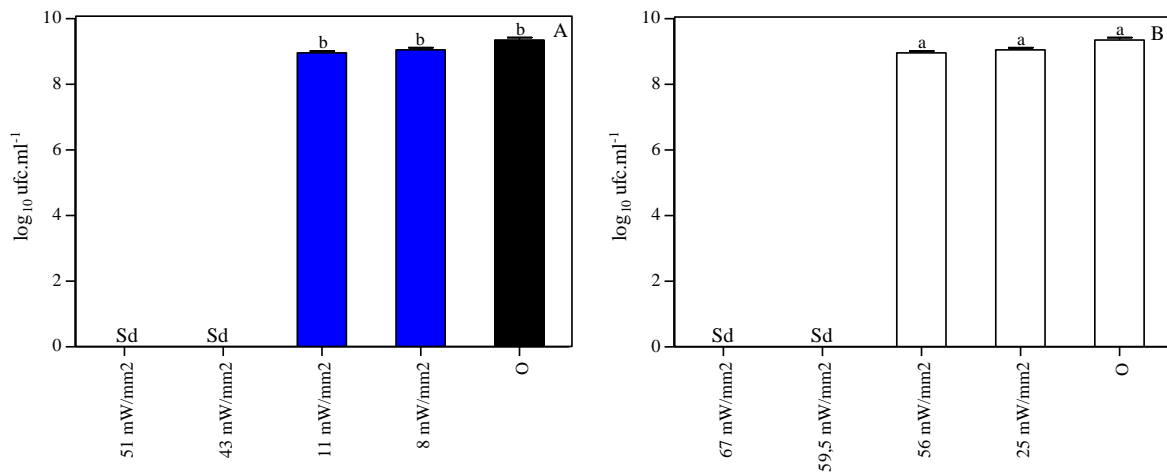


Figura 24. Evaluación del crecimiento ($\log_{10} \text{ufc.ml}^{-1}$) de *A. brasilense* Az39 en MMAB. Los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C. Las intensidades empleadas fueron 8, 11, 43 y 51 $\mu\text{W/mm}^2$ para luz azul PAR38 (A) y 25, 56, 59,5 y 67 $\mu\text{W/mm}^2$ para luz blanca (B). El control se mantuvo en condiciones de oscuridad. Las barras corresponden a la media \pm el

desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se puede observar, el crecimiento de la bacteria resultó inhibido a diferentes intensidades generadas luego de la exposición a la fuente de luz azul (PAR38) y blanca (75 W), correspondientes a 8 y 11 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ y 25 y 56 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ respectivamente; mientras que en intensidades superiores (43 y 51 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ [LA], 59,5 y 67 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ [LB]), el crecimiento no resultó modificado en cada condición lumínica, es decir a distancias menores, 10 y 18 cm, mayor fue la intensidad y daño a nivel de crecimiento. Estos resultados nos indican que frente a intensidades superiores a los 50 $\mu\text{W}/\text{mm}^2$ en luz azul y blanca, Az39 no fue capaz de crecer.

III.3.1.7. Temperatura de incubación

El experimento se realizó con el objeto de determinar si la temperatura de incubación del microorganismo es un factor que modifica la respuesta bacteriana a la exposición a la luz. La mayor parte de los experimentos previamente presentados fueron a una temperatura de 36°C ya que se considera óptima para el desarrollo de ésta bacteria; si embargo, en este ensayo se evaluó el comportamiento de la bacteria expuesta a la luz a una temperatura de 28°C en los mismos medios de cultivos sobre la base de que es la temperatura de cultivo óptima para numerosas bacterias de suelo. La Figura 25 muestra el efecto de la luz sobre el crecimiento de Az39 en medio MMAB, MMAB-RC, LB y LB-RC.

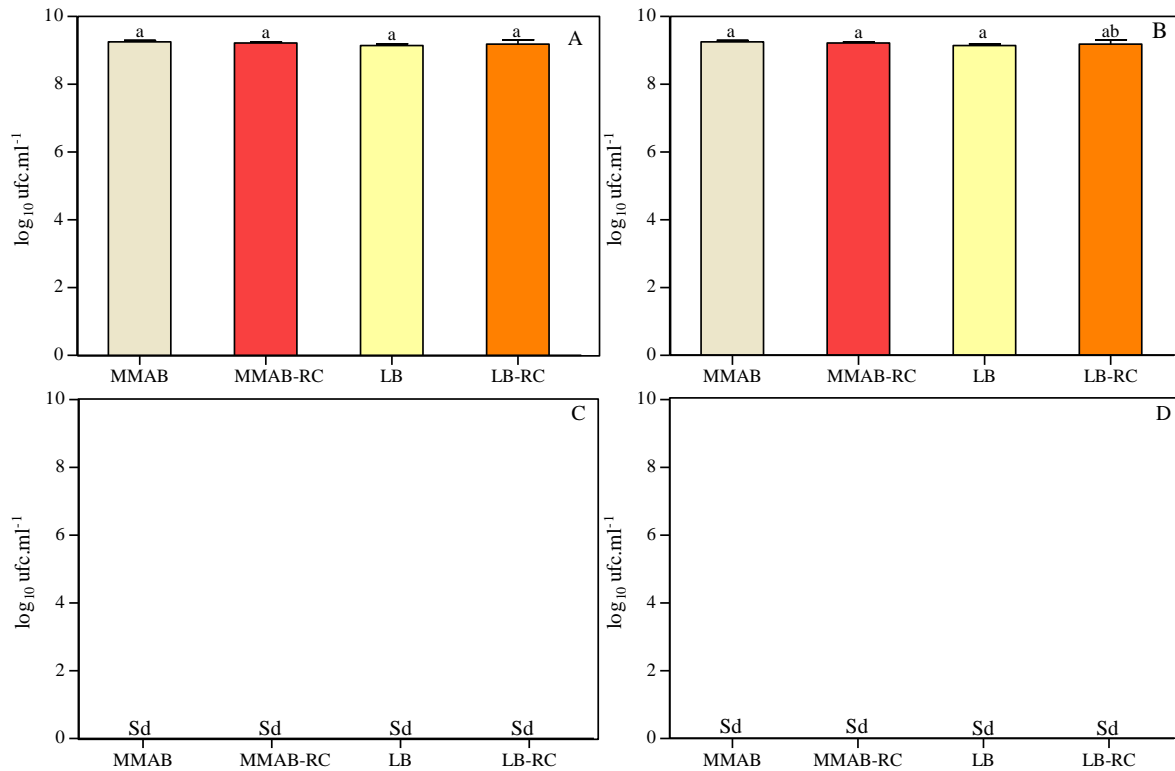


Figura 25. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en medio MMAB, MMAB-RC, LB y LB-RC, expuesto a luz roja (B), luz azul (C) y luz blanca (D). En todos los casos el control se mantuvo en condiciones de oscuridad (A). Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 28 °C y a una distancia de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se puede observar, el crecimiento de Az39 a 28 °C no resultó afectado en condiciones de oscuridad o por exposición a luz roja, tal como ocurrió cuando la bacteria se cultivó a 36°C. Contrariamente, hubo inhibición del crecimiento en todos los medios evaluados a una temperatura de incubación de 28°C cuando la bacteria se expuso a luz azul o blanca, lo que determinó una diferencia en el comportamiento observado a 36°C donde, la bacteria creció en medio MMAB expuesta a las mismas longitudes de onda. A partir de éste resultado, se podría considerar que a una temperatura de 28°C la bacteria no puede sobrevivir a la exposición de luz azul y blanca, lo que probablemente se relacione con la capacidad de este microorganismo de desencadenar una respuesta ambiental a una temperatura mayor de 36°C.

III.3.1.8. Tiempo de exposición

Este experimento se hizo con el objeto de determinar el tiempo mínimo necesario para generar un cambio visible en el crecimiento bacteriano por la de exposición a diferentes fuentes lumínicas. La Figura 26 muestra el efecto de las diferentes intensidades de luz sobre el crecimiento de *A. brasilense* Az39, en medio LB-RC.

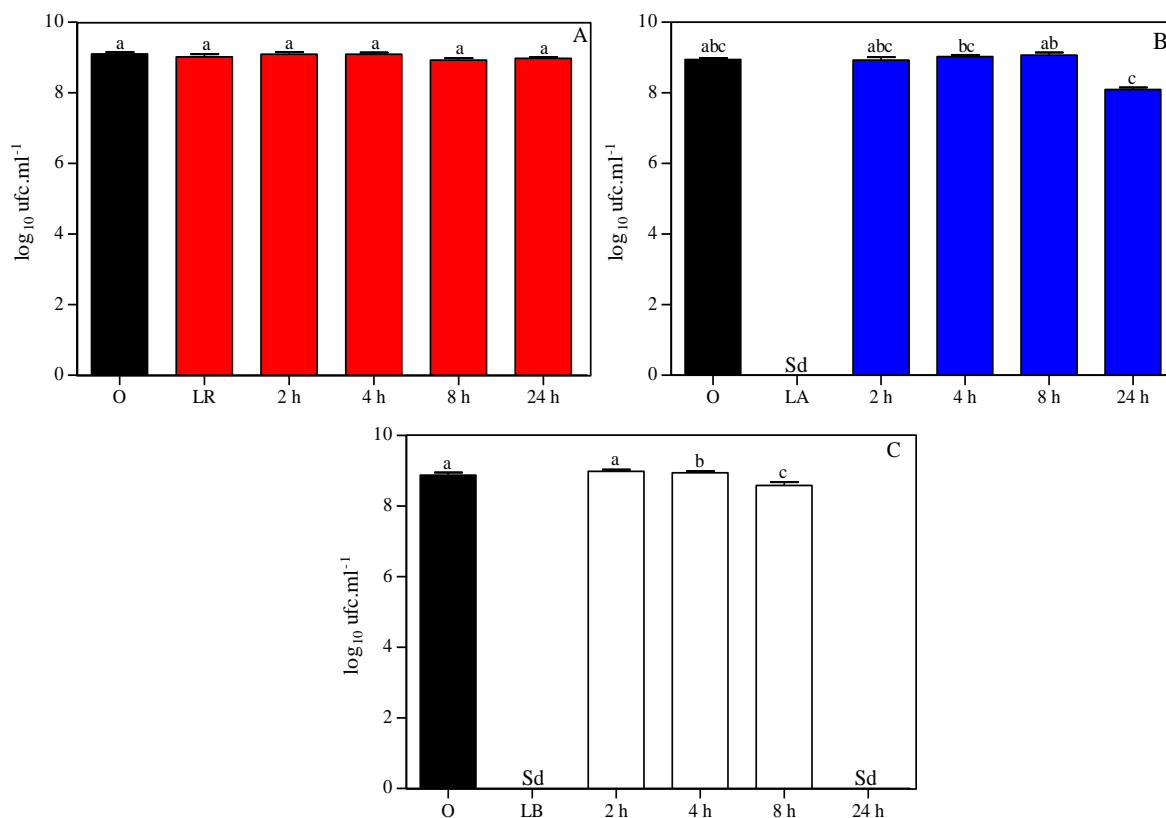


Figura 26. Crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en medio LB-RC, sometido a diferentes tiempos de exposición para cada fuente lumínica. En todos los casos el control se desarrolló en condiciones de oscuridad. Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm desde la fuente. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 26, la luz blanca resultó ser letal para el crecimiento de este microorganismo luego de permanecer expuesto a esta longitud de onda al menos por 24 hs. Paralelamente, al mismo tiempo de exposición (24 h), la luz azul no fue letal para la bacteria, pero generó una disminución en el recuento celular (ufc.ml⁻¹), probablemente debido al inicio

del proceso de daño celular mediado por estrés fotooxidativo. En el caso de la luz roja, no se observó inhibición del crecimiento en ninguno de los tiempos de exposición evaluados, destacándose un comportamiento similar al obtenido en el tratamiento control, mantenido en condiciones de oscuridad desde el inicio del ensayo. Estos resultados nos permiten considerar que el tiempo de exposición a la luz sería un factor determinante para establecer el efecto de letalidad o inhibición del crecimiento en condiciones de luz blanca, siendo el tiempo mínimo de exposición de al menos 24 horas. En el caso de la luz azul, no se observó inhibición hasta ese mismo período de tiempo, por lo que probablemente el tiempo de exposición requerido para la inhibición sea mayor, en comparación al de la luz blanca.

III.3.1.9. Disposición de las placas en la cámara de cultivo.

El objetivo de este experimento fue determinar si la capa de Agar generada en la preparación del medio de cultivo en las placas invertidas (tapa hacia abajo) o la tapa de las placas de Petri en condiciones vertidas, podrían interferir en el efecto de la luz sobre la bacteria. La Figura 27 muestra el efecto de cada tipo de luz sobre el crecimiento de *A. brasilense* Az39, en medios MMAB, MMAB-RC, LB y LB-RC dispuestos en placas de Petri incubadas de manera vertida (base-tapa), invertida (tapa-base) y abiertas (resultados no mostrados).

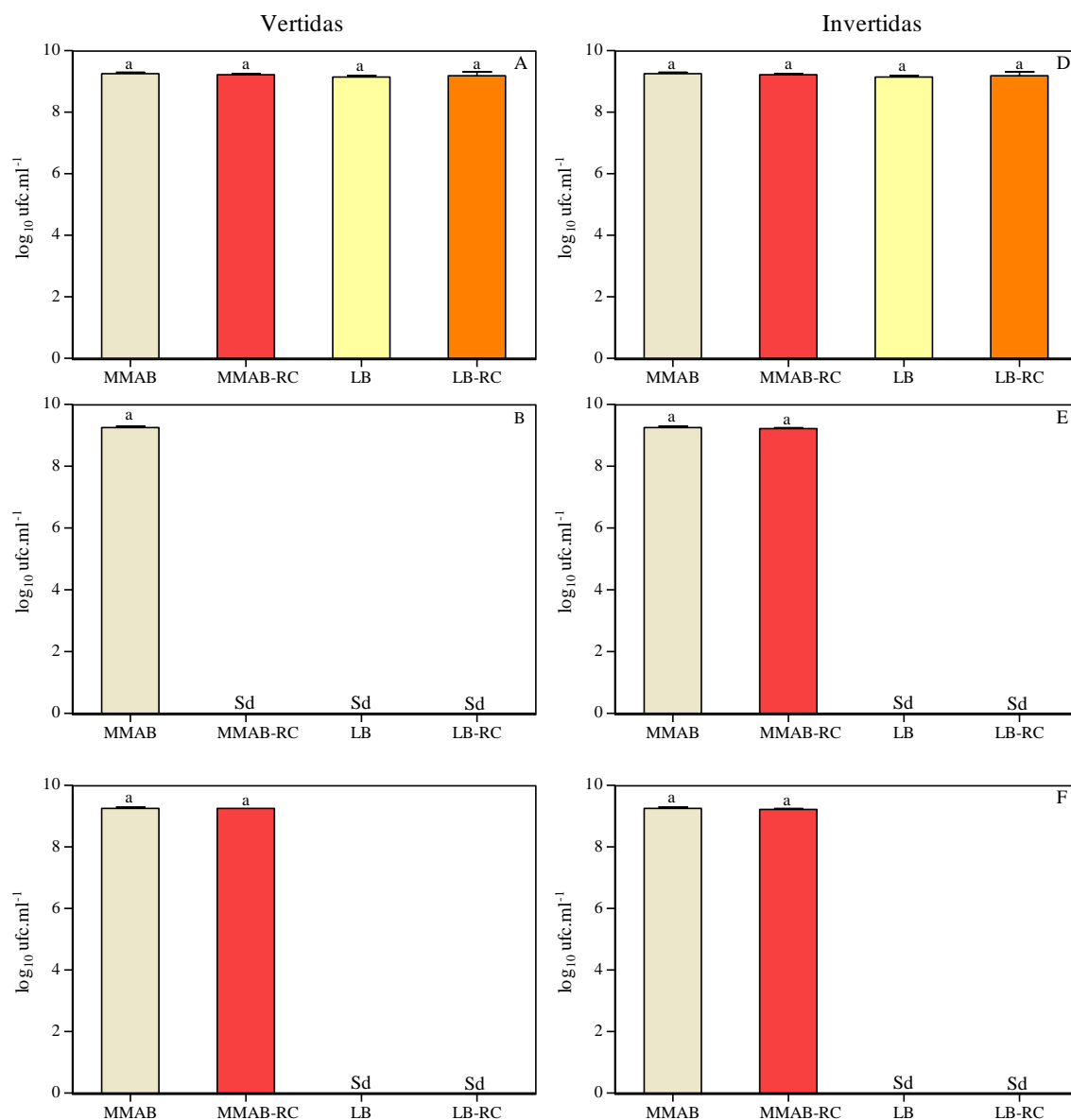


Figura 27. Evaluación del crecimiento (\log_{10} ufc.ml⁻¹) de *A. brasilense* Az39 en medios MMAB, MMAB-RC, LB y LBRC incubadas de manera vertidas (izquierda) en luz roja (A), azul (B) y blanca (C) e invertidas (derecha) en luz roja (D), azul (E) y blanca (F). En todos los casos el control se desarrolló en condiciones de oscuridad y presentó crecimiento. Todos los tratamientos fueron incubados por 72 h a 36 °C y a una distancia de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en Figura 27, cuando las placas se incubaron de manera invertida, la bacteria no creció por exposición a luz azul y blanca en medio LB y LB-RC (resultado ya observado en otros experimentos). Por otro lado, en las placas vertidas, se observó la acumulación de agua por condensación, principalmente cuando se incubó bajo la luz azul por lo que podría considerarse que la ausencia de desarrollo de colonias en el medio de cultivo MMAB-RC bajo esta longitud de onda, se debería principalmente a esta interferencia inducida por el mismo método de incubación en la cámara de cultivo. En el caso de las placas abiertas, estas se resecaron durante el tiempo de incubación, por lo que no se pudo establecer si el efecto de la condición de luz fue modificado por la condición de estrés impuesta por la desecación del medio de cultivo.

III.3.2. Evaluación de la movilidad por natación (swimming)

Este ensayo se realizó para conocer la respuesta de movilidad como natación o "swimming" de Az39 cultivado en medio semisólido y expuesto a diferentes longitudes de onda. La Figura 28 muestra el efecto de cada longitud onda sobre la movilidad de Az39 en placas con medio de cultivo semi-agarificado (swimm).

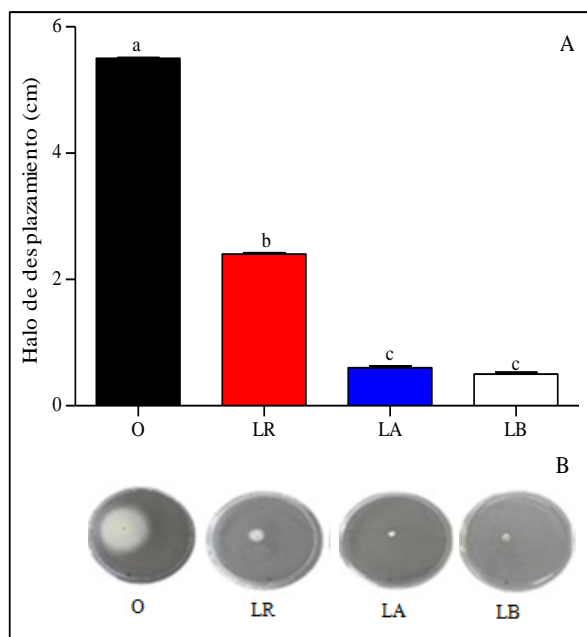


Figura 28. (A) Determinación de movilidad a nivel de swimming en placas de *A. brasilense* Az39 expuestas a diferentes longitudes de onda. (B) Fotografía ilustrando el movimiento de

swimming alcanzado por Az39 en luz blanca (LB), azul (LA), roja (LR) y oscuridad (O). La movilidad se midió como el diámetro de los halos de desplazamiento (en cm), luego de 72 horas de incubación a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. En las barras se representa la media y el desvío estándar del desplazamiento. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a Tuckey ($p < 0.05$).

Como lo demuestra la Figura 28 (A), se observó una disminución en la movilidad de ésta bacteria tras ser expuesta a cada una de las longitudes de luz evaluadas, comportamiento observado principalmente en luz blanca (75 W) y azul (PAR38), las que presentaron una disminución del desplazamiento, en centímetros, de alrededor de un 88%, con respecto al control mantenido en oscuridad, tratamiento que se destacó por presentar el mayor desplazamiento en las condiciones experimentales establecidas. En la Figura 28 (B), se observa la movilidad por swimming alcanzada en cada condición experimental y tal como lo indica la fotografía en condiciones de luz blanca y azul se observó el menor desplazamiento de la bacteria en el medio; mientras que en condiciones de oscuridad y en menor medida en luz roja, se observó el mayor desplazamiento de Az39 por swimming.

III.3.3. Evaluación de la fototaxis en medio semisólido.

Este ensayo se realizó para conocer la respuesta de movilidad por fototaxis de Az39 cultivado en condiciones de semi-penumbra en medio semi-sólido. La Figura 29 muestra el efecto fototácico de cada longitud onda sobre la movilidad de Az39.

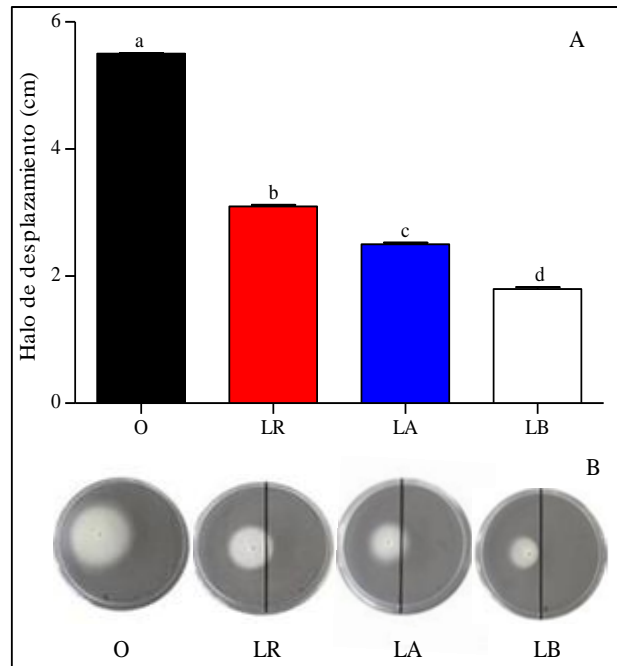


Figura 29. (A) Evaluación de la movilidad por natación o swimming mediada por una respuesta fototáctica en placas de *A. brasilense* Az39 expuestas a diferentes longitudes de onda. (B) Fotografía ilustrando el movimiento de swimming alcanzado por Az39 en placas parcialmente expuestas a luz blanca (LB), azul (LA), roja (LR) y oscuridad (O). La movilidad se midió como el diámetro de los halos de desplazamiento (en cm), luego de 72 horas de incubación a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. En las barras se representa la media y el desvío estándar del desplazamiento. Letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo a Tuckey ($p < 0.05$).

Tal como se observa en la Figura 29 (A), el desplazamiento de Az39, fue superior en condiciones de oscuridad en alrededor del 62,5% con respecto al que se observó en luz blanca, tratamiento en el que se detectó la menor capacidad de fototaxis. En condiciones de exposición a la luz, en luz roja, se observó la máxima capacidad de desplazamiento, siendo superior a la alcanzada en luz azul y blanca en un 13% y 25%, respectivamente, aunque inferior al control en oscuridad en un 44%. En comparación a las tres longitudes de onda, en luz roja, Az39 se desplazó en un radio superior a lo que se observó en luz azul y en menor medida en luz blanca. Por otro lado, en la Figura 29 (B), se observa la fotografía que ilustra el

swimming fototáxico alcanzado en cada condición experimental. Tal como se observa en la gráfica (Figura 29 A) el desplazamiento generado por un cambio a nivel de uno de los hemisferios de la placa por la incidencia de una fuente lumínica, fue creciente dependiendo de la fuente lumínica a la que fue expuesto, es decir, desde el menor al mayor halo de desplazamiento, fue en Luz blanca 75 W, azul PAR38, roja PAR38 y oscuridad.

III.4. Discusión

El efecto de la luz sobre los microorganismos se ha estudiado mucho antes de que se comenzaran a estudiar las bases moleculares de los efectos generados por la luz en la vida microbiana. La mayor parte de los trabajos sobre el efecto de la luz en bacterias comenzaron a desarrollarse en el siglo XX pero las vías moleculares detrás de estos efectos se han abordado en los últimos 40 años (Elías-Arnanz et al., 2011). El estudio del efecto de la luz en las bacterias fotosintéticas esta ampliamente estudiado; sin embargo con el descubrimiento de diferentes proteínas del tipo receptoras de luz en bacterias no fotosintéticas, ha conducido a un gran número de investigadores a estudiar los mecanismos en los que estarían involucradas dichas estructuras en el estilo de vida de tales bacterias (Gomelsky et al., 2011).

A partir de los antecedentes descritos durante este capítulo y como primer abordaje experimental para comprender el efecto de la luz sobre *A. brasilense* Az39 en condiciones naturales, se llevó a cabo el análisis del comportamiento de la bacteria *in vitro* creciendo en diferentes condiciones de cultivo y expuesto a diferentes longitudes de onda. Así, con este sistema experimental, se pudo comprobar que el crecimiento de ésta bacteria resulta afectado cuando es expuesta a luz blanca o azul, llegando a ser letal en la mayoría de los casos cuando es expuesta a luz azul. No se observó un comportamiento diferencial por exposición a luz roja por lo que se podría asumir que la bacteria sería capaz de adaptarse de manera efectiva a este tipo de longitud de onda, pero no a la exposición de luz azul, lo que daría un rol de mayor importancia al sistema fitocromo por encima de cualquier otro tipo de sistema de fotorecepción en este microorganismo. En lo que se considera el único reporte disponible de bacterias pertenecientes a este género, Kumar et al., (2012) reportaron el efecto de la luz roja en *A. brasilense* Sp7 y la posible actividad de los bacteriofitocromos en el mecanismo de tolerancia bacteriana a la fotoexposición y revelaron que estas moléculas no estaban involucradas en la síntesis de pigmentos del tipo carotenoides, necesarios para la protección

por estrés lumínico en otros sistemas biológicos, cuando la bacteria era expuesta a luz roja. En adición, se puede decir que *A. brasilense* Az39 no presenta modificaciones morfológicas cuando crece en presencia de luz roja, independientemente del medio o la condición de cultivo; mientras que el crecimiento de Az39 es alterado por exposición a luz blanca o azul, y este comportamiento es dependiente de la condición en la que se cultiva y del medio utilizado. Esta evidencia plantea dos líneas de investigación posibles para entender el efecto de la luz azul sobre el microorganismo, una relacionada con la temperatura de cultivo y otra con las características nutricionales del medio empleado para cultivar a la bacteria. Con respecto a la temperatura de cultivo, el crecimiento se inhibió por completo a 28 °C, cuando la bacteria creció expuesta a luz blanca y azul, tanto en medio LB como en MMAB. También resultó inhibido el crecimiento a 36 °C en medio de cultivo LB; sin embargo, en medio MMAB, no resultó afectado a ésta temperatura. Kaushik et al., (2002) mostraron que la temperatura por debajo del óptimo en *A. brasilense* CDJA y A40 disminuye la producción de biomasa y la actividad metabólica general de la bacteria. Se sabe que una temperatura de 28°C en *A. brasilense*, aumenta la formación de estructuras y compuestos protectores contra el estrés, pero reduce sus funciones metabólicas para prevenir el deterioro de la célula bacteriana; sin embargo no reduce su crecimiento (Díaz-Saez et al., 2013). En otros reportes se ha visto que luz visible induce la muerte celular de *E. coli* debido a la inducción de ROS a diferentes temperaturas (Lipovsky et al., 2010), siendo variable la capacidad de supervivencia en cada condición (Pal et al., 2009). Los resultados observados en este Capítulo y los trabajos mencionados, permiten suponer que Az39 no es capaz de evitar la muerte celular por exposición a la luz blanca o azul a 28 °C.

Por otro lado, uno de los resultados también alcanzados en esta Tesis Doctoral se relacionó con la respuesta generada Az39 en medios de cultivo modificados por la adición del indicador Rojo Congo, en los que se observó que la exposición a luz azul no fue letal para el crecimiento de Az39 cuando la bacteria se cultivó en un medio mínimo (MMAB) modificado por una alícuota de medio de cultivo LB e indicador Rojo Congo (RC), en comparación con la exposición a luz blanca en las mismas condiciones de cultivo. Estos resultados sugieren que el indicador RC podría ofrecer a *A. brasilense* Az39 cierta protección contra la exposición al luz azul al cambiar la composición de la superficie celular (incremento de la producción de exopolisacáridos) (Budanova et al., 2018). El indicador rojo Congo es capaz de absorber a 497

nm, en la parte azul del espectro. Esta es la primera evidencia sobre el comportamiento diferencial de Az39 cuando se expone a diferentes longitudes de onda en medios de cultivo modificados por la adición del indicador, por lo tanto no se encuentran disponibles reportes previos relacionados que permitan ahondar acerca de las respuestas observadas en este trabajo. Tal como se mencionó anteriormente, cuando la bacteria creció en medio de cultivo rico (LB) o mínimo (MMAB) a 36 °C expuesta a luz blanca y azul, el crecimiento resultó inhibido. En este sentido, es probable que la composición de los medios de cultivo afecte la fisiología celular, y resulte en cambios de los patrones de supervivencia a largo plazo (Kram et al., 2015). De hecho, el enriquecimiento del medio de cultivo puede causar cambios drásticos en la fisiología de las células y, por lo tanto, generar una modificación en los estados oxidativos, que a su vez conduce a un aumento en los niveles de glicación y la frecuencia de mutación, y finalmente la muerte (Mironova et al., 2005; Dimitrova et al., 2004). En los experimentos llevados a cabo durante esta Tesis, la bacteria demostró ser menos tolerante a la exposición a luz blanca y azul en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (medio LB) y esto se debería a: (1) la presencia de ciertos componentes o sustancias capaces de afectar la fisiología bacteriana a nivel del empaquetamiento celular generando una tolerancia inespecífica a la luz, o (2) debido a la presencia de una mayor concentración de moléculas fotosensibilizadoras en los medios ricos utilizados o producidas por Az39 en tales medios. Estas moléculas (fotosensibilizadoras) se sintetizan a partir del metabolismo de varios aminoácidos, como la glicina, alanina, aspartato y glutamato, entre otros y de acuerdo a la formulación del medio LB, éstos se podrían encontrar disponibles como parte de la composición propiamente dicha del medio como resultado del metabolismo de la levadura utilizada para formular el extracto empleado en este medio. De manera alternativa, las moléculas fotosensibilizadoras podrían sintetizarse por la bacteria como consecuencia de la composición nutricional del medio de cultivo. En una mirada general del genoma de *A. brasilense* Az39 se puede determinar que contiene alrededor de 14 secuencias en su genoma codificantes para diferentes moléculas fotosensibilizadoras. Varios informes indican que muchas bacterias albergan una gran cantidad de genes que codifican la síntesis de fotosensibilizadores endógenos (Ashkenazi et al., 2003), que responden a la presencia de luz visible, pero en particular a la luz violeta y azul a 405 y 470 nm, respectivamente (Ashkenazi et al., 2003; Guffey y Wilborn, 2006). Las porfirinas, la coproporfirina III, la protoporfirina IX y la uroporfirina III son los principales

fotosensibilizadores endógenos responsables de la fotoinactivación bacteriana (Feuerstein et al., 2004; Maclean et al., 2008b). La absorción de estas longitudes de onda por los fotosensibilizadores generaría especies reactivas de oxígeno (ROS) que dañan las estructuras celulares y conducen a la muerte celular bacteriana (Hessling et al., 2017). Así se ha visto en otras bacterias, tales como en *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (meticilina resistente aeróbica) y *Pseudomonas aeruginosa* también se ha informado (Guffy y Wilborn, 2006; Brovko et al., 2009) que la luz azul causa fotoexcitación de bacterias endógenas fotosensibles, Porfirinas y posterior producción de especies reactivas de oxígeno bactericidas (Lavi et al., 2004; Lipovsky et al., 2008, 2009, 2010).

III.4.1. Movilidad por swimming y fototaxis

Las bacterias del género *Azospirillum* son móviles por la existencia de un único flagelo polar en medio de cultivo líquidos (swimming) y varios flagelos laterales cuando se mueven a través de superficies o medio semisólido (swarming). Los flagelos polares y laterales son funcional y estructuralmente diferentes (Moens et al., 1995). Se desconoce la función de los flagelos laterales en esta bacteria, aunque un mutante de la cepa Cd de *A. brasilense* que carece de flagelos tanto polares como laterales desarrolló una floculación más fuerte de las células cuando se cultivaba en un medio con una alta relación C:N y que contenía d-fructosa y cloruro de amonio como fuente de C y N (Burdman et al., 1998). Se conoce que un cambio en la movilidad, es común en bacterias fotosintéticas, las que son capaces de detectar una alteración en la cantidad y calidad de luz.

De manera general, para las bacterias se han informado tres tipos de respuesta a la luz (Hader, 1987, Ragatz et al., 1995; Gest, 1995): la respuesta *escotófoba* (miedo a la oscuridad), la *fotocinesis*, la cual se trata de una alteración en el radio de movilidad causada por la captación de un estímulo lumínico y la respuesta *fototáctica* o *fototaxis*, la cual implica un movimiento orientado hacia o lejos de una fuente de luz. Una distinción importante es que la dirección de la irradiación con la luz es un determinante crítico en fototaxis (Jiang et al., 1998). Las células de *Azospirillum* son móviles y capaces de realizar quimiotaxis hacia ácidos orgánicos, azúcares y algunos aminoácidos, y también pueden seguir gradientes de oxígeno (Alexandre, 2015) por lo que no es extraño pensar que un mecanismo similar podría estar operando en función de la luz. En lo que concierne al único reporte hasta la actualidad, con la cepa Sp7 de

A. brasilense, observan que la cepa deficiente en uno de los Bacteriofitocromos (cepa salvaje presenta dos en su genoma), presenta una movilidad reducida en luz roja con respecto a la cepa salvaje (Kumar et al., 2012). Hasta el momento, no se ha informado acerca de la capacidad bacteriana para responder a la luz en términos de fototaxis o movilidad en la cepa Az39. En este trabajo, se observó una disminución en la movilidad bajo la exposición a luz blanca y azul, en comparación con el desplazamiento alcanzado en condiciones de oscuridad (valor máximo); sin embargo, en luz roja, la movilidad fue menor que en el control, aunque al mismo tiempo fue mayor que aquella alcanzada en condiciones de exposición a luz blanca y azul por exposición de la placa completa. Estos resultados son consistentes con otros reportes que muestran que la luz reprime la movilidad y por el contrario la oscuridad aumenta la movilidad, adhesión y virulencia en plantas de *A. tumefaciens* (Oberpichler et al., 2008). La reducción de la movilidad bajo diferentes longitudes de onda un comportamiento general de otras bacterias de la familia Rhizobiaceae (*A. tumefaciens*, *A. vitis* y *Rh. Leguminosarum*); sin embargo, para ciertas bacterias gramnegativas como *E. coli*, *P. aeruginosa* y *S. marcescens*, la movilidad no cambia por la exposición a la luz (Oberpichler et al., 2008). Se ha demostrado que la movilidad en *E. coli* responde a los cambios en la intensidad de luz azul mediante "tumbling" (Yang et al., 1996). En ambas condiciones experimentales, se encontró que la luz blanca, es altamente inhibitoria para la movilidad de esta bacteria. Mientras que por el contrario, en condiciones de oscuridad Az39 mostró el mayor desplazamiento. Existen otros reportes en los que la luz, funciona como estímulo o factor ambiental con capacidad de inducir o reprimir la expresión de genes relacionados con la síntesis de flagelos (Ramos et al., 2004). El flagelo polar no solo está involucrado en la quimiotaxis (Grishanin et al., 1991), sino también en la primera etapa de adsorción cuando *A. brasilense* coloniza las plantas (Michiels et al., 1991).

En resumen y en adición a lo reportado hasta el momento con respecto al efecto de la luz en bacterias no fotosintéticas, se podría considerar que la luz tiene capacidad de incidir sobre la movilidad de tales microorganismos, considerando que esta capacidad en general les permite trasladarse de un sitio a otro y responder a condiciones desfavorables con el objetivo de alcanzar espacios o sistemas que no amenacen su supervivencia.

III.5. Conclusiones parciales

De este capítulo de Tesis se pudo concluir:

1. La exposición de *A. brasilense* Az39 a luz blanca (75 W) y luz azul PAR38 resultan letales para la bacteria e impiden su crecimiento en determinadas condiciones experimentales.

2. *A. brasilense* Az39 presenta un comportamiento de crecimiento similar al control mantenido en condiciones de oscuridad cuando crece en medio agarizado expuesta a luz roja (PAR38). Éste comportamiento se caracteriza por el desarrollo de colonias típicas del tipo rugosas, craqueladas y de color rojo escarlata intenso.

3. El comportamiento de *A. brasilense* Az39 expuesto a la luz es dependiente de:

- i. *Medio de cultivo*: Cuanto más rico nutricionalmente es el medio de cultivo, menor es la tolerancia de la bacteria a la exposición a luz blanca o azul. En aquellos casos donde se observa crecimiento en luz azul (dependiente de la distancia a la fuente) se observan cambios a nivel fenotípico de las colonias).
- ii. *Temperatura de incubación*: En condiciones de exposición a luz azul o blanca, puede crecer a una temperatura de 36°C; mientras que a una de 28°C no es capaz de hacerlo.
- iii. *Distancia a la fuente*: En condiciones de exposición a luz blanca o azul, a menor distancia a la fuente (10-18 cm) o mayor intensidad de exposición se observa una mayor inhibición del crecimiento.
- iv. *Tiempo de exposición*: En condiciones de exposición a luz blanca es necesario un tiempo de 24 horas para que ocurra una total inhibición del crecimiento bacteriano. En el caso de la luz azul, se requiere un tiempo superior a las 24 horas de exposición.

4. *Azospirillum brasilense* Az39 mostró mayor capacidad de desplazamiento en luz roja y en condiciones de oscuridad, mientras que en luz azul y blanca, el desplazamiento fue menor o casi nulo.

CAPÍTULO IV: Comportamiento de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido y expuesto diferentes calidades de luz.

IV.1. Introducción

El efecto de la luz en las bacterias no fotosintéticas es un fenómeno aún no dilucidado para la gran mayoría de microorganismos. En este capítulo, se analizó la respuesta de *A.brasilense* Az39 debido a su exposición a diferentes calidades de luz en sistemas de cultivo en medio líquido. En el Capítulo III y con un abordaje similar, se analizó el comportamiento de la bacteria expuesta a diferentes longitudes de onda en medio de cultivo agarizado y bajo diferentes condiciones experimentales, por lo que se logró un avance significativo a nivel de la evaluación del crecimiento, supervivencia y movilidad de la bacterias en tales condiciones; sin embargo, el sistema experimental fue una limitante para la evaluación de nuevas funciones o capacidades de este microorganismo Así, en este capítulo, el foco de investigación se centralizó en la evaluación del efecto de la luz sobre los principales mecanismos relacionados con la capacidad PGPR o del estilo de vida rizosférico en ésta bacteria, como la producción de fitohormonas o biopelículas. Para ello, y considerando las limitaciones del sistema experimental expuesto previamente, se desarrolló un nuevo sistema experimental basado en la utilización de medio de cultivo en estado líquido.

IV.1.1. *Azospirillum* y el estilo de vida rizosférico

Como se mencionó anteriormente, el género *Azospirillum* posee una adecuada adaptabilidad al medioambiente (Laria et al., 2003) y a las condiciones ambientales imperantes, como el tipo de suelo, temperatura y humedad del mismo, que influyen positiva o negativamente en los procesos interactivos que determinan la estructura de la comunidad microbiana, así como en la asociación *Azospirillum*-planta hospedadora. El estilo de vida microbiano más frecuente en ambientes naturales es aquel relacionado con la formación de estructuras organizadas asociadas con superficies conocidas como biopelículas (Watnick y Kolter, 2000), las que en muchos de los casos dependen de la presencia de una matriz líquida para su formación. Las rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) no son la excepción a esta regla y para producir sus efectos beneficiosos, las PGPR tienen que interactuar con la superficie de las raíces u otros tejidos de la planta para formar tales complejos multicelulares (Bolwerk et al., 2003; Danhorn y Fuqua 2007; Bogino et al., 2013). Las biopelículas se definen como una población bacteriana encerrada en una matriz adherida entre sí y/o a superficies o interfaces. Esta definición incluye agregados y flóculos microbianos, y también poblaciones adherentes

dentro de los espacios porosos (Costerton et al., 1995). Los microorganismos en las biopelículas viven en una matriz de producción propia de sustancias poliméricas extracelulares hidratadas que forman su entorno inmediato. La forma de la biopelícula es variable y es tan simple como la multicapa de células, o más compleja con diversas formas. El patrón definido espacialmente de una biopelícula es su arquitectura que a menudo es específica de la especie para cultivo puro y específico de sustrato para consorcios (Costerton et al., 1995)

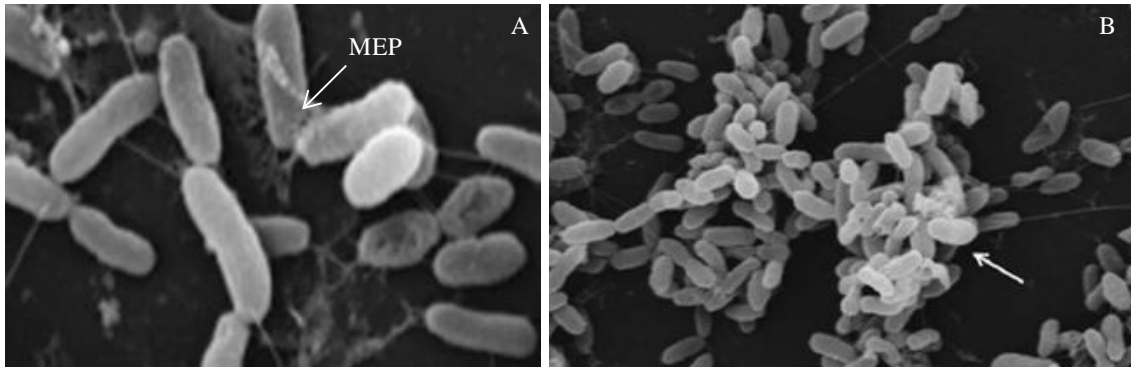


Figura 30. Células de *Azospirillum brasilense* unidas a una superficie de poliestireno unidas entre sí y al soporte inerte, se visualiza por Microscopio electrónico de barrido el material exopolimérico (MEP) excretado por las células (A). Células cultivadas estáticamente formando microcolonias, algunas de las cuales crecen perpendicularmente a la superficie (flecha) y probablemente formarán biopelículas estructuradas (B)

Así, los agregados y biopelículas o biofilms, comienzan con el proceso de anclaje o fijación de la bacteria sobre el sustrato y su posterior colonización y multiplicación, hasta lo que se conoce como maduración de la estructura y su posterior desagregación (Burdman et al., 2000a). Diversos factores físicos tales como la luz, temperatura, concentración de gases; o fisiológicos, tales como estrés, presencia/ausencia de nutrientes; estructurales; mecánicos o metabólicos, tales como la presencia de moléculas señal, entre otros y poblacionales como la detección de quórum, regulan el desarrollo y funcionalidad de los biofilms (Karatan y Watnick, 2009). En respuesta a estos factores, los segundos mensajeros como la diguanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP) se activan (Hengge, 2009) y conducen a la formación o modificación de los biofilms (Karatan y Watnick, 2009).

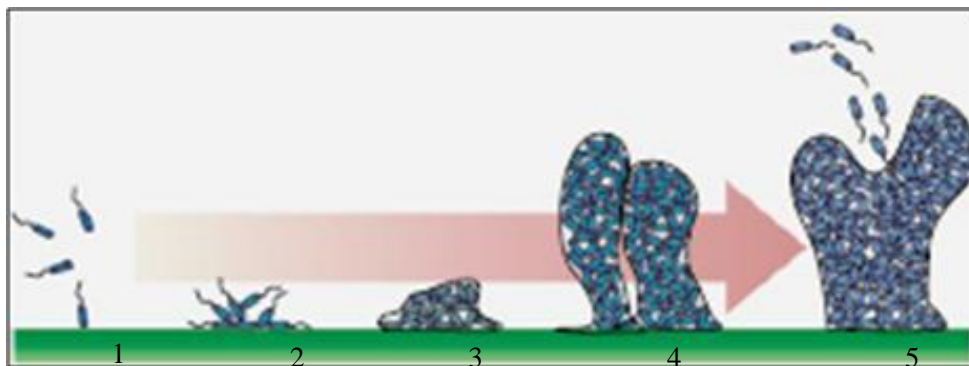


Figura 31. Representación esquemática de los estadios de formación del biofilms en *Azospirillum* sp., dentro de los que se destacan: asociación leve y débil al sustrato (1 y 2), agregación celular en microcolonias, seguido por la maduración de la biopelícula (3 y 4), y la formación de la biopelícula en la que se desprenden colonias y retornan a la vida planctónica transitoriamente y se dispersan (5). Imagen tomada y modificada de Salcedo et al., (2015).

Las células de *A. brasilense*, poseen la capacidad de agregarse y formar flóculos. Esta capacidad puede modificar su crecimiento y afectar positivamente su supervivencia en el suelo o la rizósfera (Nur et al., 1981; Sadasivan et al., 1985). *Azospirillum* es particularmente sensible a las variaciones en la relación carbono: nitrógeno (C:N) y frente a una baja relación, tiende a promover el crecimiento como un aumento en el número de células; mientras que en presencia de una alta relación C:N las células tienden a producir mayor cantidad de componentes extracelulares, agregarse y flocular (Sadasivan et al., 1987; Burdman et al., 1998). Por otro lado, éste fenómeno sería de gran importancia a nivel comercial y podría aplicarse a la producción de inoculantes formulados con esta bacteria. Neyra et al., (1995) proponen que la generación de inoculantes conteniendo flóculos de *Azospirillum* y *Rhizobium* podría mejorar el establecimiento de la simbiosis y crecimiento de plantas de frijol. La producción de exopolisacáridos de superficie por *Azospirillum* sp. se ha correlacionado con un aumento en su capacidad de sobrevivir a condiciones adversas y varía de acuerdo al medio de cultivo utilizado y a las condiciones ambientales (Burdman et al., 1998)

IV.1.2. *Azospirillum* y promoción del crecimiento vegetal

Las bacterias pertenecientes al género *Azospirillum* se encuentran asociadas a una gran cantidad y variedad de especies vegetales, las que presentan como característica distintiva, el

aumento del crecimiento y volumen del sistema radicular *a posteriori* de la inoculación (Dobbelaere et al., 1999; Levanony y Bashan 1989), determinado como un incremento en el desarrollo de las raíces laterales y adventicias (Creus et al., 2005; Molina-Favero et al., 2008), un aumento en número y densidad de pelos radicales (Hadas y Okon 1987; Okon y Kapulnik, 1986) y un incremento en la ramificación de tales estructuras (Jain y Patriquin, 1984). Además de inducir cambios en la morfología de las raíces, se ha probado que estas bacterias también pueden modificar el metabolismo general de las plantas, induciendo un estado de resistencia a patógenos (Cangahuala-Inocente et al., 2013; Chamam et al., 2013) o favoreciendo el crecimiento de las mismas en condiciones de estrés abiótico (Creus et al., 1998; Cassán et al., 2009). Numerosos mecanismos han sido propuestos para explicar cómo las bacterias de este género promueven el crecimiento de las plantas inoculadas. Bashan y de-Bashan (2010), propusieron la “Teoría de múltiples mecanismos o "Hipótesis aditiva", basándose en la suposición de que no existe un mecanismo único que participa en la promoción de crecimiento de las plantas por *Azospirillum* sp. sino una combinación de algunos o varios mecanismos que actuarían de manera individual o sincronizada sobre el crecimiento y desarrollo de la planta. Por otro lado, los mecanismos involucrados podrían variar en función de la especie vegetal, la cepa bacteriana involucrada, y las condiciones ambientales del momento en el que se establece la interacción (Bashan y de-Bashan 2010). En numerosos ensayos, además del aumento en el crecimiento general, han sido descritos incrementos específicos a nivel del contenido de nitrógeno total de la planta (Kapulnik et al., 1985a; Murthy y Ladha, 1988); sin embargo, el uso de cepas mutantes en el gen *nifH* e incapaces de llevar a cabo el proceso de FBN, han presentado resultados contradictorios a nivel de la capacidad del microorganismo de proveer nitrógeno total o en forma de proteínas, razón que contribuyó a desechar la idea de que éste era el único mecanismo responsable de los efectos benéficos observados por la incorporación del microorganismo en plántulas o semillas. Además de la FBN, se han descrito otros mecanismos directos e indirectos de promoción del crecimiento vegetal, tales como la producción de fitohormonas (Tien et al., 1979) o reguladores del crecimiento (Creus et al., 2005); sideróforos, solubilización de fosfato (Puente et al., 2004), el control biológico de fitopatógenos (Basán y de-Basán, 2010) y la protección de plantas frente al estrés, como la salinidad del suelo o de compuestos tóxicos (Creus et al., 1998). Debido a que los efectos de la inoculación fundamentalmente, a nivel radical, eran

similares a los que se observaban cuando las plantas eran tratadas exógenamente con ciertos reguladores del crecimiento con actividad de fitohormonas, Tien et al., (1979) sugirieron que estas sustancias podrían ser responsables, al menos en parte, del crecimiento de las plantas inoculadas. Esta hipótesis ganó popularidad rápidamente y fue reforzada por los resultados obtenidos en los trabajos de Smith et al., (1984); Paredes-Cardona et al., (1988) y Bashan et al., (1990). En tal sentido, la función de ciertas fitohormonas en la asociación planta-microorganismo ha sido informada por Hirsch et al., (1997) y recientemente por Bashan y de-Bashan (2010) para el género *Azospirillum*.

IV.1.2.1. Factores ambientales que regulan la biosíntesis de AIA.

Los factores ambientales que afectan la síntesis de AIA en *Azospirillum* son diversos (Spaepen et al., 2008). El primer grupo incluye aquellas condiciones adversas como el estrés por acidificación, el estrés osmótico y el nutricional (debido a la limitación de la fuente de carbono); mientras que el segundo grupo incluye los efectores químicos y otras moléculas producidas por plantas superiores. Sobre el primer grupo, la producción de AIA aumenta en virtud de la limitación de carbono en el medio, durante la reducción de la tasa de crecimiento y el pH ácido (Ona et al., 2003, 2005). Curiosamente, la limitación de carbono y la reducción de la tasa de crecimiento están relacionadas con el estado fisiológico de las bacterias, en la fase de crecimiento estacionario. Por ello, si bien el AIA es producido durante todas las etapas de crecimiento, aumenta significativamente en la fase estacionaria (Malhotra y Srivastava, 2009). El pH ácido aumenta la expresión génica *ipdC* en *A. brasilense*, seguido de un aumento posterior en la producción de AIA (Vande Broek et al., 2005). Sobre el segundo grupo, Cassán et al., (2011) observaron en cultivos en fase exponencial de *A. brasilense* Sp245 y Az39, un incremento en la producción de AIA por estrés osmótico, ácido abscísico (ABA) y ciertos efectores de hongos fitopatógenos adicionados en el medio de cultivo. En contraste, el estrés oxidativo (H_2O_2), salinidad (NaCl), metil jasmonato (MeJA), ciertos efectores de bacterias fitopatógenas, y algunos aminoácidos, redujeron la acumulación de AIA en el medio.

Como se mencionó en este capítulo, se puede resumir la idea de que determinados factores ambientales, entre ellos la luz, son capaces de alterar el estilo de vida bacteriano y la funcionalidad o expresión de ciertos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en

rizobacterias. Considerando la importancia de *A. brasilense* Az39 como principio activo de un gran número de bioinsumos utilizados en Argentina a nivel agronómico y para los que la respuesta a la inoculación en los cultivos blanco, sería dependiente de la capacidad de la bacteria de expresar sus mecanismos de promoción del crecimiento, se consideró de suma importancia estudiar el efecto de la luz sobre tales capacidades y para ello se desarrolló un sistema experimental adecuado para tal fin.

En este capítulo se continua con el abordaje del tercer objetivo específico de la Tesis relacionado con la evaluación del crecimiento de *A. brasilense* Az39 en diferentes condiciones de cultivo asociadas con la exposición a la luz. En este caso, se analizará el comportamiento de la bacteria en medio de cultivo líquido.

IV.2. Materiales y Métodos

IV.2.1. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio de cultivo líquido

Tal como se mencionó en el Capítulo I, el crecimiento y aislamiento de *Azospirillum* se realiza fácilmente empleando el medio de cultivo semi-agarizado Nfb (Döbereiner et al., 1976) o el medio sólido Rojo Congo [RC] (Rodríguez-Cáceres, 1982), que se caracterizan por ser selectivos y diferenciales, permitiendo el aislamiento de microorganismos pertenecientes a éste género o géneros afines desde diferentes sistemas biológicos; sin embargo, de manera rutinaria, se utilizan otros medios de cultivo, tanto en formulación líquida como sólida, tal como el medio LB (Bertani, 1951), considerado nutricionalmente complejo y formulado a partir de hidrolizados de origen proteico o el medio mínimo MMAB (Vanstockem et al., 1987), considerado un medio químicamente definido y limitado desde el punto de vista nutricional. A partir de estos conocimientos y de los resultados preliminares de ésta tesis, fue de suma importancia evaluar el comportamiento de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo LB y MMAB formulados en estado líquido, así como la respuesta bacteriana por la exposición a diferentes longitudes de onda, particularmente a nivel del crecimiento bacteriano (DO_{595} y de $ufc.ml^{-1}$) y la síntesis de ácido indol-3-acético ($\mu g.ml^{-1}$ AIA), considerada la principal molécula de origen bacteriano asociada a la promoción del crecimiento vegetal. Particularmente en el caso del medio LB, además se profundizó acerca del efecto de la luz a nivel de la evaluación de otros parámetros asociados al estilo de vida de la bacteria, tales como

el porcentaje de agregados (%PA), o la producción de exopolisacáridos totales (EPS) y la formación de biofilms.

IV.2.1.1. Evaluación del comportamiento de *A. brasilense* Az39 en medio MMAB.

IV.2.1.1.1. Condiciones generales de cultivo.

A partir de una placa de Petri conteniendo colonias típicas de *A. brasilense* Az39, se tomó una colonia y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo el medio de cultivo mínimo y definido MMAB (Vanstockem et al., 1987) y se incubó en cámara de cultivo durante 24 h a 36°C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial tardía (DO₅₉₅ 1.3). Transcurrido éste tiempo, se transfirió una alícuota de 40 µl del pre-inóculo a un frasco de vidrio de 100 ml conteniendo 50 ml del medio fresco, que nuevamente se incubó a 36°C y en oscuridad, hasta alcanzar una fase exponencial tardía (DO₅₉₅ aprox. 1.4) equivalente a un título de $8,5 \times 10^8$ ufc.ml⁻¹. A partir de este cultivo, se tomó un inóculo y se trasvasó a un frasco de 500 ml con 300 ml de medio MMAB estéril que se cultivó hasta alcanzar una DO₅₉₅ aprox. 0,1 (fase exponencial temprana). Este cultivo se fraccionó de manera proporcional a razón de 25 ml en placas de Petri estériles y se incubó de manera estática en cámara de cultivo bajo diferentes condiciones de exposición a la luz: luz blanca (75 W), azul (PAR38), roja (PAR38) y el control, que se generó mediante la cobertura de la placa con papel de aluminio. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron removidas de la cámara de cultivo y analizadas de acuerdo al experimento a nivel de crecimiento (DO₅₉₅ y de ufc.ml⁻¹) y concentración de ácido indol-3-acético (AIA), entre otros. Este modelo experimental se tomó como base y se replicó en cada uno de los experimentos que se describen a continuación.

IV.2.1.1.1.1. Evaluación del crecimiento.

Este ensayo se realizó con el objetivo de comprender como la exposición a una fuente lumínica afecta el crecimiento y desarrollo de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido nutricionalmente definido (MMAB) y se comparó éste comportamiento con aquel obtenido en un medio nutricionalmente complejo Luria-Bertani (LB). Para esto se utilizó el medio base MMAB modificado por la adición exógena de L-triptófano (L-Trp), en una concentración final de 1 mg.ml⁻¹, de acuerdo a los tratamientos:

1. Oscuridad (O)

2. Luz blanca (75 W)
3. Luz azul (PAR 38)
4. Luz roja (PAR 38)

Transcurrido el tiempo de incubación, se realizó una observación macroscópica de cada una de las placas de cada condición experimental. Luego, se homogenizó el contenido de la placa por agitación y se procedió a medir la densidad óptica (DO_{595}), para lo que se utilizó un espectrofotómetro Zeltec ZL5000P (Zeltec, Argentina). Por otro lado, para el recuento de células viables en placa de Petri conteniendo medio selectivo y diferencial, se utilizó la técnica de microgota propuesta por Rivera et al., (2014). Brevemente, a partir de cada cultivo se tomó alícuotas de 1000 μl y se realizó diluciones seriadas en base 10 en solución fisiológica hasta alcanzar una concentración de 10^{-7} . A partir de las últimas tres diluciones se sembró 20 μl por cuadruplicado en placas de Petri con medio LB (Bertani, 1951) suplementado con el colorante Rojo Congo (LB-RC) modificado con la adición de 15 mg.l^{-1} de indicador, según Molina et al., (2014). En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado y de manera independiente. Luego de la siembra, se incubó cada una de las placas en cámara de cultivo a 36°C durante 72 h, para realizar el recuento de ufc.ml^{-1} . La exposición de las placas con el medio de cultivo líquido inoculado bajo las diferentes fuentes lumínicas se realizó durante 24, 48 y 72 h, a una distancia desde la fuente a la placa de cultivo de 22,5 cm, a 36°C.

IV.2.1.1.1.2. Evaluación de la producción de ácido indol-3-acético

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar si la exposición a diferentes longitudes de onda podría afectar la producción y acumulación de ácido indol-3-acético (AIA) en medio de cultivo químicamente definido. Para ello, se fraccionó un cultivo puro de Az39 (DO_{595} aprox. 0,1) modificado por la adición exógena de L-triptófano (L-Trp) a una concentración final de 1 mg.ml^{-1} en placas de Petri a razón de 25 ml cada una y de acuerdo a los tratamientos descriptos en III.2.1.1.1.1. En todos los casos, la exposición a cada longitud de onda o la condición de oscuridad (control), se mantuvo durante 24, 48 y 72 h, a una distancia desde la fuente a la placa de cultivo de 22,5 cm, a 36°C. La cuantificación de AIA se llevó a cabo por el método colorimétrico de (Salkowski, 1885). Para ello, se tomó 1000 μl del cultivo bacteriano y se colocó en un tubo plástico de tipo Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min y se obtuvo el sobrenadante del que se tomó 500 μl y se mezcló (a razón 1:1)

con 500 µl de Reactivo de Salkowsky (7.9 M H₂SO₄ y 12,5 g/L FeCl₃) agitando 10 veces en forma de inversión y suavemente. Se incubó por 30 min en completa oscuridad y se determinó la absorbancia mediante un espectrofotómetro Zeltec ZL5000P (Zeltec, Argentina) a 530 nm. La producción de AIA se expresó en µg.ml⁻¹ en referencia a la ecuación de la recta obtenida previamente de una curva patrón realizada con la droga pura a 530 nm. Con los datos de absorbancia se obtuvo un promedio de 3 réplicas de la muestra (réplica experimental) y 3 réplicas del tratamiento (réplica biológica) y se calculó la concentración mediante el uso de la ecuación obtenida de la curva patrón.

IV.2.1.2. Evaluación del comportamiento de *A. brasilense* Az39 en medio LB.

IV.2.1.2.1. Condiciones generales de cultivo.

A partir de una placa de Petri conteniendo colonias típicas de *A. brasilense* Az39, se tomó una colonia aislada y se colocó en un tubo de ensayo con medio de cultivo LB (Berani, 1951) y se incubó en cámara de cultivo durante 24 h a 36°C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial (DO₅₉₅ 1.2). Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 40 µl del pre-inóculo y se trasvasó a un frasco de vidrio de 100 ml de capacidad con 50 ml de medio de cultivo LB estéril y nuevamente se incubó a cámara de cultivo a 36°C y oscuridad, hasta alcanzar una fase exponencial tardía (DO₅₉₅ aprox. 1.3) equivalente a un título de 8,04 x 10⁸ ufc.ml⁻¹. A partir de este cultivo, se tomó una alícuota y se trasvasó a un frasco de 500 ml con 300 ml de medio LB estéril hasta alcanzar una DO₅₉₅ aproximadamente de 0,1 (fase exponencial temprana). Este cultivo se fraccionó en placas de Petri estériles (20 ml cada una) y se incubó en cámara de cultivo bajo diferentes condiciones descritas en III.2.1.1.1.1. La exposición de las placas a cada longitud de onda así como el control en condiciones de oscuridad se mantuvieron durante 24, 48 y 72 h, a una distancia desde la fuente a la placa de cultivo de 22,5 cm, a 36°C. Transcurrido el tiempo de incubación, las placas fueron removidas de la cámara de cultivo y se analizaron de acuerdo al experimento a nivel de crecimiento (DO₅₉₅ y de ufc.ml⁻¹), concentración de ácido indol-3-acético (µg.ml⁻¹), producción de agregados (%PA), exopolisacáridos totales (EPS) y formación de biofilms, de acuerdo a la metodología que se describe a continuación.

IV.2.1.2.1.1. Evaluación del crecimiento

Placas de Petri estériles conteniendo medio de cultivo LB inoculado con *A. brasilense* Az39 se cultivó en condiciones estática y expuesta a las diferentes longitudes de onda como se describió en III.2.1.1.1.1. Se llevó a cabo una observación macroscópica de cada una de las placas, luego se homogenizó el contenido por agitación y se determinó la densidad óptica (DO_{595}), para lo que se utilizó un espectrofotómetro Zeltec ZL5000P (Zeltec, Argentina). Para el recuento de células viables en placa de Petri conteniendo medio selectivo y diferencial, se utilizó la técnica de microgota propuesta por Rivera et al., (2014). Luego de la siembra, las placas fueron incubadas en cámara de cultivo a 36°C durante 72 hs, para luego llevar a cabo el recuento de ufc.ml⁻¹. En todos los casos, los experimentos fueron realizados por triplicado y de manera independiente.

IV.2.1.2.1.2. Evaluación de la producción de ácido indol-3-acético (AIA)

Placas de Petri estériles conteniendo medio de cultivo LB inoculado con *A. brasilense* Az39 se cultivó en condición estática y expuesta a las diferentes longitudes de onda como se describió en III.2.1.1.1.1. La cuantificación de AIA se llevó a cabo por el método colorimétrico de Salkowski (Salkowski, 1885). Para esto, se tomó una alícuota de 1000 µl del cultivo bacteriano y se colocó en un tubo plástico de tipo Eppendorf de 1,5 ml de capacidad. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 minutos. Se obtuvo un pellet y del sobrenadante se tomó una alícuota de 500 µl que se mezcló con 500 µl de Reactivo de Salkowsky (7.9 M H₂SO₄ y 12,5 g/L FeCl₃) agitando 10 veces en forma por inversión. Los tubos se mantuvieron por 30 minutos en completa oscuridad y a temperatura ambiente para luego determinar la absorbancia mediante un espectrofotómetro Zeltec ZL5000P (Zeltec, Argentina) a 530 nm. El medio de cultivo no inoculado fue utilizado como control. La producción de AIA se expresó en µg.ml⁻¹, en referencia a la ecuación de la recta obtenida previamente por el desarrollo de una curva patrón con la droga pura a 530 nm. Con los datos de absorbancia se hizo el cálculo de concentración como se describió.

IV.2.1.2.1.2.1. Evaluación del efecto directo de la luz sobre la molécula de AIA

Una segunda estrategia experimental se relacionó con la evaluación del efecto directo de la luz sobre la molécula de AIA. Para ello, se utilizó placas de Petri conteniendo 20 ml de medio LB

y modificados por la adición de una solución de AIA para obtener una concentración final de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Las placas fueron luego expuestas a luz blanca y azul por 24 h, 48 h y 72 h a 36°C , para luego evaluar la concentración de AIA como se describió previamente.

IV.2.1.2.1.2.2. Evaluación del efecto del AIA sobre la respuesta bacteriana a la luz

La última estrategia experimental se basó en verificar el efecto de la luz en cultivos de Az39 modificados por la adición exógena de AIA. Para ello, un cultivo puro de Az39 obtenido en medio LB (DO_{595} 0,123), se fraccionó en placas de Petri (20 ml) y se modificó por la adición exógena de AIA más el precursor de su biosíntesis, aminoácido el L-triptófano, hasta alcanzar una concentración final de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ y $1 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ respectivamente. Luego de 24 h, 48 y 72 h de exposición a la luz se evaluó la concentración de la hormona en cada uno de los tratamientos con la metodología descrita previamente. Como tratamiento control, se utilizó placas con medio sin inocular con el agregado exógeno del precursor y de la hormona.

Nota: La producción de auxinas en *A. brasilense* ha sido evaluada en numerosos experimentos en los que se ha comprobado que la forma mayoritaria o casi exclusiva de la hormona en cultivos puros de diferentes cepas es AIA (>95%). Así, la utilización del método colorimétrico de Salkowski para la cuantificación de AIA en *A. brasilense* guarda una estrecha relación en concentración y sensibilidad con otras metodologías más complejas, tales como HPLC o incluso LC-MS-MS probadas en LFVIPM.

IV.2.1.2.1.5. Evaluación de la capacidad de agregación celular.

Para la determinación del porcentaje de agregación celular de *A. brasilense* Az39, se utilizó la metodología descrita por Burdman et al., (1998). Para esto, placas de Petri conteniendo un cultivo puro y fraccionado de Az39 fueron expuestas a las condiciones de luz como se describió en el inciso III.2.1.1.1.1 durante 24, 48 y 72 h, a una distancia desde la fuente a la placa de cultivo de 22,5 cm y a una temperatura de 36°C . El cultivo procedente de cada placa tomada a cada tiempo de incubación, se trasvasó en condiciones de esterilidad a tubos plásticos cónicos del tipo Falcon estériles de 50 ml de capacidad y se mantuvo en reposo a 24°C durante 12 h. Durante este tiempo, los agregados decantaron en el fondo del tubo y en ese momento se tomó una alícuota de la parte superior de la suspensión a la que se le midió la

turbidez a DO_{595} nm (DO_1) en un espectrofotómetro Zeltec ZL5000P (Zeltec, Argentina). Luego se homogenizó el cultivo (1 min) y se midió nuevamente la DO_{595} nm (DO_2). El porcentaje de agregación (% PA) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación % PA: $(DO_2 - DO_1) \times 100 / DO_2$.

IV.2.1.2.1.3. Ensayo de formación y cuantificación de biofilms

La evaluación de adherencia y formación de biofilms, se realizó de acuerdo a la metodología propuesta por Prouty et al., (2002) con algunas modificaciones. Para ello, se obtuvieron fracciones del inóculo puro de Az39 en placas de Petri estériles (20 ml) a las que se le incorporó un vidrio de 1 mm de espesor previamente esterilizado y del mismo diámetro de la placa de Petri. El vidrio se autoclavo a 121°C durante 20 minutos a 1 atm y al momento de incorporarlo a cada placa de Petri se lavó con etanol 96° y se flameó en mechero, para eliminar cualquier posible contaminante. Así, las placas conteniendo el vidrio soporte y el cultivo de Az39 fueron expuestas a las condiciones descriptas en el inciso III.2.1.1.1.1 durante 24, 48 y 72 h, a una distancia desde la fuente a la placa de cultivo de 22,5 cm, a 36°C . La producción de biofilms se cuantificó mediante solubilización del cristal violeta con etanol, aunque utilizando otros volúmenes de acuerdo a la metodología descripta por O'Toole y Kolter (1998) y adaptada al sistema experimental planteado en este Capítulo. Para ello, se tomó cada disco de vidrio, luego de la exposición a la luz, se retiró suavemente de la placa de petri y se lavó 3 veces con solución fisiológica estéril (1,5 ml). Luego, la biopelícula se tiñó con 1,5 ml cristal violeta (0,1% p/v) y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se enjuagó mediante 3 lavados con agua destilada estéril (1,5 ml). La biopelícula se resuspendió en etanol 96% (v/v) y luego, con una micropipeta (p 200 μl) se desagregó la película mediante la aplicación de una fuerza mecánica generada a partir del ascenso y descenso del líquido de manera repetida, de acuerdo a O'Toole et al. 2000, con modificaciones y adaptaciones para este sistema. Por último se midió la DO_{560} en un espectrofotómetro Zeltec ZL5000P (Zeltec, Argentina). Se realizó por triplicado de manera independientemente cada determinación.

IV.2.1.2.1.4. Determinación de exopolisacáridos (EPS) totales

Para determinar si la exposición a las fuentes lumínicas genera cambios a nivel de la producción de exopolisacáridos y polisacáridos capsulares de *A. brasilense* Az39, se procedió como se describió en III.2.1.1.1.1. Transcurrido el tiempo de exposición, se llevó a cabo la extracción de polisacáridos totales según Mueller y González (2011) con algunas modificaciones. Para ello, a partir de los cultivos de 24 h (DO₅₉₅ nm 0,9), 48 h (DO₅₉₅ nm 1,2) y 72 h (DO₅₉₅ nm 1,7) de exposición a cada condición lumínica, se centrifugaron a 10.000 rpm 15 min a 4°C, el sobrenadante se reservó para luego llevar a cabo la extracción de EPS, mientras que el pellet se separó, se pesó (Peso fresco o PF) y luego se secó en estufa hasta alcanzar peso constante (PS). Con respecto al sobrenadante (10 ml), éste se resuspendió en 3 volúmenes de etanol 96° frío y la mezcla se incubó toda la noche a 4°C, luego se centrifugó a 10.000 rpm y 4°C durante 20 min. El pellet se lavó tres veces con etanol absoluto y luego se colocó en centrifugador rotatorio (SAVANT, modelo svc-110. USA). Finalmente, cada muestra se resuspendió en agua destilada estéril (1 ml) y de ésta se tomó una alícuota de 500 µl, que se mezcló con 2,5 ml de reactivo de antrona (Dische, 1962). Luego, los tubos se mantuvieron en baño termostático (95°C) durante 10 min. Una vez que cada muestra alcanzó la temperatura ambiente, se midió la absorbancia (DO₆₂₀). El contenido de EPS se expresó como mg glucosa/g de peso seco. La curva patrón se realizó utilizando glucosa como patrón.

IV.2.1.3. Análisis estadístico

Para la interpretación de los datos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y un Test HSD Tukey, con un nivel de confianza del 95%. El análisis se llevó a cabo mediante el software InfoStat-Statisticaly. Las gráficas fueron desarrolladas empleando el software GraphPad Prism 5.0.

IV.3. Resultados

IV.3.1. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio MMAB

IV.3.1.1. Crecimiento y desarrollo de *A. brasilense* Az39.

La Figura 32 muestra el efecto de cada condición de luz sobre el crecimiento y producción de biomasa de *A. brasilense* Az39 en el medio de cultivo líquido MMAB.

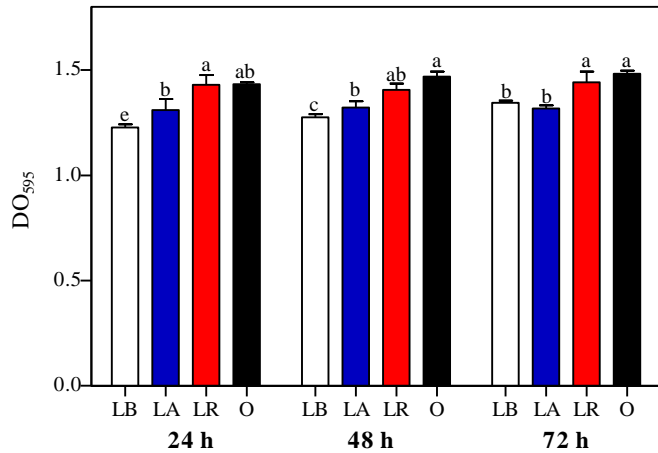


Figura 32. Evaluación de la producción de biomasa (DO_{595}) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido MMAB modificado por la adición de L-trp ($1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36°C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la figura 32, la producción de biomasa en luz blanca fue inferior que en condiciones de oscuridad en un 15% a las 24-48 y 72 h de exposición, mientras que en luz azul y roja, la producción de biomasa fue similar a la alcanzadas en oscuridad a las 24 h. La exposición a luz azul produjo una disminución en la producción de biomasa a las 48 h en un 10% con respecto al control, diferencia que se mantuvo a las 72 h y se igualó al crecimiento alcanzado en luz blanca. En condiciones de exposición a luz roja, la producción de biomasa fue similar al control en cada tiempo en que se llevó a cabo las mediciones.

Para correlacionar el efecto con un parámetro de crecimiento que permita inferir el estado poblacional del cultivo, se llevó a cabo el recuento de células viables por el método de microgota en las mismas condiciones experimentales.

La Figura 33 resume el efecto de cada condición a nivel del crecimiento de *A. brasilense* Az39 en medio líquido MMAB.

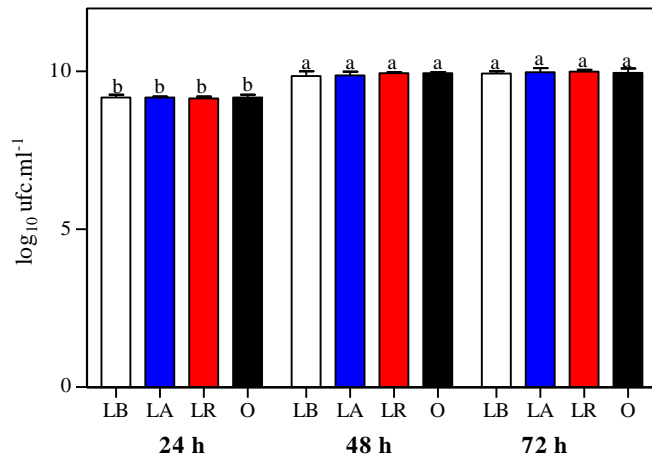


Figura 33. Evaluación del crecimiento ($\log_{10}\text{ufc.ml}^{-1}$) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido MMAB modificado por la adición de L-trp y expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36°C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la figura 33, la exposición a luz blanca 75 W, azul PAR38 o roja PAR38, y en condiciones de oscuridad durante 24, 48 y 72 h, no afectó el crecimiento bacteriano, evaluado como número de células viables por unidad de volumen (ufc.ml^{-1}) en medio líquido MMAB. No hubo diferencias estadísticamente significativas cuando el microorganismo creció en estas condiciones experimentales; aunque a las 48 h se observó un incremento en el recuento celular con respecto a las 24 h en todas las longitudes de onda de alrededor del 8% con respecto a los valores alcanzados a las 24 h, comportamiento que se mantuvo a las 72 h.

IV.3.1.2. Producción de ácido indol-3-acético (AIA)

La Figura 34 muestra el efecto de cada tipo de luz sobre la producción y acumulación de AIA *A. brasilense* Az39 en medio líquido MMAB.

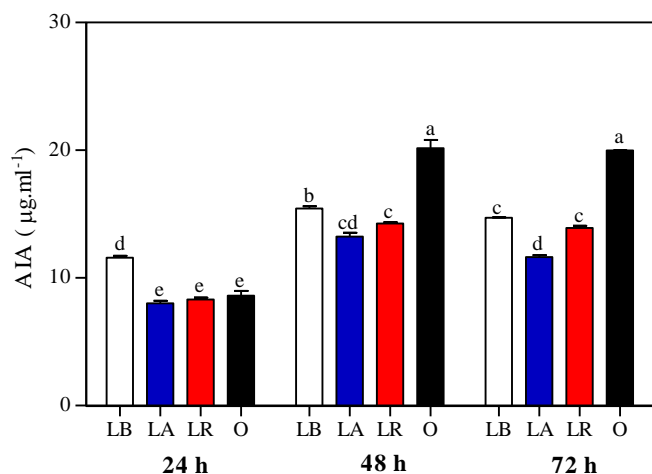


Figura 34. Evaluación de la concentración de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en *A. brasilense* Az39 en medio líquido MMAB modificado por la adición de L-trp y expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36°C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tal como se puede observar en la Figura 34, la exposición de los cultivos a luz blanca indujo un incremento del 30% de AIA a las 24 h, sin embargo este comportamiento se revirtió durante las 48 y 72 h posteriores, en las que los cultivos mantenidos en condiciones de oscuridad, mostraron la máxima producción y acumulación de AIA con respecto a los demás tratamientos, siendo superior a lo acumulado en luz blanca en un 20% a las 48 h. Si bien en condiciones de oscuridad se observó la máxima producción de esta hormona a las 48 y 72 h de incubación, se observó un máximo de biosíntesis en luz blanca y azul a las 48 h, que luego de 72 h de exposición, disminuyó en un 10 y un 15%, respectivamente, en cambio la exposición a luz roja, produjo un incremento de AIA luego de 48 h, que se mantuvo constante a las 72 h.

IV.3.2. Evaluación del comportamiento de Az39 en medio líquido LB

IV.3.2.1. Crecimiento y desarrollo de *A. brasilense* Az39.

La Figura 35 muestra el efecto de cada tipo de luz sobre el crecimiento y producción de biomasa de *A. brasilense* Az39 en medio líquido LB.

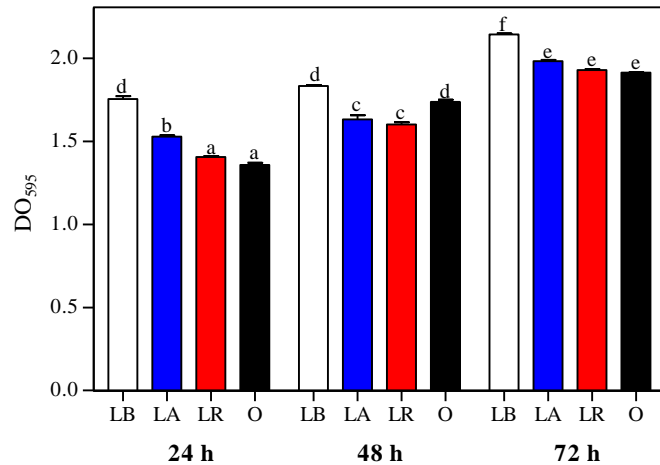


Figura 35. Evaluación del crecimiento (DO_{595}) de *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como lo demuestra la Figura 35, el crecimiento de *A. brasilense* Az39, fue modificado de manera diferencial luego de ser expuesto a diferentes condiciones lumínicas. La exposición a luz blanca y azul no resultó letal para el microorganismo, como se observó en medio sólido (Capítulo III) y por el contrario, la exposición a estos tipos de luz determinó un incremento significativo de la producción de biomasa a las 24 h con respecto al tratamiento control mantenido en oscuridad con un porcentaje de incremento cercano al 29% y 12% respectivamente. Después de 48 h de exposición, la luz blanca mantuvo una diferencia significativa con respecto al tratamiento mantenido en oscuridad, con un aumento cercano al 6%. Si bien, a las 48 h de exposición se observó un incremento de la producción de biomasa para el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad, con respecto a los tratamientos expuestos a luz azul y roja, el mismo no mantuvo esta tendencia luego de 72 h. El crecimiento de Az39 tras la exposición a cada uno de los tratamientos, incluido el control mantenido en condiciones de oscuridad, mostró un incremento incipiente en el tiempo; sin embargo, en condiciones de exposición a la luz blanca, se observó una tendencia de aumento constante y

significativa luego de 48 y 72 h con respecto al control, con una diferencia porcentual de 6% y 11% respectivamente. La exposición a la luz roja y azul, generó una producción de biomasa similar en cada longitud, sin embargo inferior al control en un 5% a las 48 h. Luego de 72 h de exposición a luz azul y roja, mostró un comportamiento similar al control en oscuridad, sin presentar diferencias estadísticamente significativas, aunque inferior a lo que alcanzó en luz blanca en un 10%

A modo de resumen, se puede confirmar que la exposición a la luz en medio líquido LB, no generó letalidad en *Az39* a diferencia de lo que se observó en condiciones de cultivo en medio sólido agarizado. Por otro lado, en condiciones de exposición a luz blanca, se observó un aumento constante y significativo del crecimiento a los diferentes tiempos de exposición, con respecto a los demás tratamientos expuestos a otras longitudes de onda e inclusive en relación al control mantenido en oscuridad.

Para inferir el estado poblacional del cultivo, se llevó a cabo el recuento de células viables por el método de microgota en las mismas condiciones experimentales. La Figura 36 resume el efecto de cada condición a nivel del crecimiento de *A. brasilense* *Az39* en medio líquido.

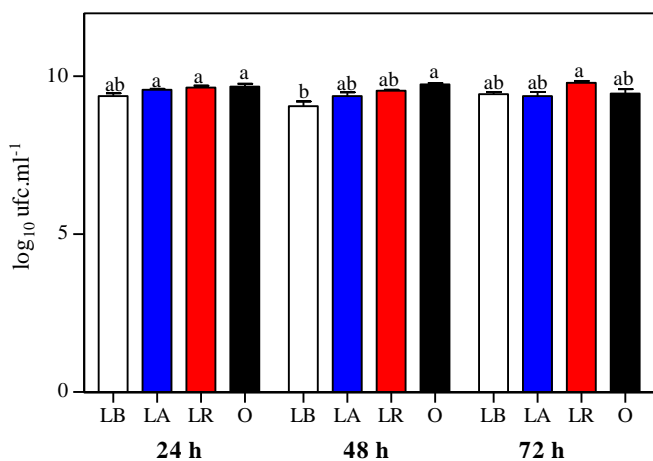


Figura 36. Evaluación del crecimiento ($\log_{10} \text{ufc.ml}^{-1}$) de *A. brasilense* *Az39* en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica

de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 36, el crecimiento bacteriano, evaluado como número de células viables por unidad de volumen (ufc.ml^{-1}), no tuvo diferencias significativas en el número de células viables luego de 24 h de exposición a luz blanca, azul o roja en comparación con el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad. Por otro lado, a las 48 h de exposición, se observó una tendencia significativa de reducción del número de células por exposición a luz blanca, cercana a un 7%, con respecto al tratamiento control. Por último, Az39 tuvo un incremento significativo en el número de células viables cercano al 5% luego de 72 horas de exposición a luz roja, en comparación con el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad; mientras que no se determinó diferencias por exposición a las luces utilizadas. A partir de estos resultados se puede mencionar que las diferencias observadas en el recuento celular alcanzado en cada tratamiento, tal como se muestra en la Figura 36, se deberían presumiblemente a la variabilidad propia de la metodología de recuento más que a un efecto directo de los diferentes tipos de luz sobre la bacteria.

De manera general, estos resultados indicarían que la diferencia observada por acumulación de biomasa cuantificada por absorbancia, no correlaciona con la cantidad de células viables en el medio, lo que podría atribuirse a un aumento en la producción de biomasa y material extracelular en el medio de cultivo.

IV.3.2.2. Biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA)

El objetivo de este experimento fue determinar si la síntesis de AIA, uno de los mecanismos de promoción de crecimiento más estudiados en *A. brasilense* Az39, se altera como consecuencia de la exposición a los diferentes tratamientos lumínicos. La Figura 37 muestra la acumulación de AIA en medio de cultivo líquido LB a diferentes tiempos de incubación y bajo las condiciones experimentales previamente descriptas. La composición química de este medio de cultivo LB, se basa en el contenido de diversos hidrolizados proteicos, dentro de los cuales, se encuentra una amplia gama de aminoácidos y entre ellos el L-triptófano, el cual participa como precursor en la biosíntesis de ácido indol-3-acético en el género *Azospirillum*.

Así, el medio LB es considerado adecuado para evaluar la producción de AIA sin adición exógena del precursor, a diferencia de lo que ocurre en el medio MMAB.

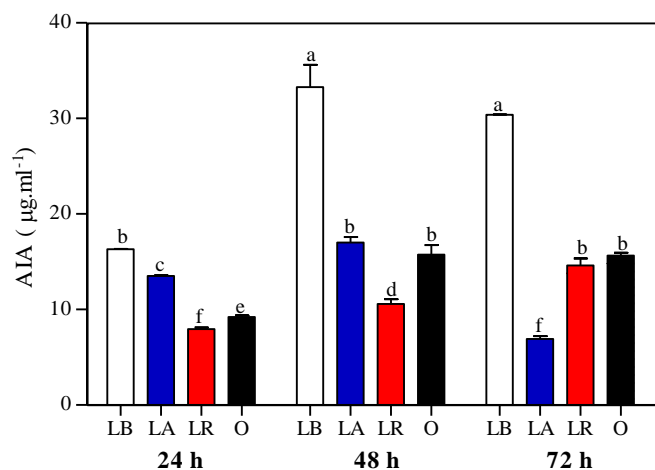


Figura 37. Evaluación de la síntesis de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24, 48 y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 37, la concentración de AIA en el medio de cultivo fue superior en un 43% al valor alcanzado en condiciones de oscuridad luego de ser expuesto durante 24 h a luz blanca. El mismo tratamiento presentó un valor superior al alcanzado por exposición a luz roja de alrededor de un 51%, teniendo esta última un comportamiento similar al control al mismo tiempo de evaluación. Luego de 48 h de exposición, la luz blanca presentó un incremento en la concentración de la hormona de un 50% con respecto al mismo tratamiento, luego de las 24 h de exposición. En presencia de luz blanca se observó un aumento significativo en la síntesis de AIA a las 24 y 48 h y el mismo se sostuvo luego de 72 h de exposición. En este caso, la luz azul y el control en condiciones de oscuridad, tuvieron un comportamiento similar y en ambos casos inferior a la concentración determinada en luz blanca con aproximadamente un 50 % de reducción, pero en ambos casos superiores a la luz roja, en la que se observó la menor producción de la hormona luego de 24 y 48 h de

exposición. Por último, en presencia de luz azul, se comprobó un descenso en la concentración de la hormona cercano al 60 % con respecto al valor alcanzado a las 48 h.

A partir de la curiosa observación de la disminución de la concentración de AIA luego de 72 horas de exposición a la luz azul en un sistema experimental que en teoría considera la acumulación de la hormona en el tiempo, surgió el interrogante acerca de si este efecto podría ser el producto de una reacción química específica de la luz sobre la molécula de AIA en las condiciones experimentales generadas y no una alteración de la actividad metabólica del microorganismo, a nivel de la biosíntesis de la hormona. Por ello, se desarrollo una nueva estrategia experimental cuyo objetivo fue determinar si la luz generaba algún tipo de alteración o reacción química de manera directa en la molécula de AIA. Para ello, se expuso el medio de cultivo sin inocular (LB) modificado por la adición exógena de AIA a luz blanca y azul en las mismas condiciones experimentales previamente descriptas. Los resultados se resumen en la Figura 38.

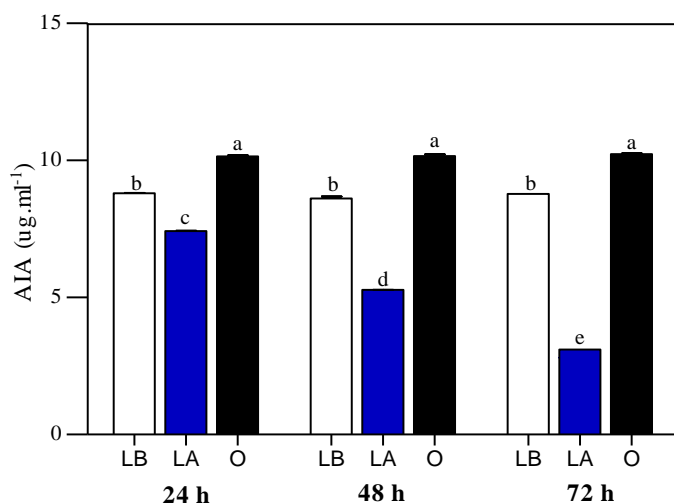


Figura 38. Evaluación de la concentración de AIA ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) en medio de cultivo líquido LB modificado por la adición de $10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AIA expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de $36 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 38, cuando el medio de cultivo se modificó por la adición exógena de AIA ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), y fue expuesto a luz azul y blanca, se observó una disminución de la concentración de esta hormona en el medio de cultivo, en comparación con el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad, que mantuvo una concentración constante a lo largo de todo el ensayo, luego de 72 h. En este punto se registró una disminución de aproximadamente un 10% de la concentración de AIA por exposición a luz azul y de un 11% por exposición a luz blanca. La concentración observada luego de la exposición del medio a luz azul, fue inversamente proporcional al tiempo de exposición, donde a mayor tiempo de exposición, menor concentración de la hormona en el medio de cultivo. En el caso de la exposición a luz blanca, la diferencia con respecto al tratamiento control se mantuvo constante independientemente del tiempo de exposición. El efecto degradativo fue constante en el caso de la luz blanca; mientras que fue incremental para el caso de la luz azul. De esta manera, se podría inferir que la estabilidad de la molécula de AIA es afectada por la exposición a la luz blanca y azul, ya que, la concentración en estas condiciones de cultivo de ésta molécula, disminuye de manera significativa, probablemente debido a algún tipo de reacción química que solo ocurre en las condiciones experimentales establecidas y detalladas en esta Tesis.

A partir de los resultados que se resumen en la Figura 38, se continuó con la misma premisa, teniendo en cuenta que en presencia a luz azul, los niveles de AIA disminuyen notablemente en el tiempo, por lo que verificó si este patrón en condiciones de exposición a luz azul se manifestaba en presencia del microorganismo para así comprender si la presencia de la bacteria reduce el proceso degradativo. Parte de esta nueva estrategia además se direccionó a comprender lo que ocurre a nivel del metabolismo de la bacteria expuesta a diferentes condiciones de luz como consecuencia de la adición exógena de AIA. Para ello, se planteó un nuevo experimento por la adición exógena de AIA más el aminoácido L-triptófano (para asegurar la máxima producción de AIA en el medio de cultivo que ya contiene el aminoácido) a un cultivo de Az39 y la evaluación de la concentración de la hormona a lo largo del tiempo. Así, tal como se describió en el apartado metodológico correspondiente III.2.1.2.1.2, placas de Petri conteniendo medio de cultivo inoculado con Az39 o sin inocular, ambos modificados por la adición exógena de AIA más el precursor L-trp se expusieron a los tres tipos de fuentes lumínicas, luz blanca 75 W, luz azul PAR38, luz roja PAR38, y se comparó con un

tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad. Los resultados de este ensayo se resumen en la Figura 39.

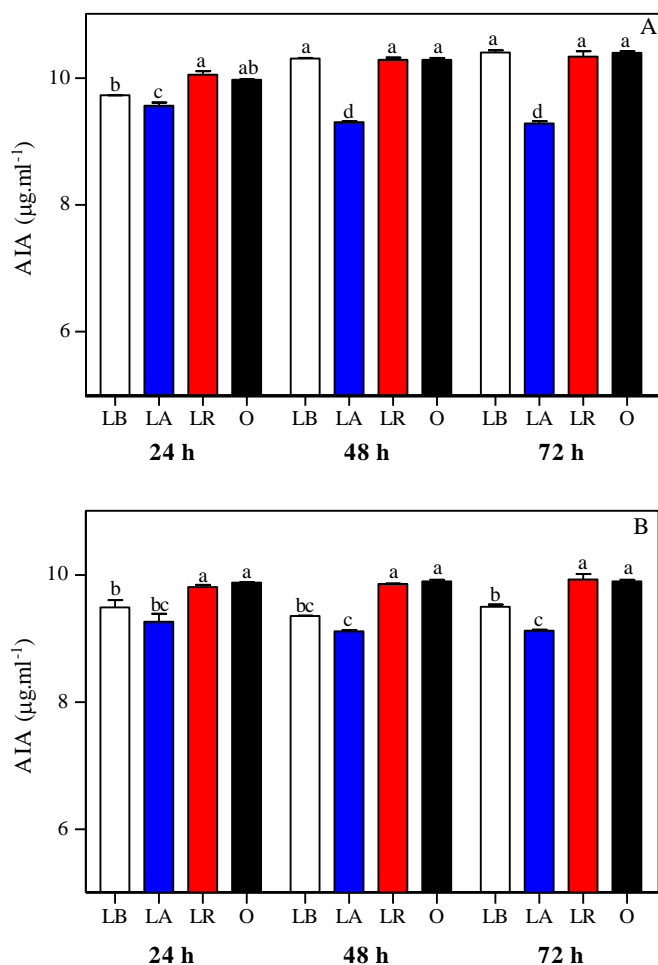


Figura 39. Evaluación de la síntesis de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en medio de cultivo inoculado con *A. brasilense* Az39 (A) o sin inocular (B), modificados por la adición exógena de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de (AIA) y $1 \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ de L-trp, expuestos a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de $36 \text{ }^\circ\text{C}$ y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 39 (A), se comprobó una disminución en la concentración de AIA detectada en el medio de cultivo a las 24 h de exposición a luz azul, lo que representó de

un 7 % con respecto al control mantenido en condiciones de oscuridad. La diferencia que se observó en la cantidad de AIA detectada en presencia a luz azul con respecto a los demás tratamientos, fue constante en tiempos mas prolongados, siendo inferior cerca de un 10% con respecto al control mantenido en condiciones de oscuridad. A las 48 h de exposición tanto en luz blanca y roja, los niveles de concentración de AIA o la estabilidad de esta molécula fueron similares a los que se detectó en condiciones de oscuridad, sin diferencias estadísticamente significativas.

La bacteria o alguno de sus metabolitos producidos durante el crecimiento tendría un rol fotoprotector sobre la molécula de AIA en presencia de luz azul, blanca o roja y quedó en evidencia por el comportamiento observado en aquellos tratamientos que no fueron inoculados, como se observa en la Figura 39 (B), cuando el medio de cultivo (sin inocular) fue modificado por el agregado exógeno de AIA ($10 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) más L-triptófano ($1 \text{ mg}.\text{ml}^{-1}$) y expuesto a las diferentes fuentes lumínicas. En ellos, la concentración de AIA ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) fue reducida en presencia a luz azul PAR38 a cada tiempo de exposición. A las 24 h se detectó una disminución de la concentración de AIA en el medio cercana al 7% con respecto al tratamiento en condiciones de oscuridad. Por otro lado, esta tendencia se observó durante las 48 y 72 de exposición a luz azul, tiempos en los que se detectó una disminución en la concentración de AIA en el medio de cultivo entre el 10 y 15% respectivamente. Con respecto a los niveles de concentración de AIA bajo luz blanca se observó una disminución a las 24 h de exposición de alrededor del 5% con respecto al control mantenido en condiciones de oscuridad; luego de 48-72 h de exposición a esta longitud de onda, se observó una disminución de dicha hormona con respecto al control de alrededor del 6%, manteniéndose contante dicha respuesta en el máximo tiempo de medición experimental. Este mismo comportamiento se observó en luz blanca y azul, sin embargo el efecto de la luz azul en la molécula de AIA fue bien marcado bajo esta longitud de onda. En luz roja y en el control mantenido en condiciones de oscuridad, no se observó diferencias significativas en los niveles de hormona detectados bajo estas condiciones durante 24, 48 y 72 h de exposición. En resumen, el tratamiento que mostró mayor impacto en la estabilidad de la molécula de AIA, fue el expuesto a luz azul, ya que luego de 24 horas de exposición generó la menor concentración de AIA.

Estos resultados permiten especular que la presencia del microorganismo metabólicamente activo o de alguno de sus metabolitos liberados en el medio de cultivo, tendrían la capacidad de reducir el proceso de degradación mediado por la luz de la molécula de AIA a lo largo del tiempo, o bien que la tasa de biosíntesis de la hormona por parte de la bacteria estaría incrementada, determinando un balance de acumulación por encima de un proceso de degradación. La adición exógena de AIA al cultivo con Az39, resultó en un estímulo para la biosíntesis de la hormona por parte de la bacteria, que equiparó la acumulación de la hormona (a un valor máximo) en condiciones de oscuridad, luz roja y luz blanca, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas entre estos tratamientos, independientemente del estímulo que representa cada tipo de fuente lumínica. Este fenómeno de retroalimentación positiva sobre la síntesis de AIA fue previamente reportado por Prinsen et al., (1993) en un sistema de inducción del gen *ipdC*, clave para la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* y que de manera indirecta nos permitiría suponer que la luz blanca podría actuar como inductora de la expresión de las proteínas fotoreceptoras, lo cual conduciría a la síntesis de moléculas involucradas en el proceso de biosíntesis o protección del AIA.

A modo de resumen se podría decir que la presencia de diferentes tipos de fuentes lumínicas afectarían de manera diferencial la acumulación y posiblemente la síntesis de AIA por *A. brasilense* Az39, así como la estabilidad de la hormona en el medio de cultivo a lo largo del tiempo. La luz blanca actuaría como un estímulo para la biosíntesis de AIA en la bacteria y la presencia del microorganismo permitiría su acumulación en el medio de cultivo, con un menor proceso degradativo. El proceso de foto-protección a la radiación, además sería efectivo en condiciones de exposición a la luz roja, mientras que en luz azul en presencia/ausencia del microorganismo provocaría la depleción de la concentración del compuesto en el medio.

IV.3.2.3. Agregación celular

El objetivo de este experimento fue determinar si la agregación celular resultaría alterada luego de exponer cultivos de Az39 a diferentes fuentes lumínicas. La Figura 40 muestra el porcentaje de agregación celular (% PA) en medio líquido Luria-Bertani bajo las condiciones previamente detalladas en el apartado metodológico.

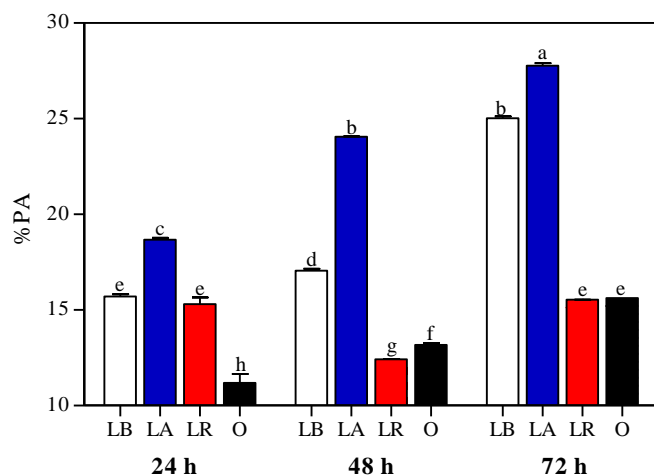


Figura 40. Evaluación del porcentaje de agregación (%PA) en *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR38); roja o LR (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 40, luego de 24 h de exposición se determinó un aumento significativo, y proporcional al tiempo de exposición, del porcentaje de agregación celular de Az39, por la exposición a luz azul y blanca, lo que representó una diferencia del 66 % y 40 % respectivamente con respecto al tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad. Esta diferencia alcanzó un máximo de 59% y 78% respectivamente luego de las 72 h de exposición. Por el contrario, en condiciones de exposición a luz roja, el comportamiento de la bacteria fue similar al que se observó en oscuridad, en el cual el porcentaje de agregación, fue similar.

A partir de lo observado, se podría decir que, la luz blanca o azul serían estímulos para que la bacteria aumente su estado de agregación celular, lo que ocurre normalmente en este microorganismo como parte de un mecanismo de escape a una condición ambiental desfavorable.

IV.3.2.4. Formación de Biofilms

El objetivo de este ensayo fue evaluar si la formación de biofilms por parte de Az39 se veía modificada por la exposición del microorganismo a diferentes fuentes lumínicas. La Figura 41 muestra los valores de DO obtenidos por la extracción de los biofilms en las condiciones experimentales previamente detalladas en el apartado metodológico.

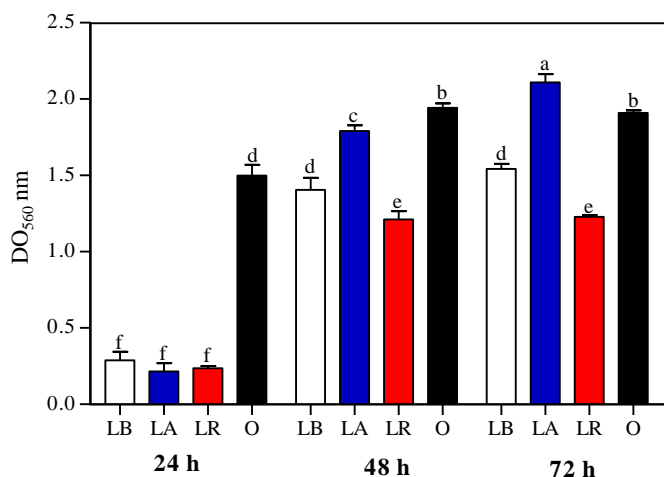


Figura 41. Evaluación de la formación de biofilm en *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca (LB) (75 W); azul o (LA) (PAR38); roja o (LR) (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Letras iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 41, la formación de biofilms fue similar en las diferentes longitudes de onda durante 24 h de exposición; mientras que en el tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad se observó una máxima producción cercana a un 80%, con respecto a los tratamientos expuestos a las fuentes lumínicas. A partir de las 48 h de exposición, se comprobó un incremento en la formación de biofilms cuando la bacteria fue expuesta a luz blanca y roja, pero en ambos casos con una respuesta inferior al control mantenido en oscuridad en alrededor del 30% y 25% respectivamente. La luz roja en comparación a la luz blanca, presentó el mayor porcentaje de inhibición a las 48 y 72 h en comparación con el control y al resto de las longitudes de onda. En el caso particular del tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad, alcanzó un máximo a las 24 h de exposición y luego la producción

de Biofilm fue creciente y constante hasta las 72 horas de incubación. Luego de 72 h de exposición a luz azul, se observó un valor máximo para la formación de biofilms que se diferenció del tratamiento control en un 23%.

A modo de resumen y considerando el sistema suelo como el sistema natural para la presencia del microorganismo, se podría asumir que en condiciones de oscuridad se estimularía de manera temprana la formación de biofilms por encima de cualquier longitud de onda. Por otro lado, la exposición prolongada a luz azul, aumentó la formación de tales estructuras, por encima de lo se observó en oscuridad y esto sería consecuencia de algún tipo de regulación o respuesta específica a la luz azul ya que ocurrió de manera inversa a la que se observó por exposición a la luz blanca. La exposición prolongada a luz roja determinó una reducción significativa de la capacidad de esta bacteria para formar biofilms; mientras que la luz blanca tuvo un comportamiento inhibitorio intermedio.

IV.3.2.5. Exopolisacáridos totales (EPS)

El objetivo de este experimento fue cuantificar la producción de carbohidratos totales liberados al medio de cultivo en forma de exopolisacáridos como consecuencia de la exposición de la bacteria a la luz. La Figura 42 muestra los valores de carbohidratos totales obtenidos por el método de Antrona como se describió en el apartado metodológico.

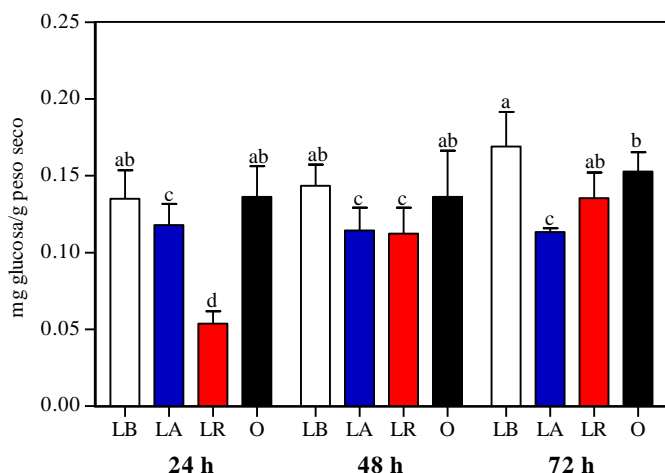


Figura 42. Evaluación exopolisacáridos totales en *A. brasilense* Az39 medio líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca (LB) (75 W); azul (LA) (PAR38); roja (LR) (PAR38) y oscuridad (O) durante 24 h, 48 h y 72 h. En todos los casos los tratamientos fueron

incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tal como se observa en la Figura 42, en los cultivos expuestos a la luz roja y azul, se detectó la menor concentración de polisacáridos (mg de glucosa) con respecto al control mantenido en condiciones de oscuridad, en un 20% y un 45% respectivamente, mientras que la exposición a luz blanca, no mostró diferencias estadísticamente significativas con el control, comportamiento que se mantuvo en tiempos prolongados (48-72 h). A las 48 h de exposición la producción de polisacáridos extracelulares, se igualó en luz azul y roja, pero en ambos casos fueron menores a los valores producidos en condiciones de oscuridad en alrededor del 15%. Por último, a las 72 h de exposición, la menor producción de polisacárido, se detectó en luz azul, siendo inferior a los valores producidos en condiciones de oscuridad en alrededor del 15%, sin embargo la exposición a luz roja, produjo concentraciones similares al control.

IV.4. Discusión

En el sentido más general, uno de los principales objetivos de éste Capítulo de Tesis fue analizar el efecto de la luz en *A. brasilense* Az39, teniendo en cuenta que esta bacteria cuenta en su genoma con tres (3) secuencias codificantes de proteínas del tipo receptoras de luz. La función de los receptores del tipo fitocromo en los sistemas biológicos es la de supervisar la información del medio ambiente en forma de señales luminosas y así generar una respuesta bajo las condiciones imperantes. Es otras palabras, los fotorreceptores supervisan y censan constantemente múltiples parámetros físicos relacionados con la luz incidente, tales como la presencia/ausencia; longitud de onda e intensidad y la transducen a través de diferentes vías de señalización intracelular que provocan respuestas moleculares y celulares específicas para el organismo (Quail, 2002). Como ya se dijo previamente, en este Capítulo se intentó asociar alguna respuesta a la luz mediante diversos experimentos y así correlacionarla con la presencia y actividad de los fitocromos. Fundamentalmente, fue de interés evaluar aquellas respuestas relacionadas con el estilo de vida de esta bacteria y con su capacidad PGPR.

A partir de los experimentos presentados en medio de cultivo líquido, desarrollados en su totalidad en medios nutricionalmente complejos (LB) y definidos (MMAB), pudo verse que la

exposición a cada tipo de luz no fue letal para el microorganismo en ninguno de los medios, a diferencia de lo que se observó en condiciones de medio sólido (Capítulo III). En el sistema experimental diseñado para esta Tesis y utilizando el medio mínimo MMAB modificado por la adición exógena de L-Triptófano para asegurar la producción de AIA, se observó un descenso en la producción de la biomasa en cultivos expuestos a luz blanca y azul en relación a aquellos expuestos a luz roja y oscuridad, siendo estos últimos similares entre sí. Esto similar fue reportado por Kumar et al., (2012), en *A. brasilense* Sp7 pero expuesta a luz roja en medio de cultivo mínimo MMAB (con 38 mM de malato como fuente de carbono) comparado al control en oscuridad. Por otro lado, no se observó diferencias numéricas significativas en las poblaciones bacterianas obtenidas en cada cultivo expuesto a las diferentes fuentes de luz. A partir de los experimentos llevados a cabo durante esta Tesis, se podría decir, que la adición del aminoácido al medio de cultivo MMAB no cambio significativamente el comportamiento de la bacteria a nivel poblacional en cada condición de cultivo y solo provocó un incremento en la producción de biomasa en condiciones de exposición a luz roja o en oscuridad. Algunos autores presuponen que el aminoácido L-Trp adicionado al medio de cultivo de determinados microorganismos, tales como de aquellos pertenecientes al género *Azospirillum* podría afectar su tasa de crecimiento y la duración de la fase logarítmica y concentración celular en una curva de crecimiento (Zimmer et al., 1988). En contrapartida, se comprobó un aumento de la biomasa cuando el microorganismo fue expuesto a luz blanca en medio líquido nutricionalmente complejo (LB); parámetro que no se correlacionó con el aumento del número de células viables a nivel poblacional, tal como se observó en medio MMAB. Existe muy poca información acerca del efecto de la luz en el crecimiento de bacterias no fotosintéticas. Tal es el trabajo que se ha mencionado hasta el momento reportado por Kumar et al., (2012) relacionado con *A. brasilense* Sp7, el cual mostró mayor producción de biomasa en medio LB en luz roja, en comparación a la biomasa producida en medio MMAB, con malato como única fuente de carbono. En adición, estos autores, demuestran que la producción de biomasa en la cepa mutante para uno de los bacteriofitocromos, fue inferior en medio LB y MMAB, pero siendo de mayor importancia en el medio definido. A partir de estas observaciones, los autores le atribuyen a los bacteriofitocromos la participación en el manejo del estrés fotodinámico, probablemente al detectar la señal luminosa y al transducirla a través del regulador de respuesta a la cascada

regulatoria descendente para inducir las proteínas que podrían participar en la respuesta al estrés fotodinámico. Este reporte resulta muy interesante, desde el punto de vista en el que los autores solo encontraron esta respuesta cuando creció en medio de cultivo mínimo. No existen otros reportes que brinden información del comportamiento diferencial de *Azospirillum* o *A. brasilense* y menos de la cepa Az39 expuesta a luz y en medios de cultivos considerados definidos o complejos desde el punto de vista nutricional. Kumar et al., (2012) culminan su trabajo de investigación con una pregunta diciendo ¿Por qué la luz roja es más letal para la cepa mutante (Δ AbBphP1) en medio mínimo que en medio rico LB? A partir de ese trabajo y de los resultados alcanzados durante este trabajo de Tesis, se puede decir que el modelo necesita seguir siendo investigado en bacterias del género *Azospirillum* para llegar a una conclusión e interpretación mas precisa del proceso. Existe una amplia variedad de resultados obtenidos en condiciones agronómicas por la inoculación con *Azospirillum* y parecen ser algo inconsistentes desde el punto de vista de lo que se observa como respuesta (Bashan, 1998). Por otro lado, se sabe que el AIA es la principal hormona responsable de promover el crecimiento y desarrollo radicular luego de la inoculación, lo que sugiere que la viabilidad de la bacteria o su capacidad de biosíntesis de AIA podrían verse afectadas por diversos factores ambientales en condiciones agronómicas y entre ellos, la luz. Se han publicado varios informes contradictorios sobre los factores que pueden influir en la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* (Vande Broek et al., 1999; Reed y Glick, 2004; Molina et al., 2018) y se ha propuesto que el AIA, es una de las fitohormonas de mayor interés, y puede actuar como molécula señal para la regulación de la expresión genética en *A. brasilense*, siendo este microorganismo capaz de censarla e inducir una respuesta mediante la activación o inhibición de genes, participando así como un intermediario en la comunicación planta-microorganismo (Van Puyvelde et al., 2011). Por esto, fue de gran interés en este trabajo de Tesis, determinar si la luz podía alterar o modificar la producción de AIA en Az39 creciendo expuesta a diferentes fuentes lumínicas y en medios de cultivos con características nutricionales opuestas. A partir de los experimentos realizados en medio líquido, se pudo observar que la acumulación de ácido indol-3-acético en el medio definido MMAB, tuvo un máximo de producción de AIA durante las primeras 48 h en luz blanca; comportamiento similar al alcanzado en condiciones de oscuridad. Por otro lado, la producción de AIA resultó aumentada en Az39 cuando creció expuesta a luz blanca en medio de cultivo LB; por el contrario, en luz azul, se observó la

menor concentración de esta hormona. Existen pocos reportes previos en los que la biosíntesis de AIA fuera inducida por condiciones de estrés ambiental en *A. brasilense*. En los trabajos de Ona et al., (2005) y Sun et al., (2014) se reporta que la deficiencia de carbono y oxígeno en el medio de cultivo, así como la entrada a la fase estacionaria de crecimiento serían factores inductores de la biosíntesis de la hormona; sin embargo, en nuestro trabajo observamos un incremento de AIA por la exposición de la bacteria luz blanca, lo que permitiría incluir éste factor ambiental a otros desencadenantes de la biosíntesis de la hormona previamente mencionados. De acuerdo a los resultados presentados hasta aquí, podría considerarse que la luz blanca es un factor generador de estrés para Az39 y que ésta longitud de onda induce la producción de AIA por el microorganismo. De manera homóloga en *Enterobacter cloacae* y *Pseudomonas putida* GR12-2, se ha visto que en respuesta a un estrés ambiental se sobreexpresa el gen *rpoS* y se produce un incremento en la producción de AIA (Saleh et al., 2001; Patten y Glick, 2002).

Como ya se ha establecido en un gran número de reportes previos, el uso de medios de cultivos de composición compleja o definida afecta de manera diferencial la biosíntesis y acumulación de AIA en bacterias y la presencia de la hormona además, puede modificar la capacidad de tales microorganismos para biosintetizar la misma hormona en sistemas de feedback positivo (Vishwakarma et al., 2017; Prinsen et al., 1993). En los experimentos mostrados en este Capítulo, la adición exógena de AIA al medio de cultivo, resultó en un estímulo para la biosíntesis de la hormona por la bacteria, que equiparó la acumulación en condiciones de oscuridad, luz roja y blanca, sin que se observaran diferencias significativas entre estos tratamientos, independientemente del estímulo lumínico en sí mismo. La capacidad de producir AIA a partir del aminoácido L-Trp es importante en el entorno de la rizósfera para ésta bacteria, ya que se ha demostrado que el triptófano es uno de los componentes normales de los exudados de la raíz con las que están asociadas las bacterias PGPR (Somers et al., 2004). El análisis bioquímico y genético de la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*, revela la presencia de múltiples vías de síntesis de la forma activa (Prinsen et al., 1993), tal como la vía, indol-3-piruvato (IPA), indol 3-acetamida (IAM) y triptamina (TAM), y una vía de trp-independiente (Prinsen et al., 1993; Carreño-López et al., 2000), siendo la vía del indol-3-piruvato, la más importante para el género. La enzima clave de esta vía es la indol-3-piruvato descarboxilasa (codificada por el gen *ipdC*). Este fenómeno de retroalimentación positiva

sobre la síntesis de AIA fue previamente reportado por Prinsen et al., (1993) y Vande Broek et al., (2005) en un sistema de inducción del gen *ipdC*, clave para la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* y de manera indirecta nos permitiría suponer que la luz blanca podría estar ejerciendo un efecto equivalente a la presencia de la hormona en el medio de cultivo a nivel de la expresión del gen *ipdC* teniendo como consecuencia un aumento de la síntesis de AIA en luz blanca.

A modo de resumen se podría afirmar que la presencia de diferentes fuentes lumínicas afectan de manera particular la biosíntesis de AIA en *A. brasilense* Az39 y su estabilidad a lo largo del tiempo en sistemas complejos. La luz blanca sería un estímulo positivo para la biosíntesis de la hormona; mientras que la luz azul sería capaz de reducir los niveles de este metabolito en sistemas complejos, lo que además sería reducido en presencia de la bacteria en el sistema. Este modelo experimental podría tener implicancias en el estilo de vida de la bacteria en la rizósfera y en su capacidad para promover el crecimiento de plantas inoculadas, por lo que a futuro se deberán definir nuevos experimentos que permitan resolver este complejo modelo funcional.

IV.4.1. Agregación celular, formación de Biofilms y producción de EPS

Se sabe que *Azospirillum* es un microorganismo capaz de formar agregados celulares (Nur et al., 1980). El proceso de agregación celular está íntimamente relacionado con la relación C:N del medio de cultivo, es decir a la condición nutricional en la que se encuentra el microorganismo, pero también depende de ciertas señales ambientales a las que está expuesto (Burdman et al., 2000). En el caso de *A. brasilense*, hay evidencias claras sobre el importante papel de los polisacáridos extracelulares (exopolisacáridos, EPS y polisacáridos capsulares, CPS) en el proceso de agregación celular (Del Gallo y Haegi, 1990; Burdman et al., 2000a). Los resultados presentados en este capítulo demostraron un aumento en el porcentaje de agregación luego de que el medio de cultivo fuese expuesto a luz azul y blanca. En presencia de luz azul y blanca, Az39 desencadenó el proceso de agregación celular que no tendría una base estrictamente nutricional. En bacterias gramnegativas la agregación suele estar asociada a fimbrias o pilis, pero ninguna de estas estructuras han sido encontradas en *Azospirillum* (Burdman et al., 2000a). Resultados recientes sugieren que las exposiciones de cultivos de

Escherichia coli K12 a luz azul, producen una disminución de la formación de biopelículas y un aumento en la movilidad que no fue detectada en células cultivadas en condiciones de luz roja. Estudios previos han demostrado que el fenómeno de agregación en *A. brasilense* está mediado por la composición de monosacáridos presentes en el EPS (Burdman et al., 2000a) y por proteínas, como por ejemplo del tipo de las lectinas (Nikitina, 2001). Los resultados mostrados en este Capítulo, sugieren una disminución en la concentración de EPS totales extraídos en la etapa experimental bajo la presencia de las tres fuentes lumínicas comparadas al control mantenido en oscuridad, sin embargo en presencia de luz azul se observó una disminución en la concentración de EPS a lo largo del tiempo. Esto probablemente se deba a la alteración en la biosíntesis de algún tipo de azúcar, que conjuntamente al resto de la matriz metabólica, forman parte del EPS liberado al medio de cultivo. Independientemente de la disminución en la producción de EPS que se observó en presencia de una fuente lumínica, este comportamiento se correlacionó inversamente con lo observado en agregación celular, en cuyo caso se observó el máximo porcentaje por la exposición a luz blanca y luz azul. Se ha visto que cepas pertenecientes al género *Azospirillum* pueden generar diferentes cantidades de polisacáridos en medio de cultivo con alta o baja relación C:N. El estrés metabólico implica cambios morfológicos significativos, incluida la pérdida de movilidad, el aumento en la acumulación de sustancias de reserva y de la producción de exopolisacáridos, lo que sugiere que la remodelación de la superficie celular es estratégica contra el estrés (Bible et al., 2015). El grado de la agregación entre los microorganismos se correlaciona con cantidades de EPS, tanto en baja como en alta relación C: N por lo que sería de esperar una mayor concentración de EPS en medio de cultivo con alta relación; sin embargo, este no es el caso en cultivos para las cepas FAJ0204 y Cd pertenecientes al género *Azospirillum*. Esta indica que no sólo la cantidad de EPS producidos, sino también su estructura y composición, pueden jugar un papel en la agregación (Sadasivan y Neyra, 1985; Del Gallo et al., 1989; Michiels et al., 1991; Arunakumari et al., 1992; Katupitiya et al., 1995). Reportes previos mencionan que el tipo de exopolisacárido que se excreta al medio de cultivo, determina la agregación celular; sin embargo, también existen otras proteínas de membrana (OMP) que están involucradas en este proceso (Burdman et al., 1999). Es posible que tales proteínas OMP (s) sean de expresión constitutiva en *A. brasilense*, generando diferencias en el grado de agregación celular entre las diversas cepas, además de la cantidad, composición y estructura del polisacárido extracelular

producido. Recientemente, en un ensayo con lectinas de la superficie celular de *A. brasilense*, se encontró que la arabinosa, es el único azúcar capaz de inhibir completamente la aglutinación de células de *A. brasilense* sp245 (Pereg et al., 2015). Este hallazgo no excluye que otros azúcares residuales presentes en los polisacáridos extracelulares liberados por la bacteria, también puedan estar implicados en la agregación de células, aunque no existen evidencias para esta posibilidad. Tanto las leptospiras de vida libre como las patógenas sobreviven en el suelo y el agua durante varios meses y están expuestas de forma natural a la radiación solar UV (Stamm y Charon, 1988). La forma planctónica de leptospiras sobrevive solo durante 10 min, mientras que en presencia de *A. brasilense*, la supervivencia se extiende hasta 20 minutos. Esto fue similar a informes previos sobre leptospiras planctónicas y otros microorganismos (Wong-ekkabut et al., 2009; Chadsuthi et al., 2010). La formación de biofilms bacterianos en la superficie de la raíz de la planta puede tener una gran importancia, ya que la actividad biológica de algunos PGPR depende de su capacidad para colonizar la rizosfera y permanecer asociado con la raíz (Lugtenberg y Dekkers, 1999). La capacidad de adherencia en *Azospirillum* es sumamente importante, debido a que es necesaria en la primera etapa de colonización de las raíces vegetales, cuando el microorganismo debe fijarse a la superficie de la planta. El proceso de colonización de *Azospirillum* sp. ocurre en dos etapas, la primera es de adsorción, de la cual participa el flagelo polar (Croes et al., 1993) y la segunda es de anclaje y dependiente de los exopolisacáridos (Michiels et al., 1991). El resultado final es una agrupación irreversible de células en una estructura compleja, formada formada en una matriz de polisacárido, que mantienen unidas las células bacterianas entre sí y a la raíz (de-Bashan et al., 2011; Donlan, 2002). Con respecto a la formación de biofilms, bajo las condiciones experimentales propuestas en esta tesis, se observó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados a lo largo del tiempo, ya que al máximo tiempo de exposición a luz azul, se observó el mayor incremento en la formación de biofilms, lo cual se correlacionó de manera directa con el fenómeno de agregación celular. Este comportamiento, probablemente se deba a que los microorganismos y en particular *Azospirillum* no se comportan de la misma manera cuando crecen libres en el medio de cultivo (en estado de vida planctónica), en relación a cuando crecen en consorcios microbianos asociados a una superficie, como ocurre en el caso de los biofilms (Southey-Pillig et al., 2005). Para la mayoría de los casos mencionados la capacidad de formar biofilms está relacionada con el aumento de la virulencia

o en la competencia bacteriana; mientras que en *Azospirillum* la formación de biofilms se asociaría con la capacidad del microorganismo para colonizar la raíz. Las leptospiras en biofilm son capaces de soportar radiación solar y se informó que su temperatura óptima de crecimiento es de 25-30 °C pero no crece más allá de 42 °C (Noguchi 1918, Johnson y Harris 1967); sin embargo, en biopelículas junto a *A. brasilense*, la viabilidad de las leptospiras se extiende, ya que al residir dentro de un agregado pueden tolerar más la temperatura y la radiación.

En resumen, en este Capítulo se logró demostrar que *A. brasilense* Az39 puede ser afectado por la presencia de luz blanca y azul cuando crece en estado planctónico, lo que sería común cuando se formula *A. brasilense* para su utilización como inoculante en diferentes prácticas agrícolas, incluida la inoculación de semillas, en surco o particularmente por su aplicación foliar en plantas de soja, maíz o trigo, entre otros cultivos (Puente et al., 2017, 2018; Fukami et al., 2016, 2018). Preininger et al., (2018) han recopilado recientemente los conceptos más significativos sobre inoculantes microbianos de aplicación foliar y considera que las condiciones ambientales deben ser óptimas durante la pulverización para garantizar la funcionalidad de dichos productos de origen biológico. Además, en el mismo trabajo, reconocen el efecto nocivo de la luz en los microorganismos utilizados como principio activo de productos comerciales cuando mencionan que los inoculantes deben contener compuestos protectores, como los absorbentes de luz (Rojo congo, derivados del estilbeno) o las nanopartículas (óxido de zinc, óxido de titanio, sílice y óxido de grafeno) para prevenir la desactivación de los microorganismos por la luz solar. Si bien consideramos a la luz como un factor ambiental crítico y necesario para muchos microorganismos fotoautótrofos; desde el descubrimiento de las proteínas fotorreceptoras en bacterias no fotosintéticas, han surgido preguntas sobre las respuestas producidas en estos en presencia de luz, un fenómeno que debería seguir explorándose en la fotobiología.

IV.5. Conclusiones

IV.5.1. En medio mínimo MMAB

IV.5.1.1. A nivel de crecimiento

La exposición *A. brasilense* Az39 a las 3 fuentes lumínicas estudiadas, luz blanca (75 W), azul PAR38 y roja PAR38, no generó letalidad. La luz roja y la oscuridad generaron mayor

producción de biomasa, con respecto a la luz blanca y azul; sin embargo, no se observó diferencias significativas en el número de células viables en presencia de cualquier tipo de luz a lo largo del tiempo.

IV.5.1.2. A nivel de biosíntesis de AIA

La exposición de *A. brasilense* Az39 a luz blanca, azul y roja tuvo un impacto positivo sobre la producción y acumulación de AIA a lo largo del tiempo, pero esta tendencia se revirtió, siendo el tratamiento en condiciones de oscuridad en el cual se detectó la máxima concentración de esta molécula.

IV.5.2. En medio de cultivo nutricionalmente complejo

IV.5.2.1. A nivel de crecimiento

La exposición a las tres fuentes lumínicas no generó letalidad en *A. brasilense* Az39. La luz azul y principalmente la blanca, generaron mayor desarrollo de biomasa, con respecto a la luz roja y al tratamiento en condiciones de oscuridad; sin embargo no se observó diferencias en el número de células en presencia de cualquier tipo de luz a lo largo del tiempo.

IV.5.2.2. A nivel de Biosíntesis de AIA

La acumulación de AIA, así como la estabilidad de esta molécula en el medio de cultivo a lo largo del tiempo resultaron afectadas de manera negativa por la exposición a luz azul y de manera positiva por la exposición a la luz blanca.

IV.5.2.3. Agregación celular, formación de Biofilms y producción de EPS

El fenómeno de agregación celular, como así también la producción de exopolisacáridos totales resultó afectado positiva/negativamente en presencia de luz azul a diferentes tiempos de exposición. No se observó una correlación entre la producción de EPS y el porcentaje de agregación celular, probablemente por la expresión y síntesis de ciertas proteínas, que contribuirían en este proceso y con una regulación propia. La formación de biofilms tuvo un comportamiento similar y aumentó por exposición a luz azul a lo largo del tiempo. La concentración y estructura química del exopolisacárido o polisacárido capsular, definieron el porcentaje de agregación celular (mayor o menor) como así también la capacidad de formar biofilms bajo determinadas condiciones experimentales.

CAPÍTULO V: Análisis transcriptómico de *A. brasilense* Az39 expuesto a la luz.

V. Marco teórico general

Desde hace unos años atrás, la biología y la biotecnología, han logrado importantes avances que han permitido alcanzar una visión global de diversos procesos biológicos. Este concepto de globalización, se ve reflejado en el desarrollo de lo que se ha denominado como “La era ómica”. El sufijo “-oma” tiene origen latino y significa “conjunto de”. Es por tanto, la adición de este sufijo a diferentes estudios en biología. Cuando se hace referencia a ciencias ómicas, nos trasladamos a las disciplinas como la genómica, la proteómica, la transcriptómica y la metabolómica, entre otras. A estas tres últimas también se las agrupa bajo la denominación de “genómica funcional”, ya que estudian a los productos de la expresión de los genes. Todas estas disciplinas generan grandes conocimientos sobre diversos mecanismos o funciones biológicas. De manera adicional, también aportan un gran desarrollo en el campo del análisis de la funcionalidad celular y en sus aplicaciones biotecnológicas, lo que en la actualidad, no solo posee un impacto a nivel ecológico, sino también económico (Mochida y Shinozaki, 2011). En particular, en este trabajo de tesis nos focalizaremos además de la genómica, en el análisis transcriptómico de Az39 en diferentes condiciones experimentales relacionadas con la luz, por lo que a continuación vamos a profundizar en la comprensión de esta herramienta.

V.1. La transcriptómica

El estudio de la expresión génica en microorganismos revela importantes conocimientos sobre cómo las bacterias perciben y responden a diferentes estímulos en los hábitats más variados (Dötsc et al., 2012). Así, la transcriptómica estudia y compara los transcriptomas, es decir, los conjuntos de ARN mensajeros o “transcriptos” presentes en una determinada célula, tejido u organismo, en un determinado tiempo-espacio (Wang et al., 2009). Así también eventos celulares tales como la replicación, la diferenciación y la división celular y otros caracteres macroscópicos como rasgos fenotípicos, morfológicos, funcionales y de respuesta ante estímulos, son producto de la expresión diferencial de genes, por lo que la transcriptómica es una excelente herramienta para comprender la estructura génica y la regulación ARN-dependiente de cualquier organismo (Sorek y Cossart, 2010). Como ya se conoce, la transcripción es un proceso nuclear cuya activación depende de estímulos intra o extracelulares que activan cascadas de señalización para determinar cuáles genes deben expresarse o reprimirse de acuerdo con el tipo de estímulo inicial. La cantidad de moléculas

producidas de determinado ARNm depende de la función que este tenga en un proceso celular específico. Así, cuando se requiera dar respuesta a una condición determinada en la cual un gen tiene una participación importante, más moléculas de este transcrito se producirán en espacio-tiempo. De manera similar, bajo ciertas circunstancias particulares hay genes que permanecen apagados, pero un estímulo hace que se expresen y se inicia entonces la transcripción. De esta manera la determinación de dónde, cómo y cuándo es generado un transcrito, bajo una condición dada, es fundamental para el entendimiento de la actividad biológica de un gen. Así, se podría decir que el transcriptoma es un conjunto de transcritos (ARNm) de una célula en un estadio específico (espacio-tiempo) y bajo una condición fisiológica determinada (Soto Sedano et al., 2012).

V.1.1. El análisis transcriptómico

En la década de los noventa, los procedimientos de Northern Blot, Microarreglos de ADNc, los ADNc-AFLP o el análisis serial de expresión de genes del tipo SAGE (del inglés Serial Analysis of Gene Expression), entre otras técnicas moleculares asociadas al ARN, permitieron el desarrollo y generación de nuevos conocimientos en el área de la transcriptómica por su capacidad de estudiar la expresión de genes relacionados con respuestas a estímulos o a condiciones particulares o determinar cambios en los patrones de expresión génica en tratamientos y cinéticas de expresión (Shalon et al., 1996; Schena et al., 1998; Meyers et al., 2004; Marguerat y Bahler, 2010). Actualmente, y gracias a los avances en las técnicas de secuenciación del ADN, a través de tecnologías de nueva generación, NGS (del inglés Next Generation Sequencing), han revolucionado ciertos campos de estudio, como el de la genómica y la transcriptómica. Estas tecnologías han permitido no solo generar información con altos rendimientos y bajo costo, sino también abrir nuevos horizontes para el entendimiento detallado y global de procesos de expresión génica (Schneeberger y Weigel, 2011; Ward et al., 2012), para la cuantificación de transcriptomas o la hibridación de microarreglos (microarrays), ESTs (del inglés, Expressed Sequence Tag) y secuenciamiento a gran escala o ARN-seq (Wang et al., 2009). Esta última tecnología en particular, denominada ARN-seq (del inglés: ARN sequencing) es esencial para el secuenciamiento masivo de ADNc (ADN complementario obtenido por transcriptasa inversa a partir de ARNm) derivado de ARNm celular (Ozsolak y Milos, 2011). En la actualidad existen 4 plataformas de

secuenciación de nueva generación generalmente utilizadas para este fin: Illumina (HiSeq), Life Technologies (PGM y Proton), Pacific Biosciences (RS) y Roche (454) (Sheng et al., 2014). Cada una de éstas plataformas puede ser empleada en la secuenciación de transcriptomas de origen bacteriano, por lo tanto cada una de las tecnologías poseen ventajas y desventajas en cuanto al número de lecturas o "reads", duración de la corrida, capacidad y generación de información, entre otros. De manera particular, se puede decir que con la técnica de ARN-Seq se obtiene información de ARNs en una muestra, incluyendo mARNs, rARNs, tARNs y otros ARNs no codificantes "SmallARNs" (miARNs, snoARNs, piARNs, entre otros). A partir de este paso, se determina el nivel de expresión de los genes, el empalme o "splicing" alternativo, las mutaciones, deleciones y así mismo la aparición de nuevos transcriptos. La metodología empleada para el desarrollo de un ensayo de transcriptómica comprende una serie de pasos sucesivos de índole biológico o bioquímico hasta finalizar con el análisis informático de la información generada (análisis bioinformático). La secuencia se inicia con la extracción del ARN de una muestra, la cual es fragmentada por hidrólisis y convertida a ADNc. A partir del ADNc obtenido se genera una biblioteca genómica con adaptadores específicos para posteriormente realizar una amplificación por PCR y secuenciar los "amplicones" utilizando las tecnologías de alto rendimiento mencionadas. El método de preparación de la biblioteca de ADNc varía dependiendo de la especie de ARN bajo investigación, que puede diferir en tamaño, secuencia, características estructurales y abundancia. Las consideraciones principales incluyen como obtener ARN de interés, como convertir el ARN en ADNc y como colocar secuencias de adaptadores en los extremos de ADNc para amplificación y secuenciación (Hrdlickova et al., 2017). El procedimiento general se resume en la Figura 43.

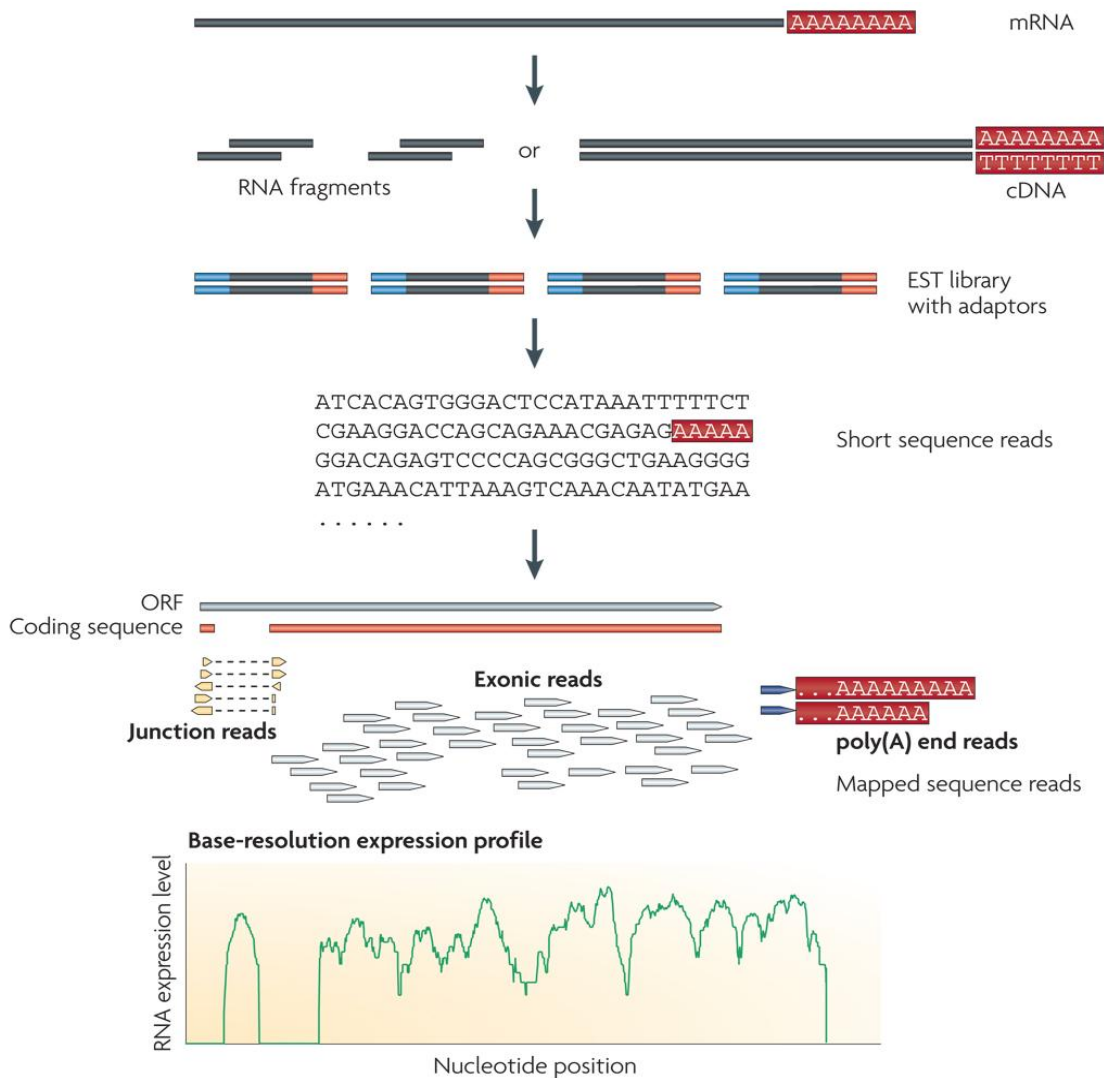


Figura 43. Pasos característicos de un experimento de ARN-Seq (Wang et al., 2009).

Dentro de las aplicaciones y ventajas que tiene la tecnología de ARN-seq se menciona la capacidad de generar una cobertura completa de transcritos, obtenida por la información tanto de la secuencia, como de la estructura de exones y sitios de splicing alternativo (Lister et al., 2009). Asimismo, los datos arrojados por ARN-seq tienen una alta precisión con respecto a los niveles de expresión génica que se obtienen a través de PCR (del inglés quantitative Polymerase Chain Reaction) o qPCR (Nagalakshmi et al., 2008; Wang et al., 2009; Ward et al., 2012). Por otro lado, se ha mostrado que los resultados obtenidos a través de este procedimiento son altamente reproducibles (Wang et al., 2009).

V.1.1.1. Construcción de la biblioteca de ARN-seq

El método ideal para transcriptómica sería identificar y cuantificar directamente todos los ARN de la muestra. Los ARN pequeños o microARN (miRNA), ARNs que interaccionan con Piwi (piRNA) y ARNs de interferencia cortas (siRNA) y otros, se pueden secuenciar después de ligar el adaptador. Los ARN más grandes, se deben fragmentar en pedazos más pequeños (200-500 pb) para ser compatibles con la mayoría de las tecnologías de secuenciación. Los métodos de fragmentación comunes incluyen la fragmentación de ARN (hidrólisis o nebulización de ARN) y la fragmentación de ADNc (tratamiento con DNasa I o sonicación). La fragmentación del ARN tiene poco sesgo sobre el cuerpo de la transcripción (Mortazavi et al., 2008), mientras que la fragmentación del ADNc suele estar fuertemente sesgada hacia la identificación de secuencias a partir de los extremos 3' de las transcripciones y, proporciona información valiosa sobre la identidad precisa de estos extremos (Nagalakshmi et al., 2008).

V.1.1.2. Bioinformática asociada a la secuenciación de ARN

La secuenciación masiva de ARN enfrenta varios desafíos informáticos, tal como obtener un método eficiente para almacenar, recuperar y procesar grandes cantidades de datos, y reducir los errores en el análisis de imágenes y la calidad de los reads (Wang et al., 2009). Una vez que los reads de alta calidad han sido obtenidos, la primera tarea a realizar es la de mapear los reads cortos de ARN-ARN sobre genoma de referencia. Para ello existen varios programas disponibles, tales como ELAND, SOAP (Li et al., 2008), MAQ (Li et al., 2008) y RMAP (Smith et al., 2008).

V.1.1.3. Nivel de transcripción ARN

La secuenciación masiva de ARN es una metodología cuantitativa y se puede utilizar para determinar los niveles de expresión de ARN con mayor precisión que la de microarrays. Es posible determinar la cantidad absoluta de ARN en una población celular y comparar directamente los resultados entre experimentos. Los niveles de expresión génica se correlacionan estrechamente con controles obtenidos por qPCR. Una ventaja particularmente poderosa de ARN-seq es que puede capturar la dinámica del transcriptoma en diferentes condiciones sin normalización sofisticada del conjunto de datos (Wang et al., 2009).

V.1.1.4. Estudios transcriptómicos en *A. brasilense*.

La relación *Azospirillum*-ambiente y *Azospirillum*-planta se ha estudiado principalmente desde el punto de vista agronómico y fisiológico, lo que ha conducido a una amplia descripción de los mecanismos implicados en los efectos asociados al estilo de vida rizoférico y a la promoción del crecimiento vegetal (Droge et al., 2014b); sin embargo, se sabe poco sobre los determinantes genéticos implicados en la adaptación bacteriana al suelo y a la planta huésped durante la transición desde la vida rizósfera a la vida epifítica o endofítica. Así, el rol benéfico de este microorganismo en su estrecha asociación con las plantas, ha sido mayoritariamente abordado desde un enfoque génico individual o minoritariamente desde su interacción con la planta desde un enfoque génico dual o desde el efecto bacteriano sobre el flujo génico eucariota (hospedero). Considerando el primer grupo de reportes, se puede mencionar que Van puyvelde et al., (2011), realizaron un análisis para estudiar el efecto general del ácido 3-indol-acético (AIA), biosintetizado por la bacteria o añadido exógenamente sobre el transcriptoma de *A. brasilense* Sp245 wt y una cepa mutante Sp245 *ipdC* (deficiente para la biosíntesis de AIA). Rivera et al., (2018, Tesis Doctoral) realizaron un análisis transcriptómico de diferentes medios de cultivos que habitualmente se utilizan en el laboratorio para cultivar *A. brasilense*, el medio mínimo (MMAB) y el medio nutritivo (LB). Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que un gran número de genes son inducidos cuando es utilizado el medio rico LB en comparación el medio mínimo MMAB y algunos de ellos están relacionados con ciertos mecanismos de promoción de crecimiento. Trabajos similares fueron realizados para microorganismos en diferentes medios, como aquel publicado por Liu et al. (2013) en el que realizan un análisis comparativo del transcriptoma de la bacteria fitopatógena *Xanthomonas campestris* Xcc 8004, en los medios MMX y NYG como una estrategia para lograr una caracterización funcional de genes de esta bacteria. Igualmente en otro estudio utilizando ARNseq de ARN fue desarrollado por Blair et al. (2013) quienes señalaron que es importante considerar la selección del medio de cultivo a la hora de realizar estudios microbiológicos, debido a que encontraron diferencias relevantes particularmente relacionadas con la virulencia en el transcriptoma de *Salmonella enterica* SL1344 al utilizar diferentes medios de cultivo. De los perfiles transcriptómicos de *A. brasilense* Az39 obtenidos por Rivera (2017, Tesis Doctoral) se observó que los genes *ipdC*, *hisC1* y *nitA* de la ruta de biosíntesis de AIA fueron inducidos cuando se cultivó a la bacteria

en medio LB en comparación con el medio mínimo MMAB. Además, se determinó que la bacteria, cuando se expone de manera exógena al AIA, se adapta a una condición o estilo de vida de la rizósfera, cambiando su arsenal de proteínas de transporte y de superficie celular con un aumento en la expresión de las proteínas relacionadas con el sistema de secreción tipo VI (SST6), por lo que se sugiere que el SST6 se encontraría directamente implicado en la interacción planta-bacteria, como recientemente probó Cassán et al., (2019) (en prensa) en el microalga *Chlorella sorokiniana*. Por otro lado, los trabajos publicados en modelos de interacción planta-bacteria, se han valido de la comprensión de dobles perfiles transcripcionales por el uso de metodologías de secuenciación de ARN, como aquel obtenido en raíces del trigo inoculadas con *A. brasilense* FP2 por Camilios-Neto et al. (2014). En este trabajo, los autores identificaron 23.215 ESTs (del inglés, Expressed Sequence Tag) expresados en trigo y 702 transcripciones expresados en *A. brasilense*. La colonización bacteriana causó cambios en la expresión de 776 ESTs en trigo pertenecientes a diferentes categorías funcionales, que estuvieron desde la actividad de transporte de la regulación biológica, así como mecanismo de defensa, producción de fitohormonas y otros compuestos químicos con actividad biológica. Además, fueron altamente expresados ciertos genes que codifican para proteínas relacionadas con la quimiotaxis, formación de biopelículas y fijación biológica de nitrógeno en el sub-conjunto de genes de *A. brasilense*. De la misma manera, pero en otros reportes Drogue et al., (2014a) estudiaron el perfil transcriptómico (microarrays) de raíces de las plantas de dos cultivares de arroz, Cigalon y Nipponbare, inoculadas con *A. lipoferum* 4B (aislado de Cigalon) o *Azospirillum* sp. B510 (aislado de Nipponbare) y éstas se compararon con el perfil transcriptómico de un control no inoculado. Los autores, obtuvieron un total de 7384 genes que fueron regulados de manera positiva, lo que representó cerca del 16% del total de genes del genoma de arroz. Los resultados sugirieron una respuesta vegetal dependiente de la cepa bacteriana y de la variedad del arroz empleado, con un 83% de los genes expresados diferencialmente de acuerdo a una combinación específica. Independientemente de la combinación, la mayoría de los genes expresados, se encontraba involucrado al metabolismo primario, transporte y regulación de la transcripción. Al considerar los genes implicados en la respuesta al estrés y la defensa de la planta, los resultados parecieron indicar que la cepa B510, que presenta propiedades endófitas, conduce a la represión de un conjunto más amplio de genes que la cepa 4B que no es endofítica.

Adicionalmente, en otra publicación del mismo autor (Drogue et al., 2014b) se determinó que la adaptación de la cepa 4B al cultivo de arroz pareciera accionar genes relacionados con las especies reactivas de oxígeno (ROS) y transportadores múltiples de membrana bacteriana, además de ciertos reordenamientos en el genoma bacteriano.

A pesar de la inmensa cantidad de información disponible sobre el género *Azospirillum* y particularmente sobre la respuesta de la bacteria a diferentes condiciones ambientales, incluso en interacción con plantas inoculadas, se podría decir que a la fecha, se desconocen las bases moleculares que gobiernan la respuesta de la bacteria en presencia de luz, para lo que en este capítulo se presentarán resultados obtenidos del análisis transcriptómico de este microorganismo expuesto a diferentes condiciones de luz los cuales permitirán avanzar en la construcción de un modelo biológico mas detallado sobre el estilo de vida de ésta bacteria.

V.1.1.4.1. Mecanismos de promoción del crecimiento y expresión génica.

La rizosfera constituye la fracción del suelo caracterizada por la presencia de interacciones sostenibles entre plantas y bacterias, que en algunos casos resultan esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las plantas exudan hasta un 11% del carbono fijado por la fotosíntesis a través de sus raíces, aportando así este elemento a las poblaciones microbianas de la rizósfera (Bais et al., 2006) y a cambio, las rizobacterias proporcionan nutrientes esenciales o mejoran el crecimiento mediante la expresión de diferentes mecanismos de promoción, tales como la fijación biológica de nitrógeno o la secreción de ciertas fitohormonas (Richardson et al., 2009) como procesos mas destacados. Como ya sabemos, dentro del grupo de las PGPR, se encuentran los miembros del género *Azospirillum* que colonizan las raíces de importantes cereales y otras gramíneas de interés (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Varias cepas pertenecientes a éste género son capaces de ejercer efectos de fitoestimulación del crecimiento vegetal y así aumentar su capacidad de desarrollo o incluso el rendimiento de ciertos cultivos, lo que las convierte en una alternativa biotecnológica para reducir el uso de compuestos de origen químico en el contexto de una agricultura sostenible (Bashan et al., 2004). El efecto promotor del crecimiento de bacterias del género *Azospirillum* sobre plantas inoculadas inicialmente se atribuyó a la capacidad de la bacteria para fijar nitrógeno atmosférico, pero la contribución éste proceso bacteriano en

agricultura parece haber sido menos significativa de lo inicialmente considerado para ésta bacteria (Bashan y de-Bashan, 2010) por lo que en la actualidad, se considera que el efecto de promoción del crecimiento se debería además de la FBN, a la producción de ciertas fitohormonas, pero principalmente AIA, que determinaría un incremento en el número de raíces laterales y pelos radiculares luego de la inoculación, lo que resultaría en una mayor absorción de nutrientes y agua por parte de la planta (Somers et al., 2005). Además de incrementar el número de raíces laterales y de pelos radiculares, *Azospirillum* también mejora la exudación de las raíces (Heulin et al., 1987) y modifica la estructura química de la pared celular de las raíces (El Zemrany et al., 2007). La información que existe acerca del efecto por parte de las bacterias de la rizosfera sobre el comportamiento de diversas gramíneas como caña de azúcar (Boddey et al., 1995), maíz (Seldin et al., 1998), trigo, sorgo (Baldani et al., 1987), cebada y pastos tropicales (Döbereiner et al., 1995) es muy amplia y diversa; sin embargo, con el advenimiento de diversas técnicas moleculares, como ARN la secuenciación masiva de ARN ha permitido dilucidar algunos mecanismos biológicos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal de algunos microorganismos asociados con las plantas. Trabajos recientes han proporcionado información importante para comprender cómo las señales químicas producidas o recibidas por las bacterias pueden desencadenar tales respuestas de promoción del crecimiento en sus huéspedes, tanto por el estudio de la expresión de los genes asociados a tales mecanismos de forma individual a nivel de la expresión del genoma en una condición experimental definida o por la expresión dual en la interacción bacteria-planta (Tadra-Sfeir et al., 2015, Pankievicz et al., 2016, Camilios-Neto et al., 2014, Sheibani-Tezerji et al., 2015).

A modo de resumen, la expresión de ciertos genes relacionados con la promoción del crecimiento vegetal o el estilo de vida rizosférico de *A. brasilense* Az39 como consecuencia de la exposición de la bacteria a la luz, podrían contribuir significativamente para comprender el modelo de promoción del crecimiento vegetal. A partir del análisis realizado en el Capítulo II de esta Tesis doctoral, se sabe que Az39 presenta en su genoma genes que codifican para proteínas del tipo fitocromo, para los que no existe una función biológica asociada hasta el momento. Por otro lado, del trabajo de Rivera et al., (2014) disponemos de la información que en el genoma de Az39, además contiene numerosas secuencias relacionadas con mecanismos

de promoción del crecimiento vegetal, que a la fecha no han sido analizados en el contexto de la respuesta de la bacteria al medioambiente. Es por ello que el objetivo primario de este capítulo fue el de realizar un análisis transcriptómico y comprender como la exposición de la bacteria a diferentes fuentes lumínicas puede modificar su expresión genica en condiciones experimentales definidas, previamente establecidas en los Capítulos III y IV.

En este capítulo se abordará el segundo objetivo específico de la Tesis relacionado con la secuenciación del transcriptoma *A. brasilense* Az39 y el análisis de la expresión de genes en diferentes condiciones de crecimiento relacionadas con la luz.

V.2. Materiales y Métodos

V.2.1. Preparación de la muestra

Cultivos puros de *A. brasilense* Az39 se obtuvieron en medio rico LB a una temperatura de 36 °C y 180 rpm en recipientes de 500 ml de capacidad conteniendo 300 ml de medio de cultivo. Una vez alcanzada una DO₅₉₅: aproximadamente 0.8, correspondiente a una fase exponencial de crecimiento, los cultivos fueron fraccionados en placas de petri estériles (25 ml cada una). Para el experimento, se generó 6 replicas biológicas por cada tratamiento y cada una de ella tuvo 2 réplicas técnicas. Transcurridas 4 h de exposición a luz blanca (75 W), azul (PAR38), roja (PAR38) y el control mantenido en condiciones de oscuridad, se detuvo el experimento para llevar a cabo la extracción del ARN total.

V.2.1.1. Extracción de ARN Total por el método Trizol®

Cada tratamiento y cada réplica, se colocó en tubos cónicos estériles y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y se transfirió el contenido en un tubo de 1,5 ml de capacidad. Las células se resuspendieron en 300 µl de buffer Tris/EDTA/SDS helado. Luego se adicionó 1 ml del reactivo Trizol (Invitrogen ®) y se mezcló vigorosamente. La mezcla se calentó a 65°C durante 10 min. Se agregó bolitas de zirconia y se centrifugó por 10 min a 13000 rpm, para romper las células. Se incubó los tubos a temperatura ambiente durante 2-3 min. Luego se transfirió 600 µl de la fase acuosa (que contiene el ARN), a un nuevo tubo. En este nuevo recipiente, el ARN se precipitó con 500 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó durante 10 min a 13000 rpm y luego se

removió el pellet donde se encontraba el ARN. Se lavó el pellet con etanol al 75% y se mezcló sin vórtex. Luego se centrifugó por 5 min a 13000 rpm y se descartó el sobrenadante. Se secó el pellet y se resuspendió en 50 µl de agua ultrapura libre de ARNsas. Finalmente, el ARN fue purificado y visualizó en un gel de agarosa al 1% (p/v). Fueron realizadas extracciones de réplicas biológicas.

V.2.1.2. Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN

El ARN total extraído fue cuantificado por espectrofotometría a 260nm utilizando un espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (ThermoScientific). Adicionalmente, para validar la integridad del ARN total extraído, todas las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), coloreadas con una solución de bromuro de etidio al 1% (p/v) y visualizadas con luz ultravioleta en un transiluminador UV.

V.2.1.3. Tratamiento con DNasa

Para inactivar posibles ADNsas presentes en el ARN extraído, se adicionó un tampón Dnase Buffer y 2 µl de Dnase I (2U/µL) a las muestras obtenidas. La mezcla se incubó en estufa a 37 °C por 30 min. La reacción se interrumpió con la adición de 20 % del volumen de la muestra con la solución inactivante (DNase Inactivation Reagent®) y se mantuvo a temperatura ambiente durante 2 min, tiempo en el que se homogeneizó vigorosamente en dos ocasiones durante este período. Después de la incubación, la mezcla se centrifugó a 13.400 rpm durante 60 seg para precipitar la solución inactivante. El sobrenadante conteniendo el ARN se transfirió a un tubo del tipo eppendorf de 1.5 ml de capacidad. De la misma manera, un gel de agarosa al 1% (p/v), libre de ARNsas, fue realizado para analizar la muestra.

V.2.1.4. Depleción de rRna

Del ARN total disuelto en 15 µl de agua (conteniendo de 4–10 µg de ARN) fue depletado el ARN ribosomal utilizando el kit MICROBExpress™ (Ambion) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

V.2.1.5. Construcción y secuenciamiento de las bibliotecas de cDNA

Para la construcción de las bibliotecas destinadas al secuenciamiento, 500 ng de ARN (depletado de rRNA, en un máximo de 8 μ l) fue utilizado para el kit SOLiD™ (Whole Transcriptome Analysis Kit), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Los fragmentos fueron secuenciados en el equipo SOLiD 4 (Life Technology).

V.2.1.6. Análisis del Transcriptoma

Las secuencias obtenidas fueron inicialmente comparadas y mapeadas utilizando el software CLC Genomics Workbench 5.1 y los resultados fueron expresados en RPKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) (Mortazavi et al., 2008). Un gen fue considerado expreso cuando la cobertura de los reads era igual o superior a 3 veces, y diferencialmente expresados cuando el valor de RPKM era de 2 veces mayor/menor.

V.3. Resultados

V.3.1. Análisis de la secuenciación masiva de ARN

V.3.1.1. Análisis de la expresión global de genes.

En este ensayo se analizaron los transcriptomas de Az39 cultivada en medio de cultivo LB y expuesta a luz blanca (75 W), azul (PAR38) y roja (PAR38). Para simplificar el análisis, se tuvieron en cuenta los RPKM (del inglés, Reads per Kilobase of exon model per Million mapped reads) de un grupo de genes representativos del metabolismo basal microbiano, así como de otros relacionados con su capacidad de interaccionar con las plantas. Para ello, se realizó un análisis de clusters con los genes que fueron reprimidos e inducidos (Fold change $\geq \pm 1$) y de acuerdo a esto, de los 6410 genes analizados globalmente, 3407, 3403 y 3373 fueron reprimidos en luz roja, blanca y azul, respectivamente (aproximadamente el 50%), mientras que la porción restante de genes bajo cada condición resultaron inducidos o sobre-expresados.

Tabla 6. Análisis global de los genes diferencialmente expresados (inducidos y reprimidos) en *A. brasilense* Az39 en presencia de luz roja (PAR38), azul (PAR38) y blanca (75 W).

Transcriptoma	Siglas del Tratamiento	Genes diferencialmente expresados (Fold change $\geq \pm 1$)	
		Genes inducidos	Genes reprimidos
Luz Roja vs. Oscuridad	LR	46%	41%
Luz Azul vs. Oscuridad	LA	47%	43%
Luz Blanca vs. Oscuridad	LB	48%	42%

Tal como se observa en la Tabla 6, de los 6410 genes expresados, alrededor del 50% de los genes resultaron reprimidos o inducidos bajo cada condición de cultivo con un Fold change $\geq \pm 1$. En aquellos cultivos expuestos a luz blanca se observó el mayor porcentaje de genes inducidos, con respecto a lo que se observó en luz azul y roja con un porcentaje de alrededor del 48% del total de genes.

En un segundo análisis, se observó aquellos genes que fueron expresados en cada longitud de onda con un $p < 0,05$. En la Tabla 7 se observa la cantidad porcentual de genes inducidos o reprimidos en luz roja, azul y blanca con un $p < 0,05$.

Tabla 7. Análisis global de los genes expresados diferencialmente (inducidos y reprimidos) en *A. brasilense* Az39 en presencia de luz roja (PAR38), azul (PAR38) y blanca (75w).

Transcriptoma	Siglas del Tratamiento	Genes diferencialmente expresados ($p < 0,05$)	
		Genes inducidos	Genes reprimidos
Luz Roja vs. Oscuridad	LR	56,60%	43,40%
Luz Azul vs. Oscuridad	LA	64,70%	35,29%
Luz Blanca vs. Oscuridad	LB	45,73%	55,03%

Como se observa en la Tabla 7, se realizó una filtración de datos teniendo como parámetro de referencia el valor $p < 0,05$. En luz roja, de los 6410 genes totales, 146 genes se expresaron significativamente, de los que un 56,6% se indujo y un 43,4% se reprimió. De la misma manera, en luz azul 42 genes se expresaron con un valor $p < 0,05$, de los cuales un 35,29% se indujo y un 64,7% se reprimió. Por último, en luz blanca de 99 genes expresados diferencialmente, 45,73% se sobre-expresaron y 55,03% se reprimieron.

Para esquematizar la distribución de genes expresados con un $p < 0,05$ en luz roja, luz azul y luz blanca, se realizó un Diagrama de Venn, el cual se muestra a continuación.

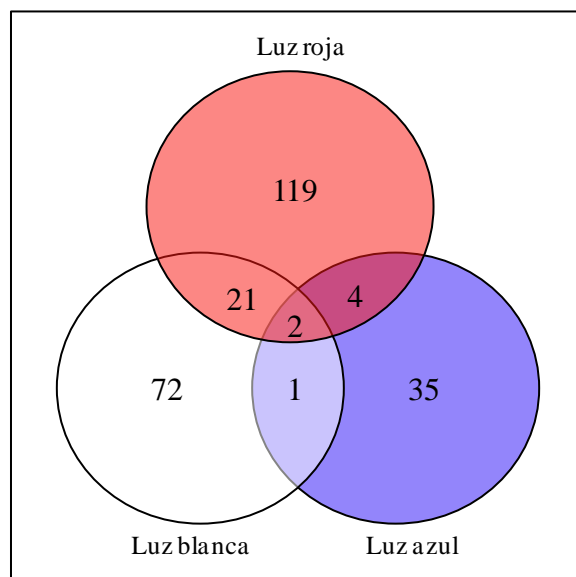


Figura 44. Diagrama de Venn representando genes expresados diferencialmente con un $p < 0,05$ en luz roja, azul y blanca. El número ubicado en los extremos de los círculos representa los genes únicos expresados en cada longitud de onda. Imagen generada con el software <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

Como se ilustra en la Figura 43, y como se describió en la Tabla 7, el número de genes que se expresaron con un valor $p < 0,05$, fueron 146 en luz roja, 42 en luz azul y 99 en luz blanca. Un total de dos (2) genes, fueron expresados en común bajo cada fuente luminosa y ellos fueron aquellos asociados a la secuencia de una tioredoxina (ABAZ39_RS15755) y una (1) proteína hipotética (ABAZ39_RS19825). Por otro lado, un (1) único gen se expresó en condiciones de exposición a luz azul y blanca y correspondió a una (1) proteína fijadora de nitrógeno FixG (ABAZ39_RS03975). En condiciones de exposición a luz azul y roja, se expresaron cuatro (4) genes en común, uno de ellos codificante para un regulador transcripcional de la familia AsnC (ABAZ39_RS26430), 4-carboxymuconolactona decarboxilasa (ABAZ39_RS19845), y dos (2) Proteínas hipotéticas (ABAZ39_RS21990, ABAZ39_RS04950). En luz blanca y roja, el número de genes expresados en común fue de 21, entre ellos, el gen que codifica para tioredoxina peroxidasa (ABAZ39_RS15725), glicerol-3-fosfato dehidrogenasa subunidad C (ABAZ39_RS31925), y proteínas hipotéticas (ABAZ39_RS24450, ABAZ39_RS05010, ABAZ39_RS33055, ABAZ39_RS18720, ABAZ39_RS14895, entre otras). De manera particular en luz blanca, 75 fueron los genes expresados diferencialmente, entre ellos, ciertos

genes que codifican para proteínas tales como aldehído-activación proteína (ABAZ39_RS24970), transposasa (ABAZ39_RS12030), proteína de membrana (ABAZ39_RS30055, ABAZ39_RS08545, ABAZ39_RS21245, ABAZ39_RS04800, ABAZ39_RS08795), fosfoadenosina fosfosulfato reductasa (ABAZ39_RS05905), ARN polimerasa (ABAZ39_RS26380), C4-dicarboxilato transportador ABC de unión a proteína (ABAZ39_RS31195), ornitina aminotransferasa (ABAZ39_RS15640), lipasa (ABAZ39_RS2596), citocrome O ubiquinol oxidasa (ABAZ39_RS23050), proteína del sistema de secreción VI EvpB (ABAZ39_RS21320), NAD sintetasa (ABAZ39_RS20275), gluconolacnasa (ABAZ39_RS30945), proteína de biosíntesis cobalamina CobW (ABAZ39_RS19440), chaperona DnaJ (ABAZ39_RS17480), formato dehidrogenasa (ABAZ39_RS10115), proteína de biosíntesis flagelar FliS (ABAZ39_RS10690), Regulador transcripcional de la familia Fur (ABAZ39_RS20595), proteína del catabolismo de la acetoina (ABAZ39_RS10445), proteína división celular (ABAZ39_RS29890), transportador ABC ATPasa (ABAZ39_RS25040), proteína de sistema secreción tipo VI (ABAZ39_RS21315), Dominio PAS con sensor histidin quinasa (ABAZ39_RS02980), Transportador ABC metionina (ABAZ39_RS30420). Por otro lado en luz roja, genes que codifican para proteínas tales como, regulador transcripcional de familia LysR (ABAZ39_RS17525), UDP pirofosfato sintasa (ABAZ39_RS08040), ATPasa AAA (ABAZ39_RS29035), transportador ABC (ABAZ39_RS27170, ABAZ39_RS20770, ABAZ39_RS25590), Regulador transcripcional de familia LacI (ABAZ39_RS29515), Regulador transcripcional (ABAZ39_RS10990, ABAZ39_RS31045), histidina kinasa (ABAZ39_RS27665), esterasa (ABAZ39_RS25165), DSBA oxidoreductasa (ABAZ39_RS15720), regulador (ABAZ39_RS15050, ABAZ39_RS07780), zinc ABC transportador (ABAZ39_RS13960), familia acetiltransferasa GCN5 (ABAZ39_RS05080), transposasa (ABAZ39_RS27890, ABAZ39_RS26855, ABAZ39_RS16055), ABC triosefosfato isomerasa (ABAZ39_RS07885), glutation S-transferasa (ABAZ39_RS19400), proteína de unión al ADN (ABAZ39_RS07860), agmatinasa (ABAZ39_RS25050), formil-CoA transferasa (ABAZ39_RS07440), N-acetilglucosamina-6-fosfato deacetilasa (ABAZ39_RS03410), proteína de cuerpo flagelar FlgG (ABAZ39_RS29945), acilamida amidohidrolasa, (ABAZ39_RS14605), formato dehidrogenasa (ABAZ39_RS21140), glicosiltransferasa (ABAZ39_RS25835). Las demás se correspondían a proteínas hipotéticas. Por último en luz azul, solo se expresaron

diferencialmente, 35 genes, los cuales codifican para proteínas del tipo DNA glicosilasa (ABAZ39_RS15555), GCN5 familia acetiltransferasa (ABAZ39_RS07485), ABC transportador permeasa de azúcar (ABAZ39_RS23875), acetaldehído dehidrogenasa (ABAZ39_RS11055), ABC transportador (ABAZ39_RS23885), glicerol quinasa (ABAZ39_RS23890), GntR familia transcripcional regulador (ABAZ39_RS20775), los demás codifican para proteína hipotéticas.

Los datos presentados en las Tablas 6 y 7, hacen referencia a aquellos genes que presentaron un nivel de expresión con un fold-change $\geq \pm 1$ y un valor $p < 0,05$; sin embargo, en algunos casos y para algunos genes específicos, el criterio de evaluación se focalizó solo en el fold-change $\geq \pm 1$ y se flexibilizó el análisis con el objetivo de incluir ciertos genes de interés biológico para esta Tesis doctoral. En la Figura 45 se muestran los diagramas de Venn para los genes inducidos y reprimidos en condiciones de exposición a luz roja, luz azul y luz blanca, de acuerdo al criterio antes mencionado (fold-change $\geq \pm 1$)

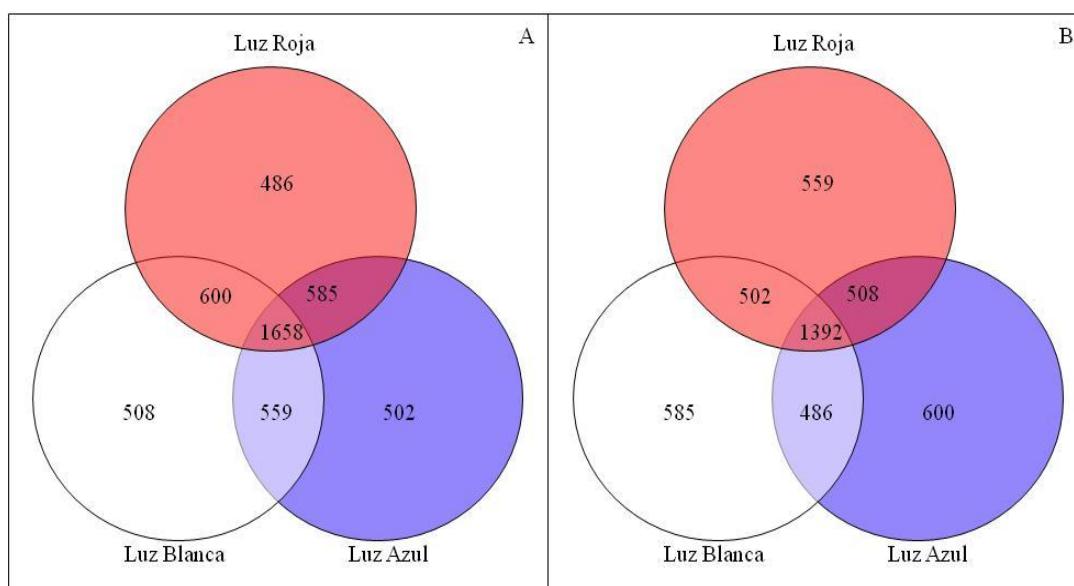


Figura 45. Diagrama de Venn representando genes reprimidos (A) y genes inducidos (B) de *A. brasilense* en condiciones de exposición a luz roja, azul y blanca con un fold-change $\geq \pm 1$. Imagen generada con el software <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>.

En la Figura 45 se observa que un total de 1658 genes fueron sub-expresados por exposición a cualquier tipo de luz; mientras que 1392 genes se indujeron en cada una de las tres fuentes

lumínicas. En la Figura 45 A, se observa que un total de 1658 genes fueron reprimidos cuando se cultivó el microorganismo en condiciones de luz roja, azul o blanca. Dentro de estos, se destacan el gen *luxO* (ABAZ39_RS00195), el cual codifica para un regulador transcripcional del sistema de dos componentes y el *cheW* (ABAZ39_RS33235), cuyo producto participa en la transmisión de señales sensoriales de los quimiorreceptores a los motores flagelares, vinculando físicamente a CheA con los MCP (proteínas de quimiotaxis que aceptan metilo). En los extremos se observan aquellos genes que solo resultaron reprimidos bajo una única condición experimental. En luz azul se reprimieron un total de 502 genes, entre ellos, genes que codifican para una bacteriofitocromo Hemo-Oxigenasa (ABAZ39_RS15410) y genes involucrados en la flagelación, tal como *fliM* (ABAZ39_RS03835). En luz roja, se reprimieron 486 genes, entre ellos, el gen que codifica para una hidrolasa, tal como la nitrilasa (ABAZ39_RS03835) y *fliN* (ABAZ39_RS22030), gen que codifica para una de las proteínas que junto a FliM y FliG, conforman el motor responsable del cambio de sentido flagelar. En luz blanca 508 genes resultaron reprimidos y dentro de ellos el de un bacteriofitocromo PhyAz39-2 (ABAZ39_RS30595) y de una metiltransferasa *cheR* (ABAZ39_RS12215). En luz azul y roja por un lado y luz blanca y azul por otro se reprimieron genes relacionados con la movilidad y quórum sensing, tales como *luxR* (ABAZ39_RS30210), *fliG* (ABAZ39_RS01860). Dentro de los genes que resultaron inducidos por exposición a luz roja, azul o blanca (Figura 45 B), se destaca uno (1) de los bacteriofitocromos PhyAz39-1 (ABAZ39_RS30095), una (1) deshidrogenasa (ABAZ39_RS31970), como así también genes que participan del proceso de quórum quenching, como una (1) acil homoserín lactona acilasa (ABAZ39_RS22140) y en movilidad, como una (1) proteína codificada por *cheD* (ABAZ39_RS12220). En los extremos se observan los genes que fueron inducidos por una única longitud de onda y en el caso de la luz azul, dentro de los 600 genes, se detectó un (1) bacteriofitocromo PhyAz39-2 (ABAZ39_RS30595), como así también el gen *cheR* (ABAZ39_RS12215), que participa del proceso de quimiotaxis. Dentro de los 585 genes inducidos por exposición a la luz blanca, se destacó la inducción de *luxR* (ABAZ39_RS30210). En luz roja, dentro de los 559 genes que resultaron sobre-expresados, se encontró a *fliG* (ABAZ39_RS01860) y *cheY* (ABAZ39_RS02410). Un total de 486 genes se sobre-expresaron en condiciones de luz azul y blanca, dentro de los que se destacó, el gen para una (1) nitrilasa (ABAZ39_RS28630) y *fliN* (ABAZ39_RS22030). Por último, 502 genes se

indujeron por exposición a luz roja y blanca yentre ellos, uno que codifica para una bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (BphO) (ABAZ39_RS15410).

Una segunda estrategia de análisis consistió en agrupar genes relacionados entre sí, de acuerdo a determinados procesos metabólicos y asociarlos con la exposición a diferentes tipos de fuentes lumínicas. Así, inicialmente se analizó un grupo de genes involucrados en los procesos de regulación transcripcional, división celular y de protección celular para determinar si existió una correlación positiva entre el comportamiento de estos genes y la exposición a luz azul, luz roja y blanca. En la Figura 46 se observan los genes relacionados con el proceso de división celular y replicación cromosomal, entre otros analizados.

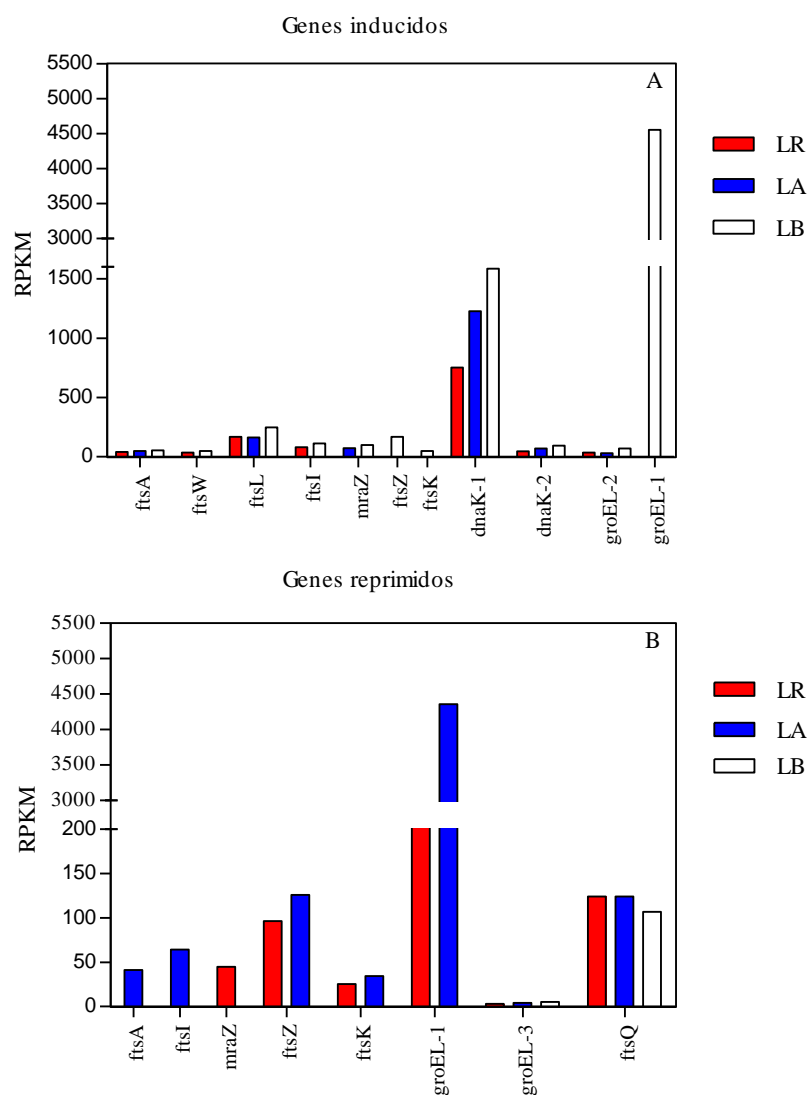


Figura 46. Genes asociados al proceso de división celular, replicación cromosomal y defensa celular de Az39 que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB). Los genes fueron categorizados en clusters funcionales, de acuerdo a su función específica en el metabolismo de *A. brasilense* Az39.

En la Figura 46 se observan los genes relacionados con el proceso de división celular y replicación cromosomal, entre otros analizados. Los genes *ftsA* (ABAZ39_RS02725) y *ftsL* (ABAZ39_RS02785), se indujeron en luz azul, roja y blanca, aunque en luz blanca, el porcentaje de sobre-expresión fue superior al control en un 24,6%. Cuando Az39 creció expuesta a luz roja y blanca, se indujeron los genes *ftsW* (ABAZ39_RS02760) y *ftsI* (ABAZ39_RS02780) en un 8% y 23% respectivamente en luz blanca comparado al tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad.

Por otro lado, el gen *mraZ* (ABAZ39_RS02795) se indujo en luz azul y blanca, aunque solo en luz blanca la sobre-expresión fue un 30% superior al control. Por último, únicamente los genes *ftsZ* (ABAZ39_RS02720) y *ftsK* (ABAZ39_RS13265) se indujeron en luz blanca. El gen *ftsK* fue un 12% superior al control. Los genes *dnaK-1* (ABAZ39_RS33715) y *dnaK-2* resultaron inducidos en las tres fuentes luminosas, aunque en luz blanca, mostró valores de sobre-expresión superior al control en un 20% y 30% respectivamente. Así mismo el gen *groEL-2* (ABAZ39_RS33910), se indujo en las tres luces, solo que en luz blanca los valores de expresión fue superior al control en un 45%. Además el gen *groEL-1* (ABAZ39_RS33905) se indujo en luz blanca. En la Figura 46 B, se observan los genes que resultaron reprimidos en las diferentes fuentes luminosas. Aquí se muestra, que la mayoría de los genes que participan en el proceso de división celular, o en la expresión de reguladores transcripcionales, en luz roja y azul, el comportamiento fue similar, tal es el caso de *ftsZ* (ABAZ39_RS02720), *ftsK* (ABAZ39_RS13265) y *groEL-1* (ABAZ39_RS33905). En luz blanca, se pudo identificar dos genes reprimidos, que también se vieron en luz roja y azul, el gen *ftsQ* (ABAZ39_RS02730) y *groEL-2* (ABAZ39_RS33910).

A continuación se detallan los clusters de genes de Az39 de acuerdo a su rol o participación en determinadas vías o procesos biológicos que resultaron inducidos o reprimidos dependiendo de exposición a luz roja (PAR38), azul (PAR38) o blanca (75 w).

La Figura 47 muestra la inducción y represión de genes que codifican para proteínas del tipo fitocromo PhyAz39-1 (ABAZ39_RS30595), PhyAz39-2 (ABAZ39_RS30095) y para la bacteriofitocromo hemo-oxigenasa BphO-Az39 (ABAZ39_RS15410)

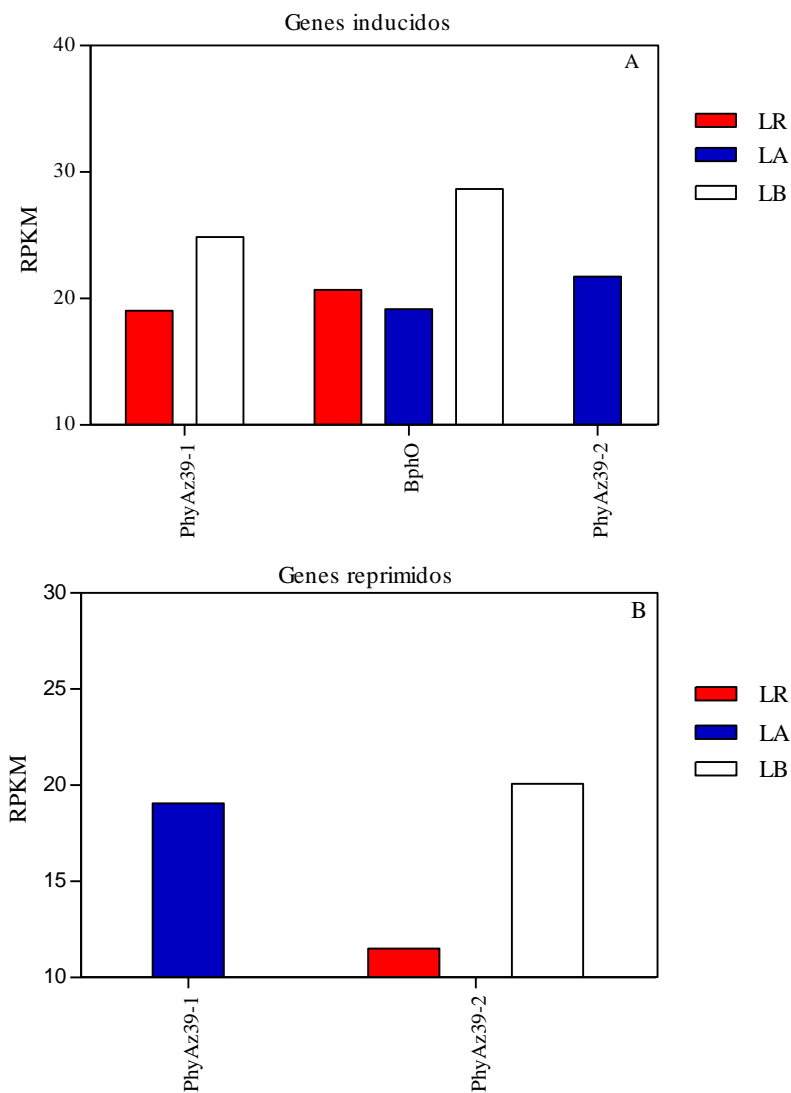
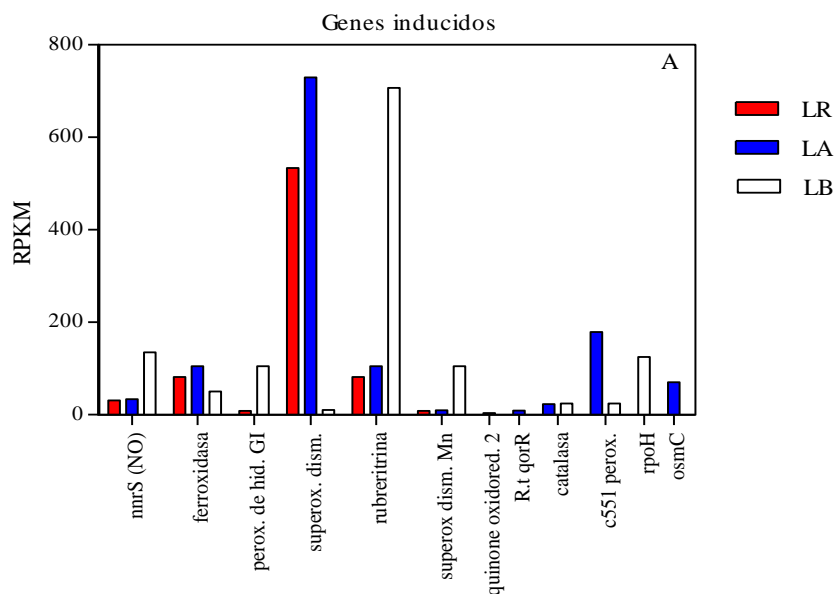


Figura 47. Análisis basado en los valores de RPKM de genes que codifican para proteínas relacionadas con la captación de luz en Az39 que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).

Como se observa en la Figura 47 A, la inducción de la expresión de PhyAz39-1 (ABAZ39_RS30595) fue superior en condiciones de oscuridad con respecto a los valores expresados en luz roja en aproximadamente un 20%, mientras que en luz blanca, la inducción

de este gen comparado con el tratamiento control fue superior en un 15%. Por otro lado BphO-Az39 (ABAZ39_RS15410), en luz roja y azul mostró un comportamiento similar cuya inducción fue menor que en el control en un 20% y 6% respectivamente, mientras que en condiciones de exposición a luz blanca la inducción de BphO fue superior a lo que se observó en oscuridad en un 18%. Finalmente, PhyAz39-2 (ABAZ39_RS30095), solo resultó inducido en luz azul, comportamiento similar al observado en oscuridad. Con respecto a los genes reprimidos o sub-expresados (Figura 47 B) el gen que codifica para el segundo fitocromo de Az39 ubicado en el plásmido 4, PhyAz39-2, resultó drásticamente reprimido en condiciones de exposición a luz roja y en menor medida a la luz blanca, comportamiento que comparado con el tratamiento control resultó en valores de expresión inferiores en un 50% y 2% respectivamente. Como se observa en la Figura 47 B, PhyAz39-1, resultó reprimido en luz azul, siendo un 30% inferior a los valores que se expresaron en el control.

Por otro lado, ciertos Bacteriofitocromos (Bacteriofitocromo hemo-oxigenasa y fitocromo sensor histidina kinasa de dos componentes) participan en la respuesta a estrés en diversos microorganismos, por ello a continuación se muestran los principales genes que participan en respuesta a estrés, ya sea oxidativo, al frío o al calor.



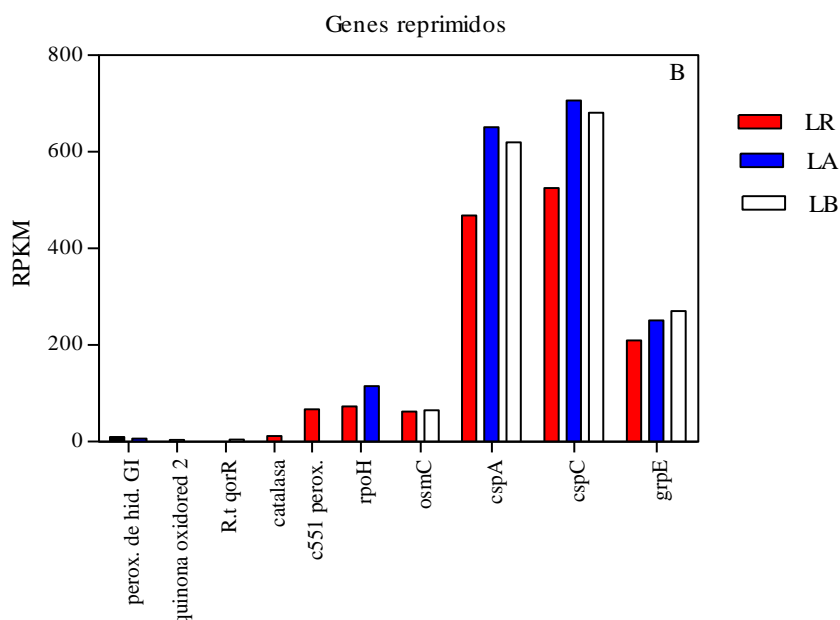
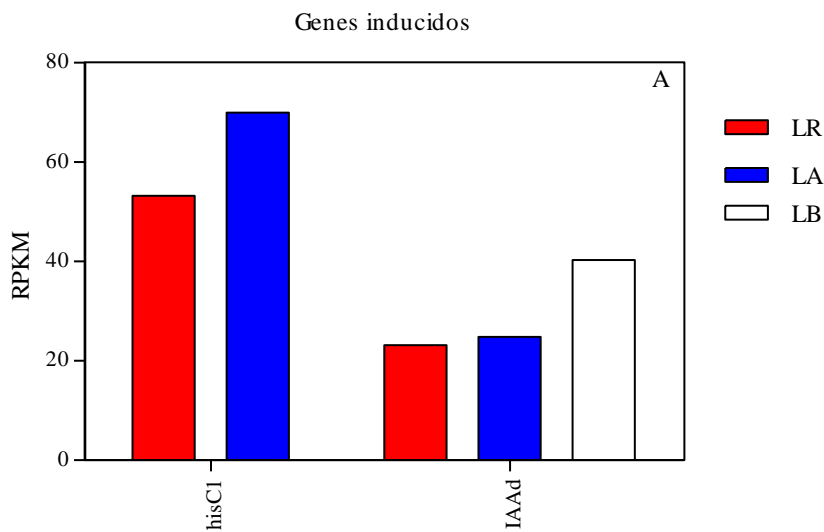


Figura 48. Análisis basado en los valores de RPKM de genes implicados en respuesta a estrés de Az39 que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).

En la Figura 48 A, se observan diversos genes que participan de la respuesta microbiana a condiciones desfavorables. Genes tales como *nnrS* (ABAZ39_RS08570), que codifica para una enzima del tipo Ferroxidasa (ABAZ39_RS11180), o genes responsables de la síntesis de una Rubreritrina (ABAZ39_RS11180), una Manganese superóxido dismutasa (ABAZ39_RS30225) y una superóxido dismutasa (ABAZ39_RS16410), se indujeron por exposición a luz roja, azul y blanca. En particular, el gen *nnrS* se indujo en un 30%, 43% y 6% respectivamente con respecto al tratamiento control por exposición a luz roja, azul y blanca. La ferroxidasa se indujo, pero con valores de expresión inferiores a los alcanzados en oscuridad, en un 29%, 8% y 50% respectivamente. La sobre-expresión de la superóxido dismutasa en luz azul y roja, fue superior a los valores producidos en luz blanca en un 90% aproximadamente. Los genes *qorQ* (ABAZ39_RS13055) y citocromo *c551* (ABAZ39_RS31045) se indujeron en luz azul en un 64% y 30% respectivamente con respecto al tratamiento control. Adicionalmente, se observó la inducción del gen *rpoH* (ABAZ39_RS06690) en luz blanca, sin embargo esta inducción mostró valores de expresión inferiores al control en aprox. un 12%. También se indujo el gen *osmC* (ABAZ39_RS20345). La Figura 48 B, muestra los genes que resultaron reprimidos en las mismas condiciones

experimentales. En cultivos expuestos a luz roja, se indujo en gen que codifica para el citocromo *c551* (ABAZ39_RS13055), el que mostró valores de expresión menores al control en un 50%. Otros genes relacionados al shock por frío o calor, resultaron sub-expresados en cada longitud de onda, es decir, en luz roja, azul y blanca. Así, el gen *cspA* (ABAZ39_RS01665) se reprimió en un 50%, 35% y 40% respectivamente en relación al control. Lo mismo para el gen *cspC*, el cual se expresó 45%, 25% y 28% respectivamente por debajo de los valores observados en el control. Comportamiento similar se observó para el gen *grpE* (ABAZ39_RS13350). Por último, cabe destacar que el gen *rpoH* (ABAZ39_RS06690), se reprimió en luz roja y azul en un 50% y 20% aproximadamente con respecto al control. Por último se reprimió el gen *osmC* (ABAZ39_RS20345) en luz blanca y roja.

De acuerdo a resultados previos presentados en el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral, relacionados con el proceso de biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA), se realizó el análisis transcriptómico de los principales genes involucrados en este proceso biológico. A continuación se presentan los genes Inducidos y reprimidos en luz roja (PAR38), luz azul (PAR38) y luz blanca (75 W).



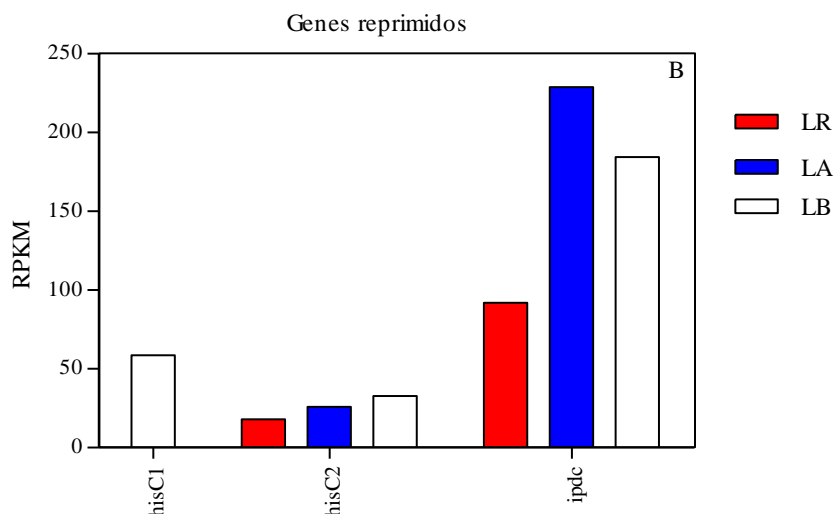
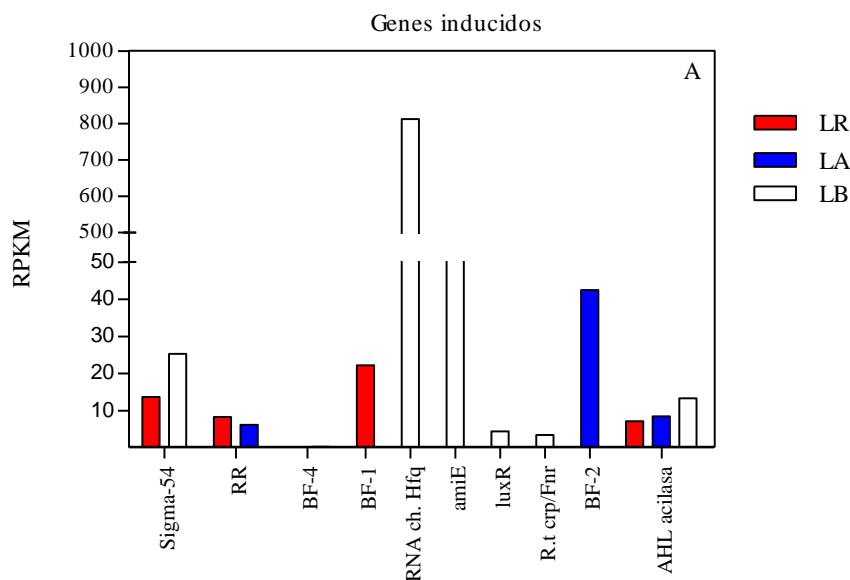


Figura 49. Análisis basado en los valores de RPKM de genes implicados en la biosíntesis de ácido indol-3-acético (AIA) que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) en condiciones de oscuridad (O), luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).

Como se puede observar en la Figura 49 A, se llevó a cabo el análisis de ciertos genes involucrados en el proceso de biosíntesis de AIA a través de cuatro posibles vías de síntesis en Az39. Como se puede observar en la Figura 48 A, el gen *iiaIdD*, que codifica para la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa (ABAZ39_RS31970), enzima encargada de oxidar el ácido indol-3-acetaldehído a ácido indol-3-acético, se indujo en condiciones de exposición a luz roja, azul y blanca, cuyos valores fueron superiores a los expresados en oscuridad en un 15%, 20% y 50% respectivamente. Genes que participan en la vía de síntesis del AIA, la ruta del indol-3-acetamida, tal como la *iaaH*, una hidrolasa (ABAZ39_RS16050) y el gen encargado de convertir el indol-3-acetonitrilo a ácido indol-3-acético, *ipfo* (ABAZ39_RS08985), se indujeron en luz azul, aunque con valores por debajo de los que alcanzó en condiciones de oscuridad en alrededor un 5% y un 10% respectivamente. Por último una de las aminotransferasa *hisC1* (ABAZ39_RS18735), la cual participa en la vía indol-3-piruvato (IPA), resultó inducida en luz roja y azul, sin embargo esta sobre-expresión fue por debajo de lo que se observó en el control, en un 26% y 10% respectivamente. En la Figura 49 B se observan los genes que fueron reprimidos, entre los que se destacó aquellos que participan en la primeras etapas de biosíntesis del AIA, una aminotransferasa (*hisC2*) (ABAZ39_RS06445) la cual participa en el proceso de conversión del L-triptófano (L-trp) en ácido indol-3-piruvato (IPA) y el gen *ipdc*, el cual codifica para la enzima indol 3-piruvato desacarboxilasa

(ABAZ39_RS11040), enzima encargada de descarboxilar el IPA a ácido indol-3-acetaldehído. La represión del gen que codifica para la aminotransferasa (ABAZ39_RS06570), fue mayor en los cultivos expuestos a luz roja y blanca en un 47% y 45% respectivamente comparado al control, mientras que la reducción de la expresión de este mismo gen en condiciones de cultivo expuesto a luz azul, fue de un 30% con respecto al control. Por otro lado, la reducción de la expresión del gen *ipdc* (ABAZ39_RS11040), mostró un patrón similar a lo que se observó para el gen de la aminotransferasa (ABAZ39_RS06570), es decir, en luz roja y blanca, la reducción del gen con respecto al control, fue aproximadamente un 68% y 37% respectivamente, mientras que la represión de este mismo gen bajo la exposición a luz azul, fue de un 22% con respecto al control. Por otro lado, con respecto a los genes involucrados en otras de vías de síntesis de AIA, tales como *iaaH* (ABAZ39_RS16050), se reprimió en luz roja y blanca al igual que el gen *ipfo* (ABAZ39_RS08985). El gen *iaaH* mostró comportarse de manera similar al control, mientras que el gen *ipfo*, en oscuridad fue la condición en la cual mostró valores de represión superior a lo que alcanzó en luz blanca y roja en un 20% y 63%, respectivamente.

A continuación se observan algunos genes relacionados con el proceso de quórum sensing y quenching que resultaron inducidos o reprimidos en cada condición experimental evaluada.



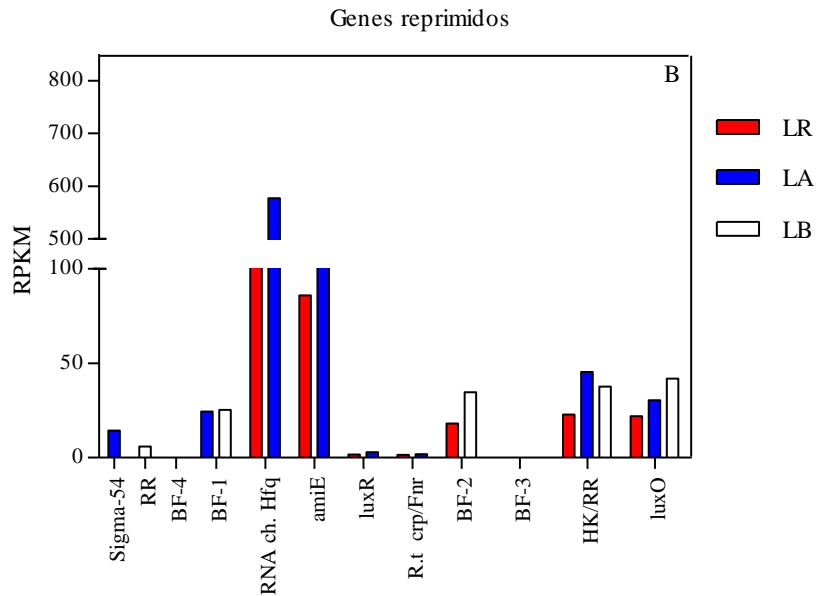
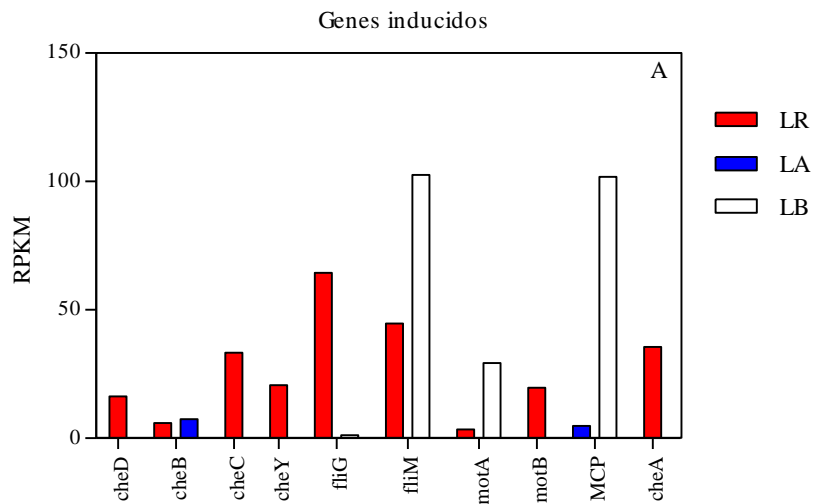


Figura 50. Análisis basado en los valores de RPKM de genes implicados en el proceso de quórum que fueron inducidos (A) y reprimidos (B) por exposición a luz roja (LR), Luz azul (LA) y Luz blanca (LB).

En la Figura 50, se observan los genes relacionados con el proceso de *quórum sensing* y *quenching* en Az39. En la Figura 50 A se muestra los genes que resultaron inducidos en luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB) respectivamente. Ciertos genes resultaron inducidos por exposición a luz blanca, *luxR* (ABAZ39_RS30210), el gen responsable de la síntesis de una acil homoserin lactona acilasa (ABAZ39_RS22140), del factor σ^{54} (ABAZ39_RS21150), o de la chaperona *hfq* (ABAZ39_RS17100), un regulador transcripcional *crp/Fnr* (ABAZ39_RS05035) y uno para la síntesis de una acilamida amidohidrolasa *amiE* (ABAZ39_RS16400). Estos genes mostraron una sobre-expresión mayor a los valores alcanzados en condiciones de oscuridad, en un 15%, 23%, 20%, 5%, 30 y 10% respectivamente. En la Figura 50 B se observan los genes reprimidos que participan en el proceso de señalización por quórum. Ciertos genes se reprimieron por exposición a luz roja, luz azul o luz blanca, tales como *luxO* (ABAZ39_RS00195) en un 50% y 30% y 5% respectivamente. De manera particular en luz azul y roja, los genes *luxR* (ABAZ39_RS30210), *hfq* (ABAZ39_RS17100), un regulador transcripcional *crp/Fnr* (ABAZ39_RS05035), y los genes responsables de la síntesis de una acilamida amido hidrolasa *AmiE* (ABAZ39_RS16400) se reprimieron. En cultivos expuestos en la luz roja, genes tales como,

luxR, acilamida amido hidrolasa *amiE* y chaperona Hfq, se reprimieron, aunque esta sub-expresión fue mayor en condiciones de oscuridad en casi un 40% mientras que en luz azul, la expresión de estos mismos genes, fue mayor, ya que mostraron valores de expresión de alrededor un 20% inferior a los valores expresados en condiciones de oscuridad. Así, la expresión del regulador transcripcional *crp/Fnr*, en condiciones de exposición a luz roja y azul resultó reprimida en un 40% y 22% respectivamente, con respecto al tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad. De manera puntual, en cultivos expuestos a luz roja, se vio reprimida un proteína del tipo bomba con subunidad 2 (ABAZ39_RS30120) en un 67% con respecto al tratamiento mantenido en condiciones de oscuridad y en cultivos expuestos a luz blanca, se observó la represión de un gen del sistema de dos componentes (ABAZ39_RS22780), en un 20% con respecto al tratamiento control. En adición a estos resultados, cabe mencionar, que bajo cada condición de cultivo, la expresión diferencial de determinados genes, tales como sensor HK/RR, o las bombas de flujo se vieron inducidos o reprimidos dependiendo de la fuente luminosa que se utilizó para exponer a la bacteria.

Los resultados presentados previamente en este Informe, indican que la movilidad de Az39 resulta alterada en presencia de luz blanca, azul y en menor medida, roja. En base a este antecedente, a continuación se muestran los principales genes involucrados en el proceso de quimiotaxis y movilidad celular, así como aquellos genes involucrados en el proceso de biosíntesis flagelar, que resultaron inducidos o reprimidos de acuerdo a las condiciones experimentales evaluadas.



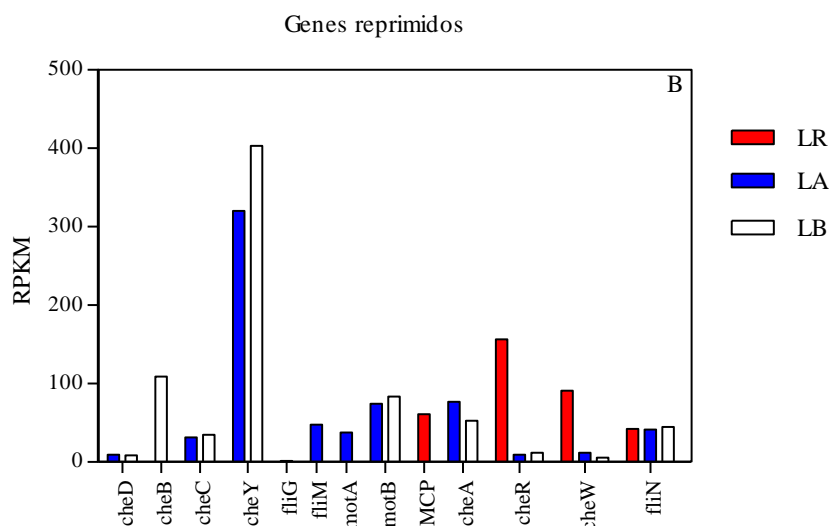
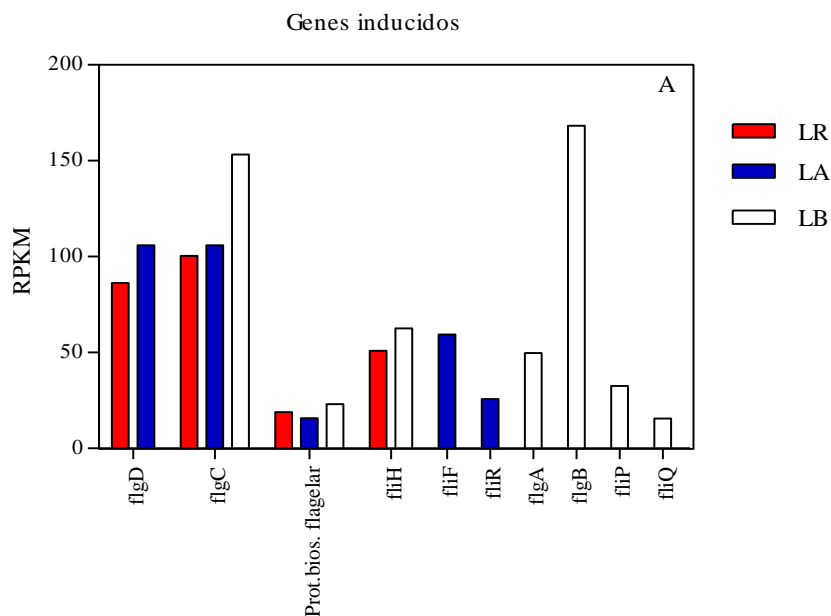


Figura 51. Análisis basado en los valores de RPKM de genes inducidos (A) y reprimidos (B) que participan en los procesos de quimiotaxis y movilidad celular, por exposición a luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB) en comparación con el control mantenido en condiciones de oscuridad.

Como se observa en la Figura 51 A los genes que participan del proceso de quimiotaxis y movilidad celular en Az39, que resultaron inducidos por exposición a luz roja fueron *cheD* (ABAZ39_RS21045), *cheC* (ABAZ39_RS22100), *cheY* (ABAZ39_RS02410) y *cheA* (ABAZ39_RS12200). Para éstos genes, la inducción fue superior al control en un 14%, 30% y 27% respectivamente. Por otro lado, los genes *cheB* (ABAZ39_RS30325) y *motA* (ABAZ39_RS31890), resultaron inducidos en cultivos expuestos a luz azul y roja. En luz azul *cheB*, se indujo un 32% por encima de los valores expresados en el control mientras que en *motA*, la expresión por exposición a luz roja, se indujo en un 8% por encima del control en oscuridad. Otros genes involucrados en la movilidad mediada por flagelos, tales como *fliG* (ABAZ39_RS01860) y *fliM* (ABAZ39_RS03835), resultaron inducidos en cultivos de Az39 expuestos a luz blanca y roja respectivamente. En luz roja, la inducción fue del 15% y 40% respectivamente por debajo de los valores expresados en el control. En luz blanca, *fliM* un 37% por debajo de lo que se expresó en oscuridad. En la Figura 51 B se observan los genes reprimidos en luz roja, azul y blanca, tales como *cheR* (ABAZ39_RS22100), *cheW* (ABAZ39_RS12205) y *fliN* (ABAZ39_RS22030). En el caso de *cheR*, la represión fue de alrededor un 40% comparado al control; mientras que en *cheW* la exposición a luz roja y

blanca determinó una represión de un 50% con respecto al control. Por otro lado en condiciones de exposición a luz azul la represión fue de 40% en relación al control mantenido en condiciones de oscuridad. Por último, el gen *fliN*, mostró valores de represión de alrededor un 50% en luz roja y de un 30% en condiciones de exposición a luz azul y blanca. Por otro lado, los genes *cheD* (ABAZ39_RS12220), *cheC* (ABAZ39_RS23930), *cheY* (ABAZ39_RS02660) y *cheA* (ABAZ39_RS23965), resultaron reprimidos en luz azul y blanca. La represión de estos genes, en todos los casos, fue menor a lo que se observó en condiciones de oscuridad entre un 35-50%. De manera similar, este comportamiento se observó por exposición a luz blanca para *cheB* (ABAZ39_RS21100) y *motA* (ABAZ39_RS31890). Así en cultivos expuestos a luz azul, los genes *fliG* (ABAZ39_RS01860) y *fliM* (ABAZ39_RS03835), así como el gen *motB* (ABAZ39_RS31895) en condiciones de luz roja, resultaron reprimidos o sub-expresados.



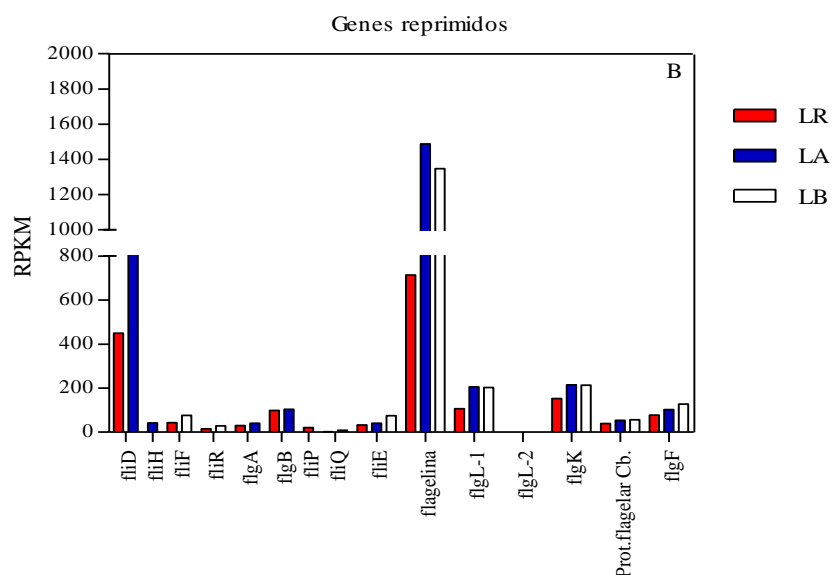


Figura 52. Análisis basado en los valores de RPKM de genes que participan del proceso de biosíntesis flagelar en Az39 que fueron inducidos (Figura A) y reprimidos (Figura B) por exposición a Luz roja (LR), azul (LA) y blanca (LB).

Como se observa en la Figura 52 A, los genes *flgB* (ABAZ39_RS03900), *flhH* (ABAZ39_RS22025), *flgC* (ABAZ39_RS03905), *flgQ* (ABAZ39_RS00960) se sobre-expresaron por exposición a luz blanca. Los valores de expresión fueron 12%, 8%, 20% y 8% respectivamente, en relación al control mantenido en condiciones de oscuridad. Para el caso del gen *flgC* también se indujo en luz azul y roja, aunque con un valor menor al control del 8%. El gen que codifica para la proteína de biosíntesis flagelar (ABAZ39_RS03925), se expreso por exposición a los tres tipos de luz, aunque en luz blanca mostró valores de expresión superior a los alcanzados en condiciones de oscuridad en un 10%. Por otro lado en la Figura 52 B, como se puede observar los genes relacionados con la biosíntesis de la *flagelina* (ABAZ39_RS10680), *flgL-1* (ABAZ39_RS10675), *flgK* (ABAZ39_RS10670), *fliE* (ABAZ39_RS03900), *flgF* (ABAZ39_RS03825), y proteína flagelar de cuerpo basal (ABAZ39_RS09170) se reprimieron por exposición a los tres tipos de luz, roja, blanca y azul. De manera particular, la exposición a luz roja y azul, fue la condición en la que se observó el mayor número de genes reprimidos, tal como *fliD* (ABAZ39_RS10685) y *flgA* (ABAZ39_RS03810). En líneas generales, los genes que resultaron significativamente

reprimidos, fueron el gen que codifica para la síntesis de flagelina (ABAZ39_RS10680) y *fliD* (ABAZ39_RS10685) por exposición a los tres tipos de luz y en condiciones de exposición luz roja y azul respectivamente

V.3.1.2. Resumen de resultados del análisis transcriptómico

Para este tercer informe se realizó un análisis estadístico robusto de los 3 transcriptomas obtenidos por la exposición de cultivos puros de *A. brasilense* Az39, a diferentes tipos de fuentes lumínicas. Para el análisis se involucró clusters de genes relacionados con la capacidad de captación de luz, división celular, movilidad, respuesta a estrés, entre otros procesos de interés. Este abordaje se consideró una primera estrategia experimental para correlacionar éstos resultados con aquellos derivados de los ensayos *in vitro* presentados en el Capítulo III y IV. Para el análisis propuesto, se debe tener en cuenta que el comportamiento de cada uno de los genes de cada transcriptoma (6410 genes) podría ser variable dependiendo de múltiples variaciones, sinérgicas o antagónicas entre los genes que se consideraron inicialmente y otros que mantienen una relación directa o indirecta con los genes de interés. En resumen, se consideró el análisis de 3 transcriptomas de *A. brasilense* Az39 obtenidos en diferentes condiciones experimentales y que presentan variaciones no sólo en unos cuantos genes si no en miles de ellos, regulados conjuntamente en cada condición, lo que se define como expresión global.

En la Tabla 8, se resumen aquellos genes que participan del proceso de división celular que resultaron inducidos o reprimidos dependiendo de la fuente luminosa en la que el microorganismo fue expuesto.

Tabla 8. Resumen del comportamiento de los principales genes, que participan en el proceso de división celular en *A. brasilense* Az39.

Locus tag	Producto	Fold change $\geq \pm 1$		
		LB	LA	LR
ABAZ39_RS02730	<i>ftsQ</i>	-2,241507967	-1,228691684	-1,259689243
ABAZ39_RS02720	<i>ftsZ</i>	1,026639914	-1,26029052	-1,061333738
ABAZ39_RS02760	<i>ftsW</i>	1,169670559	1,368088453	1,285623933
ABAZ39_RS02785	<i>ftsL</i>	1,180893193	1,057047315	1,229821359
ABAZ39_RS33905	<i>groEL-1</i>	1,027400181	-1,022755818	-1,268549374
ABAZ39_RS33915	<i>groEL-3</i>	-1,34291405	-1,413083893	-1,471427398
ABAZ39_RS33910	<i>groEL-2</i>	1,728302741	1,106141771	1,564512321
ABAZ39_RS33715	<i>dnaK-1</i>	1,281816074	1,0480112	1,019036521

Referencias: Luz blanca (LB); Luz azul (LA); Luz roja (LR). Los cuadrantes blancos: Inducidos. Cuadrantes grises: reprimidos.

Como se resume en la Tabla 8, los genes *ftsW* (ABAZ39_RS02760) y *ftsL* (ABAZ39_RS02785) fueron inducidos en todos los casos cuando Az39 creció en luz roja, azul y blanca; mientras que el gen *ftsQ* (ABAZ39_RS02730) se reprimió bajo las tres longitudes de onda utilizadas. El gen *groEL-1* (ABAZ39_RS33905), se indujo únicamente en luz blanca, *groEL-2* (ABAZ39_RS33910) se indujo en las tres luces y *groEL-3* (ABAZ39_RS33915), se reprimió en las tres fuentes luminosas.

Tabla 9. Resumen del comportamiento de los principales genes que participan en la captación de luz y respuesta a estrés *A. brasilense* Az39.

Locus tag	Producto	Fold change $\geq \pm 1$		
		LB	LA	LR
Genes Bacteriofitocromos				
ABAZ39_RS30095	PhyAz39-2	-1,0046267	1,1785663	-1,17740753
ABAZ39_RS30595	Bacteriofitocromo Hemo Oxigenasa	1,12904662	1,29114942	1,39858355
ABAZ39_RS15410	PhyAz39-1	1,09774229	-1,03299557	1,27280489
Genes estrés oxidativo				
ABAZ39_RS31045	Regulador transc. qorR	-1,18765579	1,99289047	-7,56134648
ABAZ39_RS08570	nmrS (NO)	2,03932182	1,7973529	2,28749108
ABAZ39_RS06690	<i>rpoH</i>	1,00121829	-1,01741763	-1,07617782
ABAZ39_RS13055	citocromo c551 peroxidasa	1,1664336	1,69425872	-1,04172085
ABAZ39_RS20345	<i>osmC</i>	-1,46625623	1,20435918	-1,21188051

Referencias: Luz blanca (LB); Luz azul (LA); Luz roja (LR). Los cuadrantes blancos: Inducidos. Cuadrantes grises: reprimidos.

Como se resume en la Tabla 9, en relación a los genes involucrados en el proceso de captación de luz, podemos decir que el PhyAz39-2, se reprimió en luz blanca y roja, y se indujo el PhyAz39-1. En luz azul, el comportamiento fue totalmente inverso, es decir que se indujo el PhyAz39-2 y se reprimió el PhyAz39-1. El gen que codifica para la hemo-oxigenasa, resultó inducido en las tres longitudes de luz. Uno de los genes involucrados en estrés oxidativo, tal como *nrrS* (NO) (ABAZ39_RS08570) se indujo tras ser expuesto el microorganismo a luz roja, azul y blanca, mientras que el gen regulador transcripcional *qorR* (ABAZ39_RS31045) se reprimió en luz blanca y roja. El gen *rpoH* (ABAZ39_RS06690) se indujo únicamente en luz blanca, al igual que el gen *osmC* (ABAZ39_RS20345) el cual se indujo en luz azul. En estas luces, azul y blanca, se indujo el gen que codifica para el citocromo c551 peroxidasa (ABAZ39_RS13055).

Tabla 10. Resumen del comportamiento de los principales genes, que participan en el proceso de quorum y biosíntesis de ácido indol-3-acético.

Locus tag	Producto	Fold change $\geq \pm 1$		
		LB	LA	LR
Genes QS				
ABAZ39_RS 30210	<i>luxR</i>	1,224895716	-1,018150049	1
ABAZ39_RS00195	<i>luxO</i>	-1,028023614	-1,066748518	0,390473594
ABAZ39_RS21150	σ	1,203562833	-1,169277932	1,093586532
ABAZ39_RS17100	RNA chaperonahfq	1,203562833	-1,170543167	-1,540989561
ABAZ39_RS22140	acil-homoserin-lactona acilasa	1,399268256	1,098294909	0,759312399
ABAZ39_RS16400	acilamida amido hidrolasa <i>amiE</i>	1,035205181	-1,06705289	0,321137896
Genes Biosíntesis AIA				
ABAZ39_RS18735	<i>aminotransferasa (hisC1)</i>	-1,209212614	1,229014284	1,116514171
ABAZ39_RS06445	<i>aminotransferasa (hisC2)</i>	-1,119774985	-1,237069691	-1,381223881
ABAZ39_RS11040	<i>ipdc</i>	-1,359925613	-1,125640169	-1,758451717
ABAZ39_RS31970	desidrogenasa (<i>aiildD</i>)	1,851814343	1,510194355	1,560009215
ABAZ39_RS31970	<i>iaaH</i>	-1,264037112	1,510194355	-1,060554385
ABAZ39_RS28630	<i>nitA</i>	1,415344713	1,319902743	-2,260541232
ABAZ39_RS08985	<i>ipfo</i>	-1,082451248	1,01816808	-1,503051075

Referencias: Luz blanca (LB); Luz azul (LA); Luz roja (LR). Los cuadrantes blancos: Inducidos. Cuadrantes grises: reprimidos.

El gen *amiE* (ABAZ39_RS16400), involucrado en proceso de quórum-quenching y el gen *luxR* (ABAZ39_RS30210), factor σ^{54} (ABAZ39_RS21150) se indujeron por exposición a luz blanca y roja, mientras que en luz azul estos genes se reprimieron. El gen para la acil homoserín lactona acilasa (ABAZ39_RS22140) se indujo en las tres fuentes luminosas. El gen *luxO* (ABAZ39_RS00195), se reprimió en luz blanca y luz azul y la chaperona hfq (ABAZ39_RS17100) se reprimió tanto en luz azul como así también en luz roja. A nivel de síntesis de AIA, los principales genes resultaron reprimidos, excepto el gen de la deshidrogenasa (ABAZ39_RS31970), el cual se indujo bajo las tres longitudes de luz. Con respecto a los demás genes analizados, los cuales participan en rutas alternativas a través de las cuales puede producirse AIA, en luz roja se reprimieron por completo. Estos genes *iaah*, *nitA*, e *ipfo*, mostraron el comportamiento inverso en respuesta a la exposición a luz azul. Por último en luz blanca, solo se indujo el gen que codifica para la nitrilasa, *nitA*.

Tabla 11. Resumen del comportamiento de los principales genes, que participan en el proceso de quimiotaxis y biosíntesis flagelar.

Locus tag	Producto	Fold change $\geq \pm 1$		
		LB	LA	LR
Quimiotaxis y Movilidad				
ABAZ39_RS12200	<i>cheA</i>	-1,116277518	-1,196277518	1,572485446
ABAZ39_RS02660	<i>cheY</i>	-1,2356732	-1,467439766	2,010429075
ABAZ39_RS31780	<i>fiG</i>	1,414510658	2,222791647	1,268237218
ABAZ39_RS03835	<i>fliM</i>	1,450735815	-1,159719908	1,040837145
ABAZ39_RS07750	<i>fliN</i>	-1,454096766	-1,202502441	-1,138105206
Biosíntesis flagelar				
ABAZ39_RS10675	<i>flgL</i>	-1,90008743	-1,76986852	-3,914133033
ABAZ39_RS00960	<i>fliQ</i>	1,264487913	-1,103031268	-3,312368747
ABAZ39_RS03900	<i>flgB</i>	1,043921344	-1,109993213	-1,071002448
ABAZ39_RS10685	<i>fliD</i>	1,222059087	-1,444705652	-1,526838874
ABAZ39_RS10680	<i>flagelina</i>	-1,155224046	-1,073129212	-1,400342621
ABAZ39_RS03905	<i>flgC</i>	1,336666973	1,181415853	1,416039013

Referencias: Luz blanca (LB); Luz azul (LA); Luz roja (LR). Los cuadrantes blancos: Inducidos. Cuadrantes grises: reprimidos.

En relación a los genes involucrados en movilidad y quimiotaxis, tales como *cheA* (ABAZ39_RS12200) y *cheY* (ABAZ39_RS02660), resultaron reprimidos por exposición a luz blanca y azul, mientras que en luz roja fueron inducidos. Por último, los genes relacionados con el proceso de biosíntesis flagelar en su mayoría, en luz azul y roja, se vieron reprimidos, como *flgL-1* (ABAZ39_RS10675), *fliQ* (ABAZ39_RS00960), *flgB* (ABAZ39_RS03900), *fliD* (ABAZ39_RS10685), flagelina (ABAZ39_RS10680). Por el contrario en luz blanca gran parte de los genes resultaron inducidos.

V.4. Discusión

Los avances en la tecnología de secuenciación de ARN han revolucionado el estudio de los transcriptomas bacterianos (Croucher et al., 2010; Vogel, 2014). En esta sección de la Tesis, se llevó a cabo un análisis transcriptómico mediante secuenciación masiva del ARN, para dilucidar el impacto de la luz en la expresión génica de *A. brasilense* Az39 y su fisiología, a nivel del crecimiento y la expresión de diversos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. Para ello, en un primer paso, se llevó a cabo un análisis global de la expresión y número de genes expresados en cada condición experimental, y luego se focalizó el estudio en grupos o clusters de genes de mayor interés para ésta Tesis.

Con respecto al análisis global, se puede decir que alrededor del 50% de los genes expresados en luz blanca 75 W, luz azul PAR38 y luz roja PAR38 resultaron inducidos o reprimidos en cada condición experimental, y un gran número de éstos genes, aún no poseen una función específica ya que han sido anotados como proteínas hipotéticas. Trabajos similares en bacteroides aislados de plantas de soja inoculadas con *B. japonicum* USDA 110, arrojaron que la mayoría de los genes inducidos o sobre-expresados en tales microorganismos eran genes hipotéticos, a diferencia de aquellos involucrados en el metabolismo del carbono, de aminoácidos, de transporte los cuales mostraron niveles menores de expresión, lo que sugiere que estos procesos metabólicos no participan en la simbiosis rizobio-leguminosa y son enmascarados por las condiciones experimentales o son satisfechos por genes hipotéticos/desconocidos (Franck et al., 2014). En esta Tesis, el análisis global de genes expresados de manera común en cada una de las longitudes de onda, arrojó la expresión de genes que codifican para la biosíntesis de diversos reguladores transcripcionales, tales como *asnC* (ABAZ39_RS26430), también para tioredoxina (ABAZ39_RS15755) y un par de

proteínas las cuales no tienen designada una función metabólica (ABAZ39_RS19825). Hasta el momento se presume que estos genes participan ante diversos estímulos ambientales. A pesar de que los homólogos *lrp/asnC* son abundantes en bacterias y genomas de las arqueas, el papel fisiológico y la identidad de estos genes de la mayoría de microorganismos siguen siendo difíciles de alcanzar. El conocido *lrp* en *E. coli* es un regulador global involucrado en diversos patrones regulatorios que están directamente afectados por la leucina (Platko et al., 1990). En el caso de *asnC*, fue el primer miembro informado de esta familia cuya actividad es activada por la asparagina y con papeles poco claros en el metabolismo del aspartato (Kolling y Lothar, 1985). Es muy difícil predecir con precisión las funciones de los homólogos de *lrp/asnC* debido a sus múltiples funciones en la regulación y más allá, como el transporte, la energía, el metabolismo central, la reparación y recombinación del ADN, la persistencia bacteriana y la virulencia. Reportes realizados por Baek et al., (2009), mencionan que la prevención de las consecuencias y daño en el ADN requiere la expresión a tiempo de mecanismos de reparación de esta macromolécula y genes de regulación transcripcional, con el fin de mantener la integridad del genoma y la viabilidad de la célula (Deng et al., 2011). También se observó la expresión significativa de genes que participan en procesos redox, tal como *fixG*, o genes relacionados con la disminución de los niveles de peróxido de hidrógeno, tal como la tioredoxina peroxidasa. En un reporte realizado en *Saccharomyces cerevisiae* para identificar mecanismos importantes para la activación transcripcional de genes que codifican proteínas antioxidantes, se encontró que la tioredoxina peroxidasa, *Tsalp*, del sistema de tioredoxina es esencial para la inducción transcripcional de otros componentes del sistema de tioredoxina, *TRX2* (tioredoxina) y *TRR1* (tioredoxina reductasa), en respuesta al peróxido de hidrógeno (Ross et al., 2000).

En la actualidad los reportes bibliográficos acerca del efecto de la luz en la expresión de genes del tipo bacteriofitocromo en procariontes es limitado. Luego del análisis transcriptómico llevado a cabo, se podría decir que el flujo de expresión génica, es muy versátil, dependiente de la fase de crecimiento del microorganismo, condiciones de cultivo, tiempos de exposición a cada longitud de onda, fuente luminosa empleada, entre otros factores que influyen en la generación de determinados ARN mensajeros. Los fitocromos comprenden una familia de sensores para luz roja/roja lejana en plantas (Smith, 2000). Aunque originalmente se pensó que los fitocromos se condenan solo a organismos fotosintéticos (Hughes y Lamparter, 1999 y

Vierstra y Davis, 2000) hace aproximadamente más de una década, que se han detectado proteínas similares a las del fitocromo en dos eubacterias heterótrofas, *Deinococcus radiodurans* y *Pseudomonas aeruginosa* (Davis y Vierstra, 1999). Mientras que los fitocromos de plantas usan fitocromobilina como cromóforo, los Bacteriofitocromos (BphP) se ensamblan con biliverdina, para generar quinasas fotocromáticas moduladas por luz roja y roja lejana. En algunos casos, una única hemo oxigenasa es la responsable de la síntesis de biliverdina. En esta tesis, se observó en *A. brasilense* Az39 la inducción del gen que codifica para una hemo oxigenasa (BphO) en las tres fuentes lumínicas. La hemo oxigenasa (HO) es una enzima limitante en la velocidad del proceso del catabolismo del hemo, sensible y altamente activa. Shan et al., (2015) indicaron que los niveles de expresión del gen BphO varía en el tiempo frente a un estrés abiótico, indicando que los genes BphO responden a estreses abióticos ya que luego de 6 h de exposición a cadmio, cloruro de sodio, nitroprusiato de sodio, ácido salicílico y temperaturas bajas (4°C), generaron la sobre-expresión de este gen. Por otro lado, los fitocromos presentes en el genoma de Az39, PhyAz39-1 y PhyAz39-2, resultaron inducidos o reprimidos, de manera desigual en luz azul por un lado, y en luz roja y blanca por otro. En un reporte realizado con la bacteria fototrófica *Rhodobacter sphaeroides* expuesta a luz azul vieron que los genes (*puc* y *puf*) que participan en la formación del fotosistema resultaron reprimidos luego de una irradiación desde 5 a 135 minutos (Braatsch et al., 2004). Así estos autores, proponen el supuesto de que la represión de los genes que participan ya sea en el ensamblado del fotosistema o de la expresión como tal de los fotosistemas, probablemente se relacione con el proceso de prevención de un daño fotooxidativo cuando el fotosistema, el oxígeno y la luz de alta intensidad están presentes simultáneamente. En la cianobacteria *Synechocystis* sp., Cph2 es un fotorreceptor que puede detectar un rango espectral muy amplio que se extiende desde la región cercana a la luz ultravioleta a la región roja lejana y traduce esta información en cambios en los niveles de c-di-GMP (Savakis et al., 2012). Hasta la fecha, los cianobacteriofitocromos (CBCR) se han asociado con procesos tan diversos como la adaptación cromática (Kehoe y Grossman, 1996; Hirose et al., 2008; 2010) y la fototaxis (Yoshihara et al., 2004). Aparte de los dominios de salida de señal de histidina quinasa comunes, algunos fitocromos bacterianos emplean un conjunto de diferentes dominios de salida, tales como dominios MCP (proteína quimiotaxis que acepta metilo) (Bhaya, 2004) o GGDEF y dominios EAL (Tarutina et al., 2006). Datos recientes revelan que c-di-GMP inhibe

la motilidad en varias bacterias (Wolfe y Visick, 2008) incluyendo *E. coli* (Ryjenkov et al., 2006; Boehm et al., 2010). Aquí, la velocidad de nado de las células de *E. coli* está estrechamente regulada por la proteína de unión, YcgR, que interactúa directamente con los componentes motrices de la flotación (Boehm et al., 2010; Paul et al., 2010).

De acuerdo al análisis de clusters, se identificaron genes con un nivel de expresión diferencial, asociados a procesos de replicación celular en las tres condiciones experimentales evaluadas. En líneas generales, los genes que participan en procesos de división celular y protección como respuesta a estímulos ambientales desfavorables, se vieron expresados diferencialmente en luz blanca en mayor proporción comparado a luz azul y roja; sin embargo, el gen *dnaK* fue uno de los genes que se sobre-expresó en las tres fuentes luminosas, mientras que *groEL* solo se indujo en luz blanca. Reportes realizados acerca del efecto de la luz en este gen, mostró que en *E. coli* la luz ultravioleta y el ácido nalidíxico también causan la inducción de al menos dos genes, *groEL* y *dnaK*, los cuales son inducidos por un aumento en la temperatura. Estos autores consideran que estos dos productos genéticos probablemente no desempeñan papeles importantes en la recuperación de una célula del daño del ADN y pueden funcionar en otros procesos celulares (Krueger et al., 1984). Por otro lado, Wild et al., (1996) observaron en *E. coli* que las proteínas de choque térmico sintetizadas por la expresión de los genes *dnaK* y *dnaJ* también están involucradas en la exportación de varias proteínas, muy probablemente actuando como sus chaperonas y facilitando la exportación de proteínas.

El análisis bioquímico y genético de la biosíntesis de AIA en *A. brasilense*, revela la presencia de múltiples vías de síntesis de la forma activa (Prinsen et al., 1993), tal como la vía, indol-3-piruvato (IPA), indol 3-acetamida (IAM) y triptamina (TAM), y una vía de trp-independiente (Prinsen et al., 1993; Carreño-López et al., 2000), siendo la vía del indol-3-piruvato, la más importante para el género. La enzima clave de esta vía es la indol-3-piruvato descarboxilasa (codificada por el gen *ipdC*). A partir de los resultados alcanzados durante el Capítulo IV de esta Tesis Doctoral, relacionados con la producción de AIA en Az39, se planteó realizar un análisis más profundo de genes que participan en rutas de biosíntesis de AIA en microorganismos PGPR, con el objetivo de poder correlacionar en caso de que sea posible, el incremento en la biosíntesis y acumulación de AIA bajo determinadas condiciones de cultivo y fuente lumínica con la expresión génica. Hasta la actualidad no se han identificado en su totalidad los genes involucrados en las rutas metabólicas descritas anteriormente. Se conoce

demasiado bien, la vía IPA, es decir la vía de mayor importancia para el género o a través de la cual Az39 puede producir y acumular AIA. A nivel de la biosíntesis de auxinas, los ensayos realizados en condiciones *in vitro* en Az39 en medio de cultivo rico nutricionalmente (LB), arrojaron un incremento en los niveles de concentración de AIA por exposición a la luz blanca, con respecto a lo producido y acumulado en luz roja y luz azul. El análisis transcriptómico de los cultivos expuestos a las longitudes de onda experimentales (roja, azul y blanca) arrojó que uno de los genes involucrados en la biosíntesis de AIA, el cual codifica para una deshidrogenasa, resultó sobre-expresado en luz blanca, sin embargo en luz azul y roja también, aunque los valores de expresión en estas últimas dos longitudes, fueron menores. Van Puyvelde et al., (2011), reportaron un trabajo con *A. brasilense* Sp245 acerca de una aldehído deshidrogenasa, la cual la mutante *ipdC* mostró niveles de expresión menor de la deshidrogenasa en presencia de AIA, condición en la cual, la cepa salvaje mostró niveles de expresión mayores. Las aldehído deshidrogenasas están ampliamente distribuidas en genomas bacterianos y están involucradas en varios procesos biológicos. En la ruta IPA, la última etapa de síntesis es catalizada por una aldehído deshidrogenasa, que convierte indol-3-acetaldehído en AIA. Se ha demostrado la implicancia de la aldehído deshidrogenasa en la biosíntesis de AIA a través de un mutante en este gen, el cual mostró una reducción severa en la producción de AIA. Mientras que la cascada de señalización en *A. brasilense* causada por AIA todavía tiene que ser descifrada, esta molécula sería una molécula de comunicación importante para que *A. brasilense* interaccione con las plantas (Xie et al., 2005). Los resultados observados del análisis transcriptómico, arrojaron que el gen *ipdC* fue reprimido en condiciones de luz blanca, condición en la que bajo condiciones *in vitro* se observó la máxima producción y acumulación de AIA, sin embargo otros genes relacionados con la vía de síntesis, tal como se mencionó al principio, como el *iiaIdD*, que codifica para la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa (ABAZ39_RS31970), enzima encargada de oxidar el ácido indol-3-acetaldehído a ácido indol-3-acético, se indujeron en condiciones de luz blanca un 50 %, más que en oscuridad, lo que podría indicar que la acumulación observada luego de 72 horas de exposición (Capítulo IV, Producción de AIA en medio rico LB) podría deberse a la activación de una vía de síntesis alternativa para la producción de AIA. Por otro lado, genes que participan en otras rutas de biosíntesis de AIA, no se vieron sobre-expresados durante 4 h de exposición a luz blanca 75 W, luz azul y roja PAR38, y en condiciones de oscuridad. Cultivos expuestos a luz azul,

mostraron ser inducidos, pero con valores por debajo del control; esto ocurrió para los genes *nitA*, y para el gen *iaaH*. Caso contrario ocurrió con estos genes en luz roja, los cuales se vieron reprimidos.

Dentro de los resultados explicados anteriormente, se observó que en aquellos cultivos expuestos a luz blanca, la expresión génica de aquellos con valores estadísticamente significativos, participan del sistema de secreción tipo VI (ABAZ39_RS21320 y ABAZ39_RS21320). Muchos de estos genes se describen principalmente en relación con la virulencia (Cascales, 2008), pero la presencia de estos genes también se informó en la simbiosis *Rhizobium* (Bingle et al., 2008; Bladergroen et al., 2003). Van Puyvelde et al., (2011) demostraron que el IAA es una molécula capaz de alterar la expresión génica de un sistema de secreción. Las observaciones en *Agrobacterium* muestran que el AIA interviene en la interacción planta-*Agrobacterium*. Tanto el AIA como el ácido salicílico regulan negativamente los genes *vir* responsables de la impregnación en las células de la planta por estimulación, de la expresión de un sistema de secreción tipo IV (Yuan et al., 2008).

En relación a la respuesta bacteriana a estrés, se puede mencionar que en condiciones de exposición a luz blanca se observó la inducción de genes que participan de la respuesta a estrés oxidativo, tales como el *nmrS*, en respuesta al óxido nítrico y el gen *rpoH*, el cual codifica para un factor sigma que está involucrado en la regulación de la expresión de genes de choque térmico. La concentración intracelular de la proteína RpoH libre aumenta en respuesta al choque térmico, lo que causa asociación con ARN polimerasa e iniciación de la transcripción de genes del choque térmico, incluyendo numerosos reguladores transcripcionales globales y genes implicados en el mantenimiento de la funcionalidad de la membrana celular y homeostasis (Nonaka et al., 2006). Braatsch et al., (2004) observaron en *R. sphaeroides* la inducción de los genes *rpoE* y *rpoH* cuando el microorganismo se expuso a luz azul durante 135 minutos. Por otro lado, en esta tesis, se observó que bajo la exposición a luz azul se indujo el gen *osmC* mientras que por el contrario en luz roja y blanca la expresión de este gen presentó un comportamiento opuesto. La proteína Osmóticamente inducible C (OsmC) está involucrada en el mecanismo de defensa celular contra el estrés oxidativo, así en *T. kodakaraensis* KOD1, el gen *osmC* se indujo en presencia de peróxidos orgánicos e inorgánicos (Park et al., 2008). Heo et al., (2014), encontraron que estos genes asociados al estrés oxidativo fueron reducidos cuando se expuso a *Acinetobacter oleivorans* al antibiótico

kanamicina. Muchos autores afirman que el análisis transcriptómico, de un mismo gen, es muy amplio, ya que este mismo puede participar en respuesta a más de un tipo de estrés, tal como en respuesta al choque térmico, el estrés oxidativo y la fase estacionaria (Desikan et al., 2001; Leichert et al., 2003; Zheng et al., 2001). Del mismo modo, el sistema de dos componentes, *cheA/cheY*, involucrado en la transducción de señal extracelular a través de la bacteria, también fue regulado por las longitudes de onda (Dons et al., 2004). En luz roja, Az39 mostró inducción en los valores de expresión de ambos genes. La sobreexpresión de estos genes, han sido reportada por otros autores, tal es el caso de la bacteria Gram negativa, *Listeria monocytogenes* en la que observaron la expresión de este sistema de dos componentes en presencia a un compuesto biocida, al cloruro bencetonioide (BZT). Así el sistema de dos componentes *cheA/cheY* se sobreexpresó en aproximadamente un 30% y 80% respectivamente; sin embargo, también se ha reportado otros efectos de la luz en otros microorganismos, tal es el caso de *Caulobacter crescentus*, una especie que no es ni fotosintética, fototáctica ni pigmentada, contiene un sistema de dos componentes fotosensoriales (LOV) que puede actuar en respuesta a la unión de la superficie celular bacteriana y célula-célula (Purcell et al., 2007). Las respuestas fototácticas son conocidas por muchas bacterias, incluyendo *Halobacterium salinarum*, *Ectothiorhodospira halophila* (Hellingwerf, 2002), *Rhodospirillum centenum* (Jiang et al., 1998) o cianobacterias como *Synechocystis* PCC6803 (Wilde et al., 2002; Yoshihara e Ikeuchi, 2004). En *A. tumefaciens* no existe indicación de una respuesta fototáctica, es decir, el movimiento hacia o desde la fuente de luz (G. Rottwinkel, comunicación personal). El efecto de luz en *A. tumefaciens* podría definirse como la fotokinesis: una alteración en la velocidad de motilidad causada por diferencias en la intensidad de la luz (Oberpichler et al., 2008).

A pesar de la gran información genómica presente en las bases de datos que existe en la actualidad, poco se sabe acerca de ciertos mecanismos moleculares considerados clave durante la interacción bacteria-bacteria y bacteria-planta. Tal es el caso de los sistemas de secreción y de los mecanismos de quórum bacterianos. De acuerdo a los estudios microbiológicos llevados fundamentalmente a cabo en los últimos 50 años, se sabe que numerosos mecanismos del metabolismo bacteriano están regulados por sistemas de quórum. En *A. brasilense* Az39 hay un total de 183 proteínas de tipo LuxR pertenecientes a diversas familias de reguladores transcripcionales, aunque muy pocas de ellas que están relacionadas a los sistemas canónicos

LuxI/LuxR típicos de bacterias Gram negativas como *Vibrio fischeri* (Nealson y Hastings, 1979). Los reguladores LuxR cognados (con un LuxI afín) de quorum sensing encontrados son solo tres (3) pertenecientes a *Azospirillum sp.* B510 y *Azospirillum lipoferum* TVV3. Del mismo modo, solo estas cepas presentan un LuxI (AHL sintasa) en sus genomas. Además solo dos cepas de *Azospirillum* analizadas tienen un luxR orphan o solo (Subramoni y Venturi, 2009), *A. brasilense* Az39 y *Azospirillum halopraeferens*. Durante este informe de tesis se observó que un alto número de genes que participan en el proceso de quórum sensing en Az39, resultaron inducidos en luz blanca, tales como, *luxR*, como así también los que codifican para una acil homoserín lactona acilasa, y chaperona *hfq*. La presencia del receptor tipo LuxR solo en *A. brasilense* Az39 podría justificar de algún modo su gran capacidad de promover el crecimiento de plantas de interés agrícola, los LuxR solo en bacterias asociadas a plantas pueden responder a AHLs exógenas o a moléculas químicamente similares provenientes de sus plantas hospedadoras (Patel et al., 2013). Además, la presencia de reguladores tipo-LuxR están asociados a mecanismos de regulación génica tan relevantes en procesos como nodulación y Fijación Biológica de Nitrógeno, así como muchos otros procesos en los que intervienen receptores del tipo histidin quinasa (Schikora et al., 2011). La chaperona Hfq regula varios mecanismos en los que participan ARN pequeños, la cual es responsable de distintos procesos de control en la regulación génica. Con respecto a la inducción del gen que codifica para la enzima N-acil-homoserin lactona acilasa sugiere que en cepas del género *Azospirillum* prevalecen mecanismos de interceptación de señales de quórum, independientemente de si producen o no moléculas señales de este tipo. Además, la aparición de tales mecanismos en estas cepas y sobre todo en *A. brasilense* Az39 permiten inferir en la importancia de este tipo de reguladores no solo en la selección de su nicho ecológico sino también en la adaptabilidad al estilo de vida de estas bacterias en el ambiente rizosférico. Por último con respecto a los genes reprimidos relacionados con el quórum sensing, se observó la represión del gen *luxo* en las tres fuentes luminosas empleadas, es decir luz blanca 75 W, Luz azul y roja PAR38. Las proteínas de tipo LuxO y otros reguladores centrales de procesos metabólicos intervienen en diversos mecanismos de quórum no canónicos como el que se encuentra en la bacteria *Vibrio hareyi* (Bassler et al., 1997). De manera particular, la respuesta de los genes que codifican para bombas de flujo en Az39, fue particular y diferencial en cada fuente luminosa. Esta proteína podría estar implicada en el

intercambio de señales de comunicación celular ya sea proveniente de otras bacterias o inclusive de la planta con la que interacciona. Por otra parte, también se observó que la expresión de los genes *motA* y *motB* así como aquellos involucrados en el interruptor del motor, *fliG*, *fliM* y *fliN*, resultaron inducidos o reprimidos. En luz blanca, roja y azul, *fliG*, se indujo; mientras que *fliN*, bajo las mismas condiciones, se reprimió. En luz blanca y roja, se indujo además *fliM*. De acuerdo a los resultados observados en medio de cultivo semisólido llevados a cabo para determinar si la movilidad resultaba afectada (Capítulo III), Az39 en luz roja, se desplazó de manera similar al control, mientras que en luz blanca ocurrió lo contrario. Probablemente en luz blanca, estarían involucrados otros mecanismos celulares los cuales tendrían un impacto en el desplazamiento, como es en este caso en un ambiente determinado. Los genes *motA* y *motB* en luz roja, se indujeron, mientras que en luz azul ambos resultaron reprimidos. Casey et al., (2014) observaron una regulación positiva en presencia de BZT para los genes *motA* y *motB*. Las proteínas MotA y MotB, juntas interactúan con los genes *fliG*, *fliM* y *fliN*, y cumplen una función en el transporte transmembrana de protones (Tang et al., 1996). El tráfico de protones proporciona la energía necesaria para que los flagelos giren, permitiendo así que la célula bacteriana se vuelva móvil.

V.5. Conclusiones

En este Capítulo de Tesis se pudo concluir que:

El análisis transcriptómico global de *A. brasilense* Az39 expuesto a luz blanca (75 W), azul (PAR38) y roja (PAR38), reveló un comportamiento particular del flujo de expresión de genes de acuerdo a cada tratamiento. Cuando se analizó de manera particular la expresión de genes asociados a clusters de mayor interés de ésta tesis, como aquellos relacionados con la supervivencia bacteriana (división celular, estrés oxidativo), producción de AIA, quimiotaxis, biosíntesis flagelar, bacteriofitocromos, entre otros, se pudieron comprender los siguientes comportamientos:

V.5.1. Expresión génica en la división celular y estrés biótico.

Tal como se observa en la Figura 53, cultivos expuestos a luz blanca, mostraron el mayor número de genes inducidos, mientras que por el contrario en luz roja y azul, gran parte de los genes resultaron reprimidos.

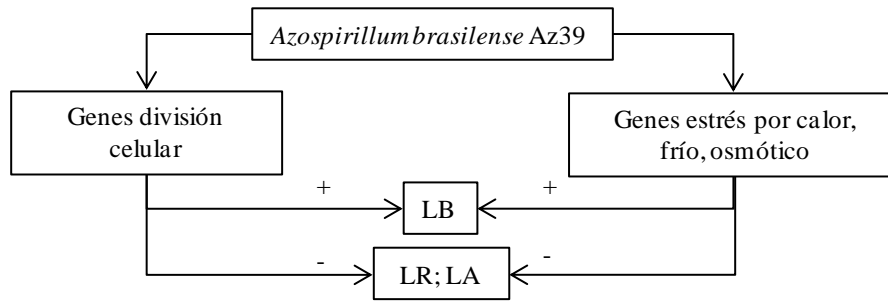


Figura 53. Esquema general del comportamiento de los genes que participan en la división celular y respuesta a estrés. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión.

Los genes que participan en la división celular como así también aquellos que participan en respuesta a estrés, ya se generado por frío, calor o estrés osmótico, en respuesta a luz blanca resultaron en su gran mayoría inducidos.

V.5.2. Expresión génica de los fitocromos presentes en el genoma de Az39

Tal como se observa en la Figura 54, el gen que codifica para una hemooxigenasa, se indujo en las tres fuentes lumínicas, mientras que los fitocromos respondieron diferente en cada luz.

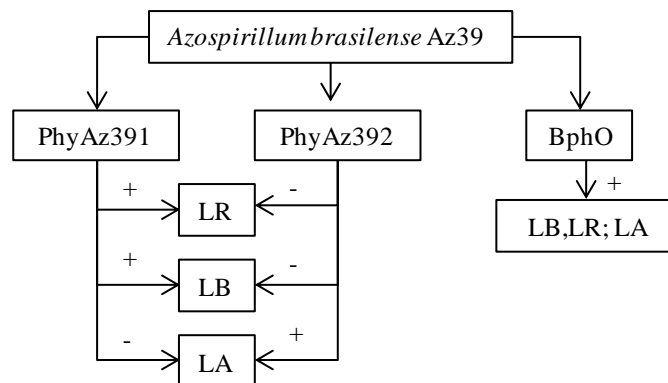


Figura 54. Esquema general del comportamiento de los genes que participan en respuesta a la captación de luz. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión.

En luz roja y blanca se indujo el gen que codifica para el fitocromo PhyAz39-1, y por otro lado se reprimió el fitocromo PhyAz39-2 en cada luz. En luz azul, se indujo el fitocromo PhyAz39-2 y por se reprimió el PhyAz39-1.

V.5.3. Expresión génica en las rutas de biosíntesis de AIA.

Tal como se observa en la Figura 55, cultivos expuestos a luz blanca, azul y roja, revelaron la inducción del gen que codifica para una deshidrogenasa, y por otro lado, en las mismas condiciones experimentales, se reprimieron dos genes de la vía, uno el *ipdc* y uno que codifica para una aminotransferasa (*hisC2*).

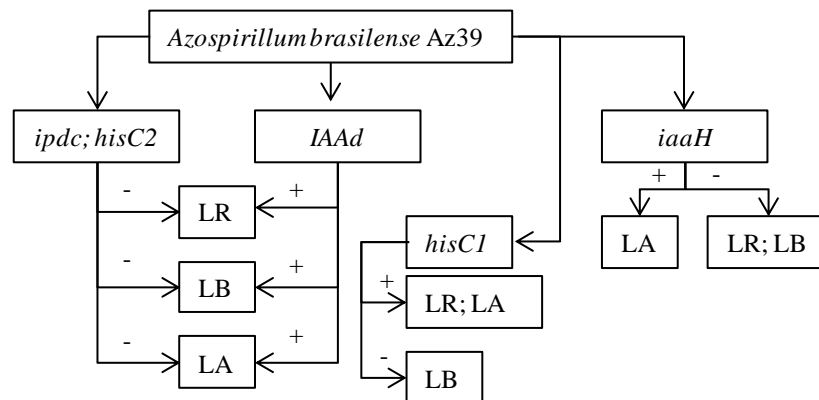


Figura 55. Esquema general del comportamiento de los genes que participan en diversas rutas de biosíntesis de AIA en Az39. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión.

En el caso de la segunda aminotransferasa (*hisC1*) solo se indujo en luz roja y azul, y se reprimió en luz blanca. Con respecto a los genes que están involucrados en la biosíntesis de AIA mediante otras vías, como el gen *iaaH*, solamente se indujo en luz azul, y por el contrario se reprimió en luz blanca y roja.

V.5.4. Expresión génica en quórum sensing (QS) flagelación y quimiotaxis.

Como se observa en la Figura 56, genes que participan del proceso de quórum sensing y biosíntesis flagelar, resultaron mayoritariamente inducidos en cultivos expuestos a luz blanca, mientras que en luz azul y roja, la mayoría de estos genes, se reprimieron.

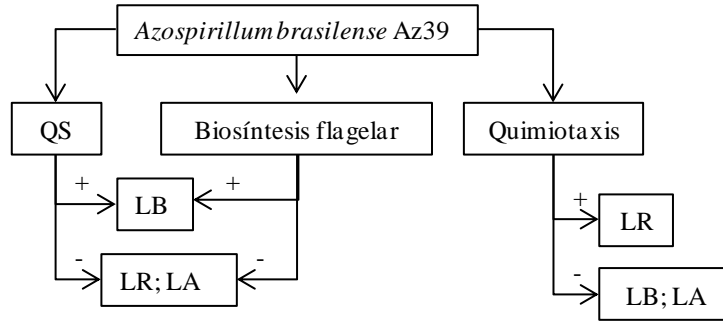


Figura 56. Esquema general del comportamiento de los genes que participan QS, biosíntesis flagelar y quimiotaxis en Az39. Signo (+) Inducción o sobre-expresión. Signo (-) Represión o sub-expresión.

Por último, genes que participan en el proceso de quimiotaxis, se indujeron en su gran mayoría, en cultivos expuestos a luz roja, y por el contrario ocurrió en luz blanca y azul, condición en la que se reprimieron la gran mayoría de los genes que participan en este proceso.

CAPÍTULO VI: Efecto de la luz sobre *A. brasilense* Az39 en interacción con *Arabidopsis thaliana*

VI. Marco general

Como se ha mencionado en este trabajo, las rizobacterias promotoras de crecimiento de plantas (PGPR) son bacterias que residen en el suelo y en las raíces de las plantas, y son capaces de promover el crecimiento de éstas, ya sea directamente estimulando el crecimiento o indirectamente protegiéndola de patógenos (Spaepen et al., 2014). Dentro de la clasificación de las bacterias PGPR se encuentra el género *Azospirillum*, microorganismos diazotróficos, para los cuales durante mucho tiempo se consideró que la fijación biológica de nitrógeno asociativa (FBN) era el mecanismo de promoción directa del crecimiento de las plantas (Doobereiner y Day, 1976; Okon et al., 1983). En cambio, la producción de hormonas vegetales es en la actualidad el mecanismo bacteriano principalmente responsable de los efectos que promueven el crecimiento de las plantas, aunque otros mecanismos también pueden tener una contribución menor (Bashan y de-Bashan, 2010). Estas hormonas vegetales producidas por bacterias (principalmente aquellas del grupo de las auxinas) pueden alterar la morfología de la raíz, aumentar el número de raíces laterales y pelos radiculares, generando así un aumento de la superficie de absorción y el mejor aprovechamiento de los recursos por parte de la planta.

VI.1. Producción de fitohormonas.

Uno de los principales mecanismos de promoción del crecimiento propuesto para el género *Azospirillum* involucra la capacidad de producir moléculas reguladoras del crecimiento vegetal, capaces de afectar el crecimiento de la planta, ya sea promoviendo o inhibiendo el desarrollo, la división o diferenciación de células y de los tejidos. Se sabe que las cepas de *Azospirillum* sp. son capaces de sintetizar un grupo de fitohormonas que incluyen auxinas (Prinsen et al., 1993), giberelinas (Bottini et al., 1989), citocininas (Tien et al., 1979), ácido abscísico (Cohen et al., 2008), etileno (Strzelczyk et al., 1994) y poliaminas (cadaverina, putrescina, espermina, espermidina) (Cassán et al., 2009). No obstante, el mecanismo analizado con mayor amplitud por los investigadores en los últimos años, ha sido la producción de compuestos del grupo de las auxinas.

Las auxinas son responsables de división, extensión, y la diferenciación de células y tejidos vegetales. El miembro mejor caracterizado y más abundante de la familia auxina es el ácido indol-3-acético (AIA), compuesto heterocíclico que contiene un grupo carboximetilo en su

estructura (ácido acético). Para la síntesis del mismo se conocen en *Azospirillum* tres vías dependientes de triptófano (un aminoácido comúnmente encontrado en los exudados de raíces vegetales): (i) vía del ácido indol-3-pirúvico (IPA) en la cual la enzima clave es la indol piruvato descarboxilasa codificada por el gen *ipdC*; (ii) vía del indol-3-acetonitrilo (IAN); y (iii) la vía de la indol-3-acetamida (IAM) (Zakharova et al., 1999). También, ha sido reportada una vía independiente de triptófano (Carreño-Lopez et al., 2000; Prinsen et al., 1993; Cassán et al., 2014), pero no se conoce mucho sobre este mecanismo. El AIA se produce durante todas las etapas de crecimiento del cultivo aunque es mayor la producción de esta hormona durante fase estacionaria y coincidente con la producción de metabolitos secundarios (Malhotra y Srivastava, 2009; Creus et al., 2017). Se han detectado otras moléculas de tipo auxinas producidas por *Azospirillum* sp. además del AIA, tales como el ácido indol butírico (IBA) (Martínez-Morales et al., 2003), ácido indol láctico, indol etanol e indol metanol (Crozier et al., 1988), indol acetamida (Hartmann et al., 1983), indol acetaldehído (Costacurta et al., 1994), y ácido fenil acético (Somers et al., 2005).

VI.1.1. Efectos de auxinas producidas por *Azospirillum* sp.: Un poco de historia.

El crecimiento radicular, es quizás el parámetro más notable que cambia durante la interacción PGPR en no leguminosas. El rápido establecimiento de las plántulas en un sustrato se debería a la promoción del crecimiento radical que podría ser considerado una clara ventaja para la planta, porque aumentaría la absorción de agua y nutrientes. Simultáneamente, Tien et al., (1979) y Hubbell et al., (1979) demostraron que la aplicación exógena de AIA, GA₃ y cinetina (K) en mijo perla (*Pearl millet*) y sorgo producían los mismos cambios en la morfología de la raíz que las plántulas inoculadas con *A. brasilense*. En otros ensayos, Kolb y Martin (1985) encontraron que la inoculación de *Beta vulgaris* sp. con *A. brasilense* aumentó el número de raíces laterales y este efecto fue correlacionado con los altos niveles de AIA bacteriano presentes en el medio de cultivo, que solo fueron igualados por la aplicación exógena de concentraciones similares de AIA. Kucey (1988) encontró que la inoculación de trigo con *A. brasilense* simuló el efecto del tratamiento con AIA y GA₃ exógeno en relación con el patrón de crecimiento de tallos y raíces. También en las plantas de trigo, Zimmer et al., (1988) probaron que la adición exógena de AIA y nitrato fueron total o parcialmente sustituidas por la inoculación con *A. brasilense*. Falik et al., (1989) inocularon plántulas de maíz (*Zea mays* L.)

con *A. brasilense* Cd y evaluaron la concentración de AIA e IBA (tanto en las formas libres y conjugadas) en tejidos de la raíz por cromatografía líquida-gaseosa (GLC) y cromatografía de gas-masas acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Ellos encontraron que los niveles libres de AIA y de IBA fueron superiores en los tratamientos inoculados en comparación con las raíces no inoculadas. Barbieri et al., (1988) demostraron que la inoculación con una cepa de tipo salvaje de *A. brasilense* (productora de AIA) aumentó el número y la longitud de las raíces laterales de trigo. En contraste, la inoculación con un mutante con menor producción de AIA, no modificó el desarrollo de la raíz. Tanto Dobbelaere et al., (1999), como Spaepen et al., (2008) presentaron evidencia concluyente sobre el papel de AIA y su efecto fitoestimulador por la inoculación con *Azospirillum* sp. mediante el uso de cepas salvajes y deficientes en la biosíntesis de AIA, así como de tratamientos exógenos con la hormona. Ellos demostraron que la inoculación resulta en una clara disminución de la longitud de la raíz de gramíneas, pero con un aumento en la longitud y densidad de los pelos radicales presentes, con un consecuente aumento del volumen del órgano.

VI.1.1.1. La interacción *Azospirillum-Arabidopsis*.

Tal como se ha mencionado hasta el momento, las auxinas son una de las hormonas más importantes en el ciclo de vida vegetal y están implicadas en prácticamente todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Davies, 2005; Vanneste y Friml, 2009). Reportes previos, ha demostrado que *Arabidopsis thaliana*, proporciona un modelo simple y eficiente para el estudio de las interacciones entre la raíz y los cultivos de *Azospirillum* (Dubrovsky et al., 1994). Por ello, en nuestro trabajo fue de gran interés analizar el efecto de la inoculación con *A. brasilense* Az39 en plántulas de *Arabidopsis*, con el fin de dilucidar alguna posible respuesta generada por el efecto de la inoculación con esta bacteria luego de la exposición de diferentes tipos de luz. En el Capítulo IV de esta Tesis, se observó que aquellos cultivos de Az39 expuestos a luz blanca (75 W) mostraron la máxima producción de AIA en medio de cultivo Luria-Bertani (CLB); mientras que por exposición a luz azul, la biosíntesis y acumulación de esta fitohormona decrecen de manera significativa. Considerando la importancia que tienen las auxinas en las plantas y que *Azospirillum* es un modelo de rizobacteria promotora del crecimiento, debido a la producción de éste tipo de hormonas y que

la luz modifica la capacidad de esta bacteria de producir tales moléculas *in vitro*, nos resultó de sumo interés correlacionar estos resultados en un sistema biológico *in vivo*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando el tercer objetivo específico planteado en esta tesis, en este capítulo, el foco de investigación fue analizar el efecto de la inoculación con *A. brasilense* Az39 previamente expuesta a diferentes tipos de luz en plántulas de *A. thaliana*.

VI.2. Materiales y Métodos

VI.2.1. Ensayos de inoculación en *A. thaliana*

VI.2.1.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Para verificar el efecto de la inoculación con *A. brasilense* Az39 expuesto a diferentes condiciones de luz, se utilizó como modelo vegetal *Arabidopsis thaliana* (Col-0) (Dubrovsky et al., 1994). Para esto, las semillas se desinfectaron superficialmente durante 5 minutos (min) en una solución de etanol 70%, luego se removió el alcohol y se colocó en una solución de hipoclorito de sodio al 30% modificada con Tween 20 al 0.1% durante 7-10 min. Luego, se llevó a cabo el lavado de las semillas con agua destilada estéril. Posteriormente se re-suspendió en una solución de agar al 0,1% y se las incubó a 4 °C durante 3 días bajo condiciones de oscuridad para sincronizar la germinación (estratificación). Transcurrido este período, las semillas fueron sembradas en placas de Petri cuadradas (120 mm x 120 mm) conteniendo el medio Murashige Skoog al 0,8% [MS] (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 1% de sacarosa y las placas selladas con parafilm. Las placas permanecieron en posición vertical, en cámara de cultivo, durante 7 días a 22-23 °C con un fotoperíodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad. Transcurrido el tiempo, las plántulas se transfirieron asépticamente a nuevas placas de Petri cuadradas conteniendo medio MS modificado según el diseño experimental. Se colocó diez plántulas en cada placa y se incubó nuevamente de manera vertical en cámara de cultivo a 22 °C durante 4 días con un fotoperíodo de 16/8 h (luz/oscuridad). Esta metodología se realizó cada vez que se llevó a cabo un nuevo diseño experimental.

VI.2.1.2. Condiciones de cultivo de *A. brasilense* Az39

VI.2.1.2.1. Inoculación con concentraciones crecientes de células de Az39

Inicialmente, se evaluó el efecto de la inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense* Az39 en condiciones óptimas de cultivo. Para ello, se partió de una placa de Petri conteniendo colonias típicas de *A. brasilense* Az39, se tomó una colonia y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo LB (Bertani, 1951) y se llevó a incubar a cámara de cultivo durante 24 h a 36°C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial tardía (DO_{595} 1.9), se repitió este paso en un nuevo tubo con medio de cultivo LB y se llevó a incubar en cámara de cultivo en agitación hasta alcanzar un título desde 10^3 a 10^8 ufc.ml⁻¹. Transcurrido el tiempo necesario, el cultivo se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y las células fueron re-suspendidas en solución fisiológica. Posteriormente, el homogenato se mezcló con 36 ml de medio MS al 0,8% modificado con 1 % de sacarosa, para establecer el nuevo soporte de crecimiento de *A. thaliana* conteniendo la bacteria retenida en el medio de manera viable.

VI.2.1.2.2. Aplicación exógena de concentraciones crecientes de AIA en *A. thaliana*.

Una segunda estrategia experimental se relacionó con el desarrollo de una curva de titulación biológica para evaluar el efecto del AIA exógeno sobre el desarrollo radicular de *A. thaliana*. Para ello, se preparó una solución acuosa conteniendo AIA puro en una concentración final de 1000 µg.ml⁻¹. A partir de esta solución madre se tomó una alícuota y mezcló con medio de cultivo MS al 0,8 % modificado con 1 % de sacarosa, hasta alcanzar concentraciones finales de 5, 10, 15 y 25 µg.ml⁻¹ de AIA en el medio de cultivo. Así se preparó el medio MS modificado por la adición exógena de concentraciones crecientes de auxinas para evaluar el comportamiento de *A. thaliana*.

VI.2.1.2.3. Inoculación con Az39 y otras variantes genotípicas del género *Azospirillum*.

Este experimento se llevó a cabo como primera aproximación del efecto de la inoculación de variantes genotípicas del género *Azospirillum*, entre ellas bacterias deficientes en la biosíntesis de AIA y del sistema de secreción Tipo VI. Para ello, se partió de una placa de Petri conteniendo colonias típicas de *A. brasilense* Az39, *A. brasilense* Az39 (Δ hcp) deficiente en el ensamblado del sistema de secreción, *A. brasilense* Sp245 y *A. brasilense* Sp245 (FAJ0009)

deficiente en la biosíntesis de auxinas, se tomó una colonia de cada microorganismo y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo LB (Beratni, 1951). Se llevó a incubar a cámara de cultivo durante 24 h a 36°C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial (DO_{595} 1.9). Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirió 40 µl de cada pre-inóculo a un frasco conteniendo 50 ml del medio fresco LB, que nuevamente se incubó en cámara de cultivo a 36°C y oscuridad, hasta alcanzar una fase exponencial (DO_{595} aprox. 1.8) equivalente a un título de $8,5 \times 10^8$ ufc.ml⁻¹. A partir de este cultivo, se tomó una alícuota y mezcló con medio de cultivo MS al 0,8% modificado con 1% de sacarosa (36 ml de medio MS + 4 ml de cultivo de cada cepa). Posterior a este paso, se llevó a cabo el transplante de las plántulas de *A. thaliana* y se llevó a incubar a cámara de cultivo a 22°C, durante 4-5 días.

Nota: las cepas mutantes del género *Azospirillum* Δhcp y FAJ0009, se cultivaron en medio de cultivo LB modificado por la adición exógena de los antibióticos Gentamicina (50 µg.ml⁻¹) y Kanamicina (25µg.ml⁻¹), respectivamente.

VI.2.1.2.4. Efecto de la inoculación con Az39 expuesta a diferentes tipos de luz.

El objetivo de los experimentos que se detallan a continuación fue evaluar la respuesta de crecimiento radicular de *Arabidopsis thaliana* inoculada con *A. brasilense* Az39 previamente expuesta a diferentes condiciones de cultivo asociadas con la luz, como se detallan a continuación: (a) Células y sobrenadante obtenidos de cultivos puros de Az39 previamente expuestos a diferentes longitudes de onda en medio de cultivo LB y luego transferidos a medio MS previo al transplante de *A. thaliana* o (b) Células y sobrenadante obtenidos de cultivos puros de Az39 en medio LB(180 rpm, 36°C, DO_{595} 1,8), transferidos a medio MS y posteriormente expuestos a las diferentes fuentes lumínicas por 8 h previo al transplante de *A. thaliana*. A continuación se detallan cada uno de los experimentos

VI.2.1.2.4.1. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio LB

Tal como se mencionó en el Capítulo IV a nivel de la biosíntesis de AIA, el proceso resultó alterado en condiciones de cultivo *in vitro* por la exposición prolongada de *A. brasilense* Az39 a luz blanca y azul en medio LB pero ésto no se comprobó a nivel del crecimiento bacteriano

como número de células por mililitro (ufc.ml⁻¹). Teniendo en cuenta éstos resultados, se llevó a cabo un experimento de inoculación con Az39 previamente expuesta a condiciones de luz blanca (75 W), azul (PAR 38), roja (PAR 38) y oscuridad. El objetivo fue verificar si la presencia de *A. brasilense* Az39 (células) previamente expuestas a diferentes longitudes de onda o aquellas moléculas producidas por la bacteria durante su crecimiento como el ácido indol-3-acético, (AIA) y liberadas al medio de cultivo (sobrenadante), generaban cambios morfológicos comprobables en las raíces de plántulas de *A. thaliana*. Para ello, se partió de una placa de Petri conteniendo colonias típicas de *A. brasilense* Az39, se tomó una colonia y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo LB (Bertani, 1951) y se llevó a incubar a cámara de cultivo durante 24 h a 36°C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial tardía (DO₅₉₅ 1,9). Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirió 40 µl del pre-inóculo a un frasco conteniendo 50 ml del medio fresco, que nuevamente se incubó en cámara de cultivo a 36°C y oscuridad, hasta alcanzar una fase exponencial (DO₅₉₅ aprox. 1.8) equivalente a un título de 8,5 x 10⁸ ufc.ml⁻¹. A partir de este cultivo, se tomó una alícuota y se trasvasó a un frasco de 500 ml con 300 ml de medio LB estéril hasta alcanzar una DO₅₉₅ aprox. 0,1. Este cultivo se fraccionó a razón de 25 ml en placas de Petri estériles y se incubó de manera estática en cámara de cultivo bajo diferentes condiciones de exposición a la luz:

1. Oscuridad (control)
2. Luz blanca (75 W)
3. Luz roja (PAR38)
4. Luz azul (PAR38)

Después de 48 h de incubación, se llevó a cabo la separación del cultivo tal como se describió en el punto VI.2.1.2.1 y así se obtuvo las células y sobrenadantes por separado, que luego se adicionó al medio de cultivo MS.

VI.2.1.2.4.1.1. Sobrenadantes

Los sobrenadantes de los medios previamente expuestos a cada condición de luz, se diluyeron homogéneamente con medio de cultivo MS al 0,8% modificado con 1% de sacarosa, previo a la solidificación tal como se describió. Se sembró los sobrenadantes y se incubó en medio LB para verificar la ausencia del microorganismo como un control del procedimiento de

fraccionamiento del cultivo. Una vez mezclado el medio MS con el sobrenadante, se realizó el trasplante de las plántulas de *A. thaliana* y se llevó a cámara de cultivo durante 4-6 días a 22°C como se describió. Como parámetro adicional se cuantificó la concentración de AIA de cada cultivo expuesto a cada condición experimental, a través de la reacción de Salkowsky, como ya se ha detallado en esta Tesis.

V.2.1.2.4.1.2. Fracción celular

Para preparar las placas conteniendo las células separadas del medio completo, previamente expuesto a cada condición de exposición a la luz, como se describió, se diluyó homogéneamente el inóculo inicial en medio MS al 0,8% modificado con 1% de sacarosa, previo a la solidificación del medio para alcanzar una concentración final de 10^8 ufc.ml⁻¹ de medio agarizado (Ejemplo: para un volumen final de 40 ml de medio MS, se mezclaron 4 ml de inóculo inicial con 36 ml de medio). En este paso, fue muy importante mantener la temperatura del medio por debajo de los 40°C para mantener la viabilidad de la bacteria durante la suspensión en medio agarizado. Una vez mezclado el medio MS con las células de Az39, se realizó el trasplante de las plántulas de *A. thaliana* de 7 días de edad al medio MS y se llevó a cámara de cultivo durante 4-6 días a una temperatura de 22°C y fotoperíodo de 12 horas de luz, utilizando lámparas de cultivo del tipo led con una mezcla de luz roja:azul (22:6).

VI.2.1.2.4.2. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio MS

El objetivo de este experimento fue determinar si la presencia de células o moléculas con actividad biológica liberadas al sobrenadante por *A. brasilense* Az39, provenientes de un cultivo obtenido bajo condiciones controladas (180 rpm, 36°C, DO: 1,9) y adicionados al medio de cultivo MS para luego ser expuestas a diferentes longitudes de onda, podrían generar un cambio morfológico comprobable en las raíces de plántulas de *A. thaliana*. Para ello, se partió de una placa de Petri conteniendo colonias típicas de *A. brasilense* Az39, se tomó una colonia y se colocó en un tubo de ensayo conteniendo medio de cultivo LB (Bertani, 1951) y se llevó a incubar a cámara de cultivo durante 24 h a 36°C en condiciones de oscuridad hasta alcanzar una fase de crecimiento exponencial tardía (DO₅₉₅ 1.9). Transcurrido el tiempo de incubación, se transfirió 40 µl del pre-inóculo a un frasco conteniendo 50 ml del medio fresco, que nuevamente se incubó en cámara de cultivo a 36°C y oscuridad, hasta alcanzar una fase

exponencial (DO_{595} aprox. 1.8) equivalente a un título de $8,5 \times 10^8$ ufc.ml⁻¹. A partir de este cultivo se llevó a cabo la separación del cultivo tal como se describe en el punto VI.2.1.2.1 y se adicionó al medio de cultivo MS.

VI.2.1.2.4.2.1. Sobrenadantes

A partir de cultivos obtenidos en fase exponencial de crecimiento, se separó el sobrenadante como se describió en V.2.1.2.1. Los sobrenadantes se diluyeron homogéneamente en placas plásticas conteniendo medio de cultivo MS al 0,8% modificado con 1% de sacarosa. Los sobrenadantes se sembraron e incubaron en medio LB para verificar la ausencia del microorganismo como se describió. Las placas conteniendo el medio MS modificado por la incorporación de los sobrenadantes de cultivos de Az39 fueron mantenidos en cámara de cultivo y expuestos a las diferentes longitudes de onda:luz blanca [LB], azul [LA] y roja [LR] o mantenidos en condiciones de oscuridad [O] durante 8 h. Transcurrido el tiempo de exposición, se realizó el transplante de las plántulas de *A. thaliana* de 7 días de edad y las placas se llevaron a una cámara de cultivo durante 4-6 días y en las condiciones previamente descritas. En todos los casos se utilizaron como tratamientos control medio MS modificado por la adición de volúmenes equivalentes de agua destilada estéril o medio de cultivo rico LB debido a que los cultivos y Az39 se obtuvieron utilizando este medio.

VI.2.1.2.4.2.2. Fracción celular

A partir de cultivos en fase exponencial, se separó las células tal como se describió en VI.2.1.2.1 y se diluyó homogéneamente en el medio MS al 0,8% modificado con 1% de sacarosa, para alcanzar una concentración final de 10^8 ufc.ml⁻¹ (Ejemplo: para un volumen final de 40 ml de medio MS, se mezclaron 4 ml de inóculo inicial con 36 ml de medio). En este paso, fue muy importante mantener la temperatura del medio por debajo de los 40°C para mantener la viabilidad de la bacteria durante la suspensión en medio agarizado. Luego las placas inoculadas fueron mantenidas en cámara de cultivo con exposición a una de las diferentes longitudes de onda utilizadas en este trabajo: luz blanca [LB], azul [LA], roja [LR], en relación a un control mantenido en condiciones de oscuridad [O]) durante 8 h. Transcurrido el tiempo de exposición, se realizó el transplante de las plántulas de *A. thaliana* de 7 días de

edad y las placas se llevaron a una cámara de cultivo durante 4-6 días y en las condiciones previamente descritas.

VI.2.2. Análisis estadístico

Para la interpretación de los datos se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) y un Test HSD Tukey, con un nivel de confianza del 95%. Los análisis se realizaron mediante el software InfoStat-Statisticaly. Las gráficas fueron desarrolladas empleando el software GraphPad Prism 5.0.

VI.3. Resultados

VI.3.1. Evaluación del crecimiento de *A. thaliana* en medio MS

Para estudiar las repuestas generadas por plántulas de *A. thaliana* en diferentes condiciones experimentales, uno de los métodos utilizados es la inducción de la germinación y la evaluación del crecimiento temprano en medio MS modificado por la adición de un factor exógeno o un tratamiento biológico. En este caso, se observa el crecimiento de *A. thaliana* en medio MS modificado por la adición de concentraciones (ufc.ml^{-1}) crecientes de *A. brasilense* Az39 en el medio de cultivo, lo que se compara con el proceso de inoculación de plántulas o semillas germinadas.

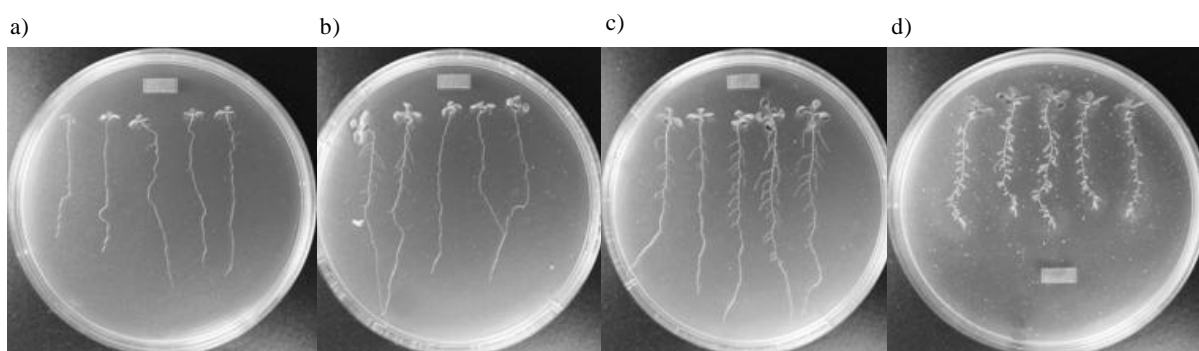


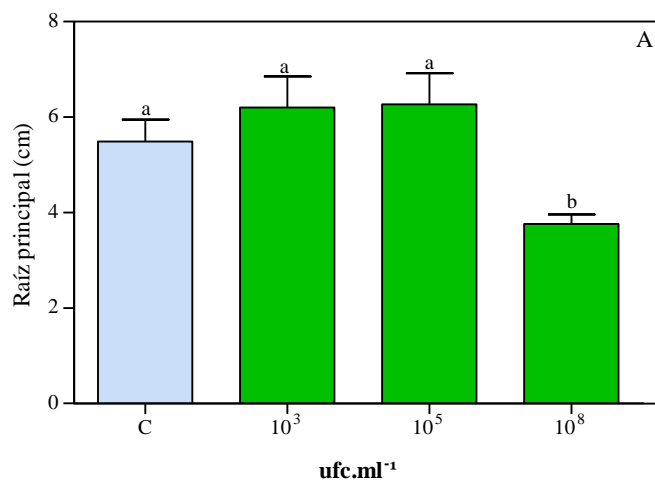
Figura 57. Plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS (a) y en medio de cultivo MS modificado por la adición de 10^3 (b), 10^6 (c) y 10^8 ufc.ml^{-1} (d) de Az39 durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C.

Tal como se observa en la Figura 57 (d), aquellas plántulas crecidas en el medio MS modificado con una concentración de 10^8 ufc.ml^{-1} de Az39 presentaron un acortamiento

significativo de la longitud de la raíz principal; mientras que aquellas que crecieron en el medio modificado con concentraciones inferiores de la bacteria (10^3 y 10^6 ufc.ml⁻¹), presentaron un mayor número de raíces secundarias, sin embargo la longitud de la raíz principal, fue semejante a la de aquellas plántulas crecidas en medio de cultivo MS sin inocular con Az39 (control). Durante el desarrollo de esta Tesis, y luego de numerosos ajustes experimentales, se utilizó esta variante metodológica, basada en germinar las semillas en el medio de cultivo MS sin modificar, es decir pre-germinar las semillas en medio MS durante 5-7 días en condiciones óptimas y transcurrido este período de tiempo, las plántulas se transplantan a una nueva placa conteniendo medio MS modificado con la incorporación de la bacteria. A continuación se observa en la Figura 58, el desarrollo de la raíz principal y el número de raíces laterales de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado por diferentes cantidades de células de Az39, las cuales previamente germinaron en medio de cultivo MS y posteriormente fueron transplantadas.

VI.3.1.1. Inoculación con concentraciones crecientes de células de Az39

El objetivo de este experimento fue determinar si existe una alteración en el desarrollo radicular en plántulas de *A. thaliana* creciendo en contacto con células de Az39 sin tener en cuenta la exposición previa de la bacteria a la luz.



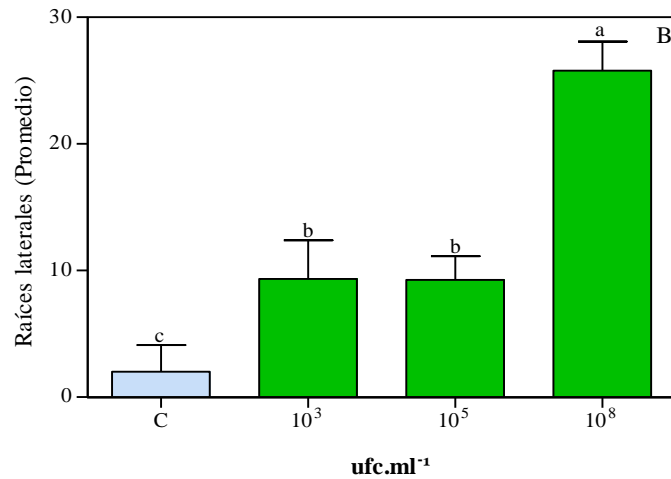


Figura 58. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de *A. thaliana* en medio MS modificado por la inoculación con diferentes concentraciones de Az39 y cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar y las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como muestra la Figura 58 (A) la longitud de la raíz principal de las plántulas crecidas en medio MS modificado por la máxima cantidad aportada de células de Az39 (10^8 ufc.ml⁻¹), fue menor con respecto a la que alcanzó en condiciones controladas (sin la adición de Az39). Por otro lado, en aquellas plántulas crecidas en medio MS modificado por el agregado de cantidades menores de células (10^3 y 10^6 ufc.ml⁻¹), la longitud de la raíz principal fue similar a la del tratamiento control. Esto se debe a que al realizar el trasplante, las plántulas presentan una longitud radicular, que solo es drásticamente modificada por la mayor concentración de la bacteria, dentro del tiempo de duración del ensayo (momento definido por el diámetro de la placa y el máximo crecimiento radical). En la Figura 58 (B), se observa el número de raíces laterales, parámetro que aumentó de manera creciente en una relación de dosis-respuesta. A medida que aumentó la concentración de células (10^8 ufc.ml⁻¹) en el medio MS, se produjo un aumento del número de raíces laterales; mientras que en concentraciones menores (10^4 y 10^5 ufc.ml⁻¹), no se observó diferencias estadísticamente significativas entre sí, pero sí con

respecto al control sin inocular, tratamiento en el que se observó el menor número de raíces laterales.

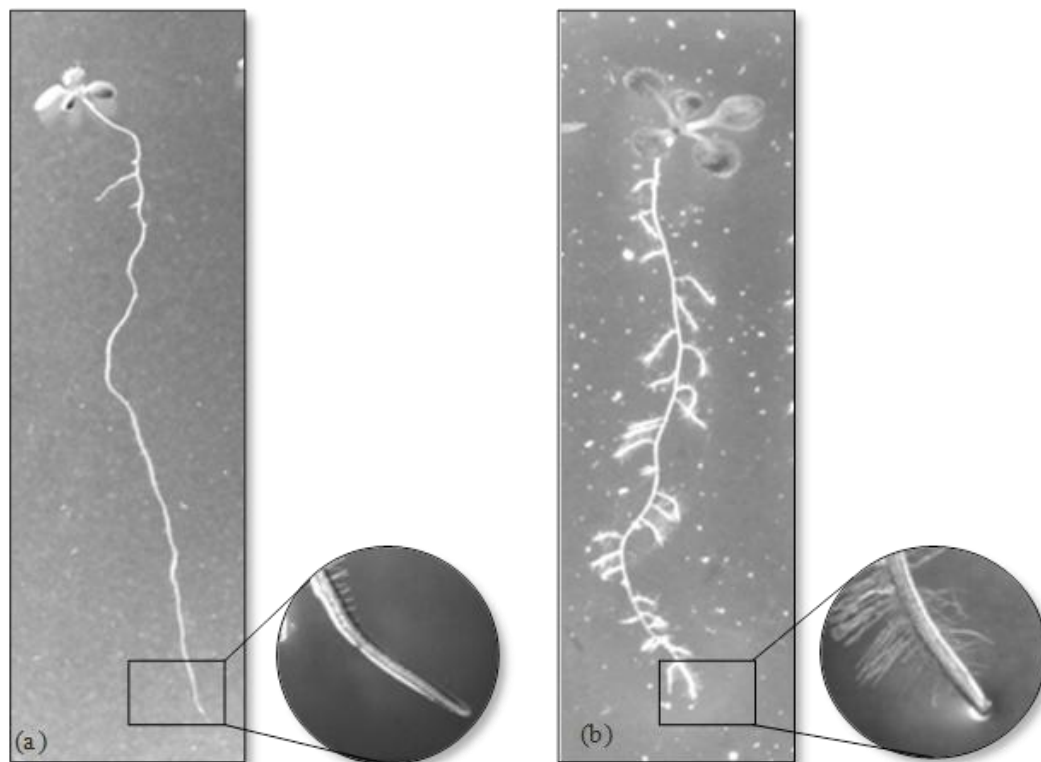


Figura 59. Incremento en el número de raíces laterales y pelos radiculares en diferentes condiciones de crecimiento de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS [control] (a) y en medio de cultivo MS modificado por la adición 10^8 ufc.ml⁻¹ de Az39 (b) cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C.

VI.3.1.2. Inoculación con concentraciones crecientes de AIA en el medio MS

Tal como se mencionó, se llevó a cabo este experimento para correlacionar el efecto observado en plántulas de *A. thaliana* en presencia de diferentes concentraciones de AIA con lo observado en presencia de concentraciones crecientes de células de Az39 como describió Spaepen et al. (2009) utilizando el modelo biológico de trigo. A continuación en la Figura 60 se observa el desarrollo radicular de la raíz principal y número de raíces laterales.

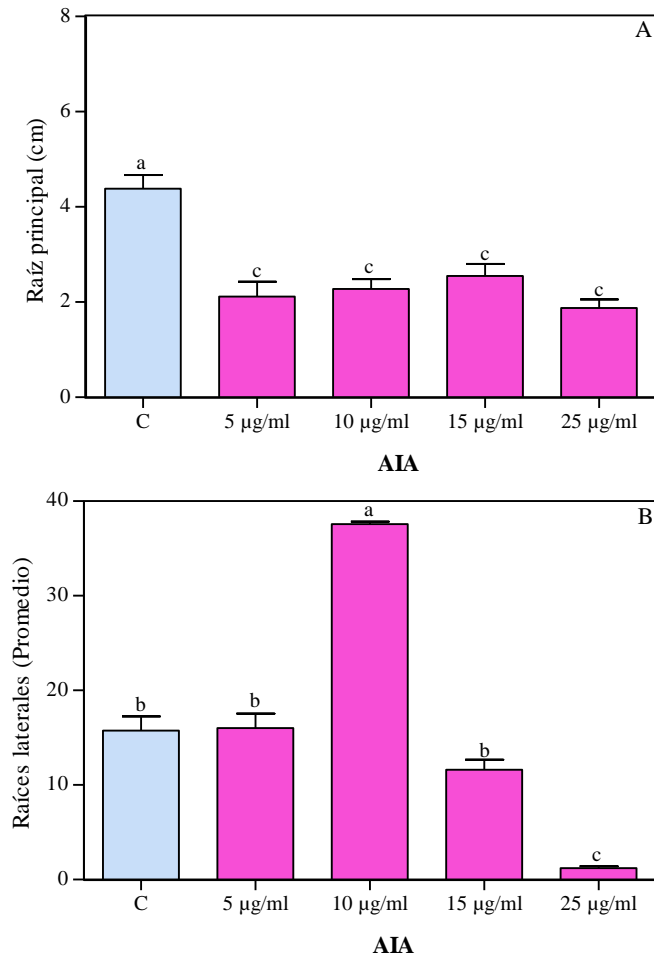


Figura 60. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado por la adición exógena de diferentes concentraciones de ácido indol-3-acético (AIA) y cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 60 (A), la longitud de la raíz principal de las plántulas crecidas en medio de cultivo MS sin modificar (control) fue mayor que en aquellas crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición exógena de AIA. De manera general, los tratamientos modificados con la adición exógena de la hormona, en cualquier concentración, mostraron una longitud de la raíz principal inferior al control sin tratar. El comportamiento de las plántulas debido a la presencia de la hormona fue similar y no mostró diferencias estadísticamente

significativas entre sí, independientemente de la concentración adicionada. Por el contrario, en la Figura 60 (B), se observa que el número de raíces laterales desarrolladas en las plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de AIA tuvo una respuesta dependiente de la concentración. En el tratamiento con adición de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA la cantidad de raíces secundarias fue superior con respecto al control, en el que las plántulas mostraron un comportamiento similar a aquellas crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de 5 y $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. En presencia de $25 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA, se observó el menor número de raíces laterales, lo que supone un efecto de inhibición de la respuesta.

A modo ilustrativo, se realizó una comparación a nivel del aumento del número de raíces laterales de *A. thaliana* en presencia de concentraciones crecientes de la bacteria (10^4 - 10^8 ufc. ml^{-1}) y de la hormona (5-25 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ AIA). De tal comparación, se pudo estimar el efecto fitoestimulador mediado por AIA de *A. brasilense* Az39 en raíces laterales de *A. thaliana*. En la Figura 61 se observa el promedio de raíces laterales de *A. thaliana* crecidas en medio MS modificado por la adición de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA y 10^8 ufc. ml^{-1} de Az39, tratamientos que mostraron una respuesta similar sobre la planta.

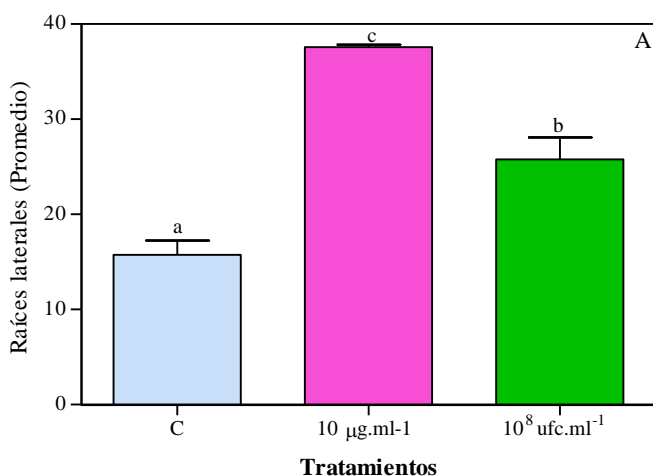
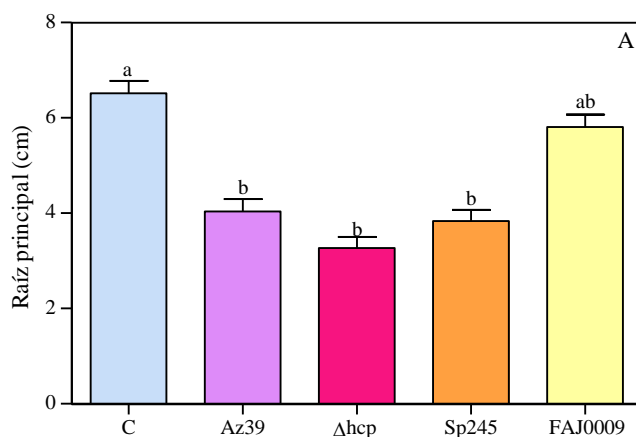


Figura 61. Promedio de raíces laterales de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado por la adición exógena de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA y 10^8 ufc. ml^{-1} y cultivadas por 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a $22 \text{ }^\circ\text{C}$. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tal como se observa en la Figuras 59 y 60 y se resume en la Figura 61, las plántulas tratadas con $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de AIA o 10^8 ufc.ml^{-1} de Az39, presentaron el mayor número de raíces laterales, en comparación con los demás tratamientos, incluyendo el control. La máxima concentración de células adicionadas al medio MS y la adición de $10 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de AIA, fueron los tratamientos en los que se determinó el mayor número de raíces laterales.

VI.3.1.3. Efecto de la inoculación con Az39 y variantes genóticas de *Azospirillum*

A partir de los resultados observados hasta el momento, se consideró útil utilizar variantes genóticas del género *Azospirillum* para poner de manifiesto mediante el sistema experimental el efecto de la inoculación de microorganismos cuyas determinadas funciones metabólicas se encuentran alteradas. En el caso de la cepa mutante de Az39 Δhcp , la cual como ya se dijo anteriormente, presenta una alteración genética a nivel del gen correspondiente de la expresión del sistema de secreción tipo VI, mientras que la cepa Sp245 FAJ0009, carece de la capacidad para producir AIA, ya que presenta una mutación a nivel del gen *ipdC* gen clave para la biosíntesis de esta hormona. A continuación, se observa en la Figura 62, el efecto de la inoculación con las variantes genóticas y la cepa Sp245 wt a nivel de desarrollo radicular, tanto raíz principal como raíces laterales.



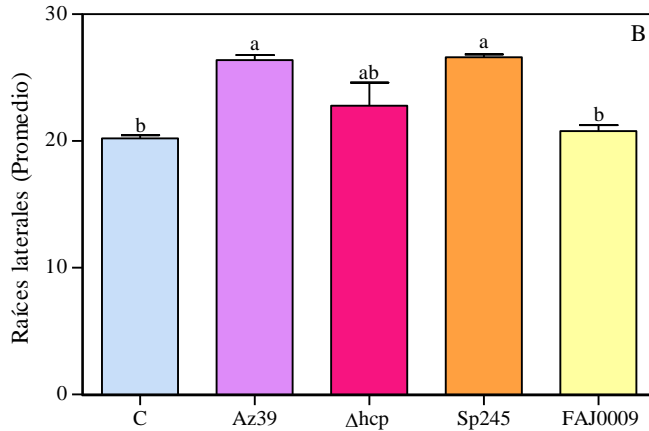


Figura 62. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado por la adición exógena de diferentes cepas de Az39, y cultivadas durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se puede observar en la figura 62, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la longitud de la raíz principal (cm) cuando se inoculó con *A. brasilense* Az39, Δ hcp, Sp 245 y FAJ0009 (A), es decir en todos los casos la longitud de este órgano, fue menor al control llevado a cabo en medio MS con agua. Por otro lado, aquellas plántulas que crecieron expuestas a las cepas Az39 y Sp245 mostraron un incremento del número de raíces laterales con respecto al control de alrededor del 30%; comportamiento similar se obtuvo en aquellas plántulas de *Arabidopsis* que crecieron expuesta a la cepa Δ hcp, las cuales presentaron una menor cantidad de raíces laterales, con respecto a aquellas crecidas en presencia de Az39 y Sp245, de alrededor del 18,5%, sin embargo esta diferencia no fue estadísticamente significativa. Por último, aquellas plántulas crecidas con la cepa FAJ0009, mostraron el menor número de raíces laterales, comportamiento que fue similar al control.

VI.3.1.4. Inoculación de *A. thaliana* con *A. brasilense* Az39

Teniendo en cuenta que el sistema experimental llevado a cabo durante esta Tesis, permitió poner de manifiesto el efecto de la inoculación con *Azospirillum* o de la presencia de moléculas con actividad biológica como el AIA en plántulas de *Arabidopsis*, se realizó dos

experimentos para corroborar si el efecto de la luz en la bacteria o sobre la producción o concentración de ésta fitohormona podían modificar su interacción con la planta.

VI.3.1.4.1. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio LB

Los resultados presentados en este apartado, se relacionan con la inoculación de plántulas de *A. thaliana* con fracciones de cultivos de *A. brasilense* Az39 (células + sobrenadante) previamente expuestos a diferentes longitudes de onda en medio LB. Tras adicionar las células expuestas a las diferentes longitudes de onda al medio de cultivo MS no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos a nivel del desarrollo radicular (ej. longitud de la raíz principal y número de raíces laterales), cuando las células provenían de cultivos expuestos luz blanca, azul y roja, en comparación al control mantenido en condiciones de oscuridad. Tal como se observa, en la Figura 63, se observa el efecto en *Arabidopsis* creciendo en MS modificado por la adición de sobrenadante proveniente de cultivo de Az39 expuesto a diferentes longitudes de onda. Además de adicionar una alícuota de sobrenadante al medio MS, una fracción se utilizó para la evaluación de la concentración de AIA de los medios expuestos a tales condiciones experimentales. A continuación, en la Figura 63 se observa la concentración de AIA en el sobrenadante luego de 48 h de exposición en cada longitud de onda.

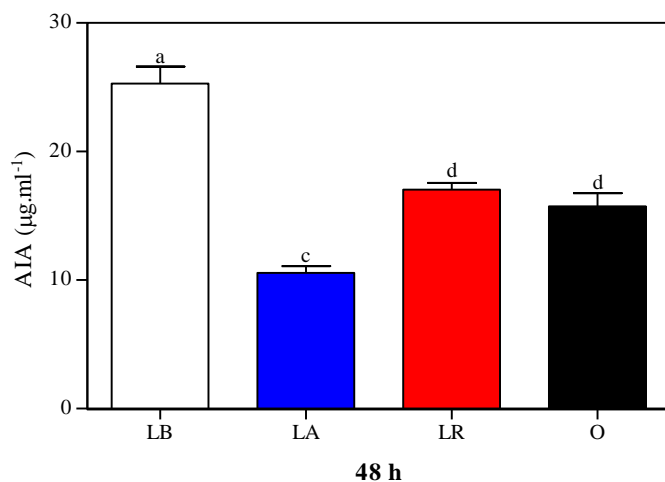
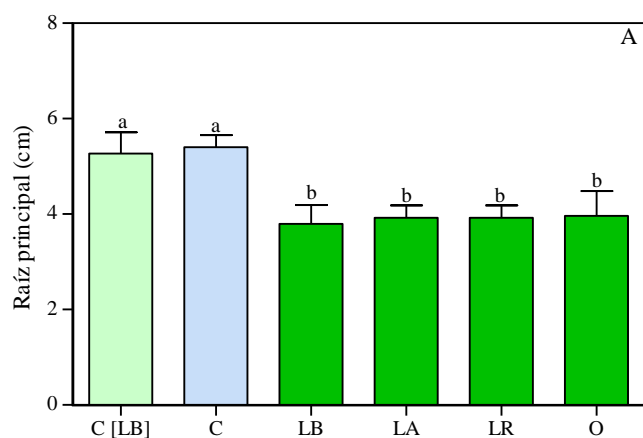


Figura 63. Evaluación de la síntesis de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en *A. brasilense* Az39 en medio de cultivo líquido LB expuesto a diferentes condiciones de luz: blanca o LB (75 W); azul o LA (PAR 38); roja o LR (PAR 38) y oscuridad (O) durante 48 h. En todos los casos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 36 °C y una distancia a la fuente lumínica

de 22,5 cm. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Tal como se observa en la Figura 63, la concentración de AIA producida por Az39 luego de 48 h de cultivo expuesto a diferentes longitudes de onda fue superior en presencia de luz blanca comparado al control, mientras que en condiciones de exposición a luz azul fue la condición en la que se detectó la menor concentración de AIA liberada al medio luego de 48 h de exposición. Por último, en luz roja, la concentración de AIA medida fue similar a la producida en condiciones de oscuridad.

Luego de confirmar la concentración de AIA liberada por la bacteria al sobrenadante como consecuencia a la exposición a cada longitud de onda, se prosiguió con la modificación del medio MS utilizando éstos sobrenadantes y las células de cada tratamiento. En ambos casos, se incluyó dos tratamientos control, uno consistente en la adición de agua y otro modificado por el agregado de medio LB sin inocular al medio MS. A continuación se observa en la Figura 64 el promedio de la longitud de la raíz principal (A) y de raíces laterales de plántulas de *A. thaliana* (B) crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de sobrenadantes de cultivos expuestos a luz blanca, luz azul y luz roja.



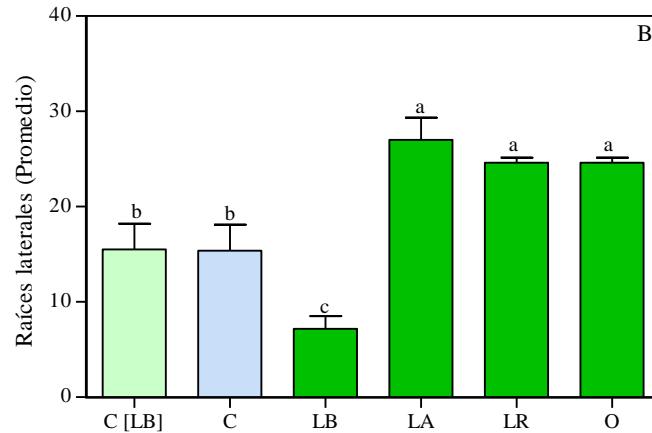


Figura 64. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]) , medio de cultivo MS control (C), sobrenadantes de cultivos expuestos a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y sobrenadante mantenido en condiciones de oscuridad (O) durante 48 horas. Cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C, durante 4-6 h. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 64 A, la longitud de las raíces principales de las plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de sobrenadantes provenientes de cultivos previamente expuestos a diferentes longitudes de onda y en oscuridad (LB, LA, LR, O) fue menor a la longitud de la raíz principal de plántulas crecidas en ambos controles (C [LB] y C) en un 27,5%. La longitud de la raíz principal de ambos controles no mostró diferencias estadísticamente significativas entre sí, al igual que la longitud de las plántulas crecidas con cualquiera de los sobrenadantes, no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí. Por otro lado en la Figura 64 B el número de raíces laterales fue menor en aquellas plántulas crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de sobrenadante proveniente de un cultivo expuesto previamente a luz blanca (LB) siendo esta diferencia de alrededor de un 50% inferior a los valores observados en ambos controles, mientras que en los demás tratamientos llevados cabo por la adición de sobrenadante proveniente de cultivos expuestos previamente a luz azul, roja y mantenido en condiciones de oscuridad (LA, LR y O) no se observó diferencias entre sí pero con respecto al tratamiento llevado a cabo con sobrenadante expuesto a luz blanca, si fueron diferentes

estadísticamente significativas y superiores en un 30%. En general, la longitud de la raíz principal de las plántulas crecidas en ambos controles, mostraron un incremento en la longitud de las raíces principales, mientras que los sobrenadantes indujeron un acortamiento de éste órgano. Por otro lado, las plántulas crecidas en presencia de sobrenadantes obtenidos bajo la exposición a luz azul, roja y oscuridad, manifestaron un aumento en el número de raíces laterales comparado a los controles (C [LB] y C), mientras que en luz blanca, se observó la menor cantidad de raíces laterales. Esta respuesta en *Arabidopsis*, y de acuerdo a los resultados observados en condiciones de cultivo *in vitro*, permite inferir que el AIA y quizás otras moléculas liberadas al medio, aún no dilucidadas, serían las responsables de dicho efecto al nivel radicular.

A continuación se observan las imágenes de la arquitectura radicular alcanzada en las plántulas de *A. thaliana* en tales condiciones experimentales

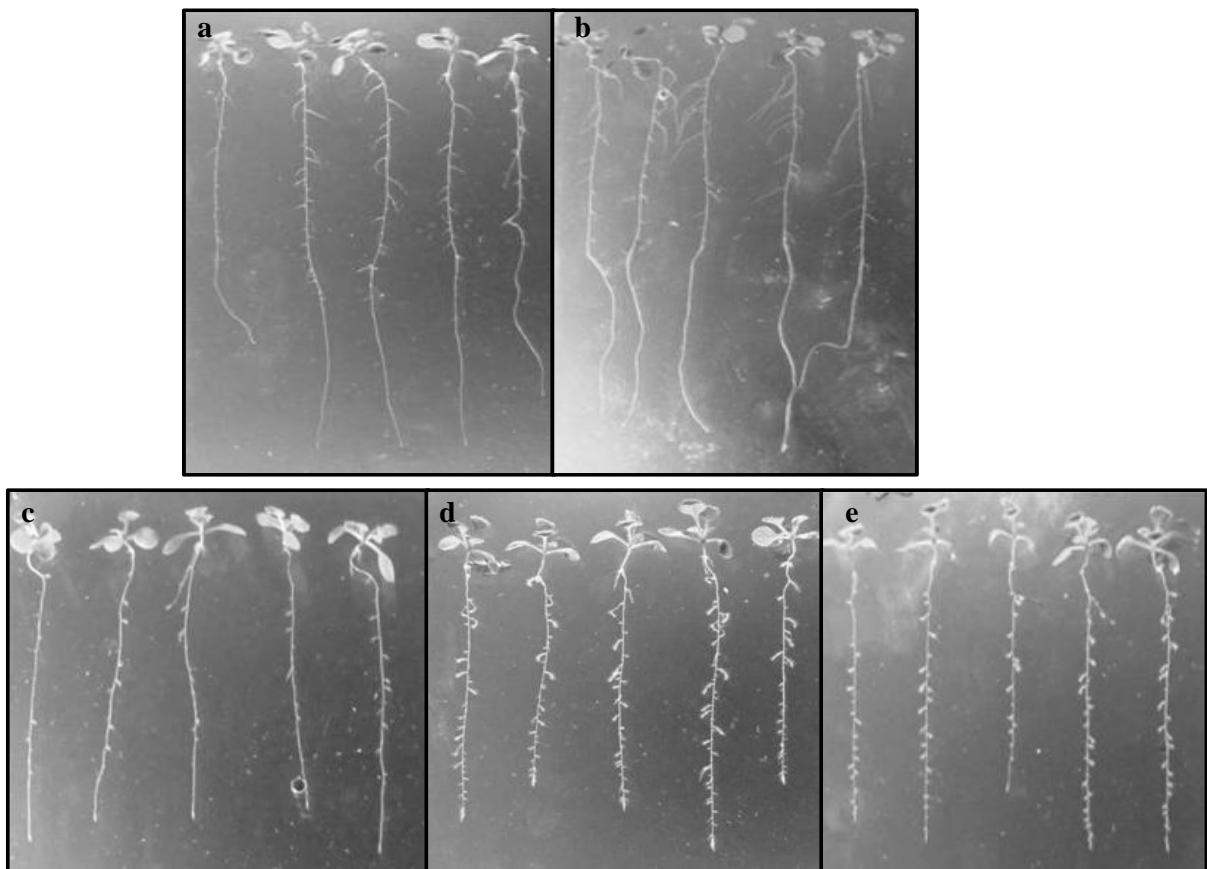
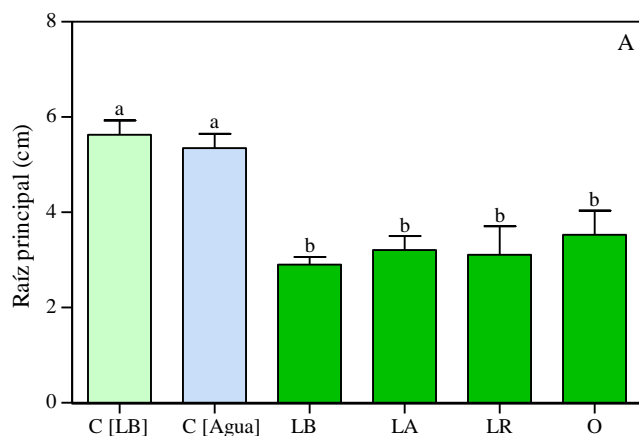


Figura 65. Plántulas de *A. thaliana*, crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de medio de cultivo LB estéril (a), medio de cultivo MS [control] (b), sobrenadantes

de cultivos expuestos a luz blanca (c), luz azul (d) y luz roja (e) durante 48 horas. Cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C, durante 4-6 días. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se puede observar en la Figura 65, la longitud de las raíces principales de las plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio de cultivo MS modificado por la adición de sobrenadantes provenientes de cultivos previamente expuestos a diferentes longitudes de onda (c, d, y e), fue menor que la longitud de la raíz principal de plántulas crecidas en ambos controles realizados con LB (C [LB] y C [agua]) (a y b). Por otro lado el número de raíces laterales, fue menor en las plántulas crecidas en medio de cultivo MS modificado con sobrenadante proveniente de un cultivo expuesto previamente a luz blanca durante 48 h (c), en cambio, en las plántulas, crecidas en medio MS mas sobrenadante de cultivo previamente expuesto y crecido en luz azul, roja y oscuridad, no mostraron diferencias entre sí con respecto al número de raíces laterales (d y e)

A continuación se observa el efecto de la inoculación con células de Az39 previamente crecidas en medio de cultivo LB durante 48 h a las diferentes longitudes de onda



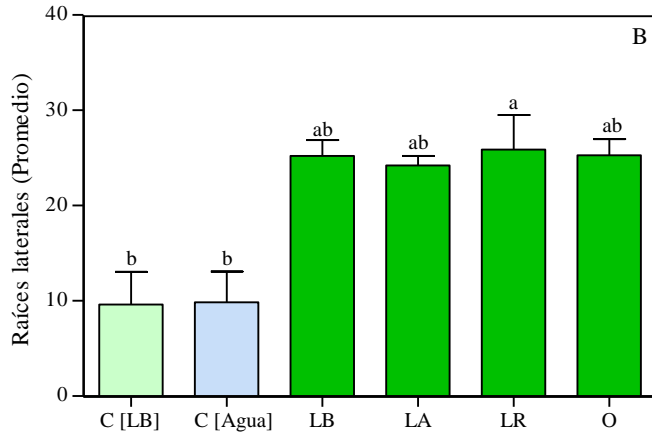


Figura 66. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]) , medio de cultivo MS control (C), células de cultivos expuestos a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y sobrenadante mantenido en condiciones de oscuridad (O) durante 48 horas. Cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C, durante 4-6 días. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas ($p < 0,05$).

Como se mencionó anteriormente y como se observa en la Figura 66, no se observó diferencias estadísticamente significativas a nivel radicular (ej: raíz principal y número de raíces laterales) cuando se inoculó con células provenientes de cultivos, crecidos en medio LB y expuestos a diferentes longitudes de onda durante 48 h. A partir de estos resultados, se puede destacar, que en presencia de la bacteria o del sobrenadante, aumentó el número de raíces laterales, a diferencia de lo que se observó en los controles con LB y agua (C [LB] y C, respectivamente). En concordancia a los antecedentes descritos con respecto al efecto auxínico producido a nivel radicular, se observó una disminución en el número de raíces laterales en aquellas plántulas crecidas en medio MS mas sobrenadante obtenido de cultivo expuesto durante 48 h a luz blanca (tiempo en el que se detectó la máxima producción de AIA). Así mismo, la adición de células al medio MS, indujo un aumento de pelos laterales con respecto a los controles, aunque estas respuestas no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la procedencia de las células, es decir, a que fuente luminosa o condición de cultivo estuvieron expuestas.

VI.3.1.4.2. Exposición de Az39 a diferentes longitudes de onda en medio MS

Los resultados presentados en este apartado, se basan en la inoculación de plántulas de *A. thaliana* con fracciones de un cultivo de *A. brasilense* Az39 (células o sobrenadantes) en fase exponencial. Para ello, a partir de un cultivo en fase exponencial, se obtuvo células y sobrenadantes tal como se describió en V.2.1.2.4.2.1 y V.2.1.2.4.2.2 y se adicionaron al medio MS. Posteriormente, éstas placas fueron expuestas a diferentes longitudes de onda durante 8 h para luego llevar a cabo el transplante de plántulas de *A. thaliana* de 5 días de edad, como se describió.

VI.3.1.4.2.1. Exposición de 8 h a diferentes longitudes de onda

A continuación en la Figura 67 se observa a nivel del desarrollo radicular (ej. longitud de la raíz principal y número de raíces laterales) la respuesta por parte de las plántulas de *A. thaliana* luego de crecer en placas con medio MS que previamente fue modificado por la adición de sobrenadante y expuesto a luz blanca [LB], luz azul [LA], luz roja [LR] y en condiciones de oscuridad [O] durante 8 h, previo al transplante de plántulas

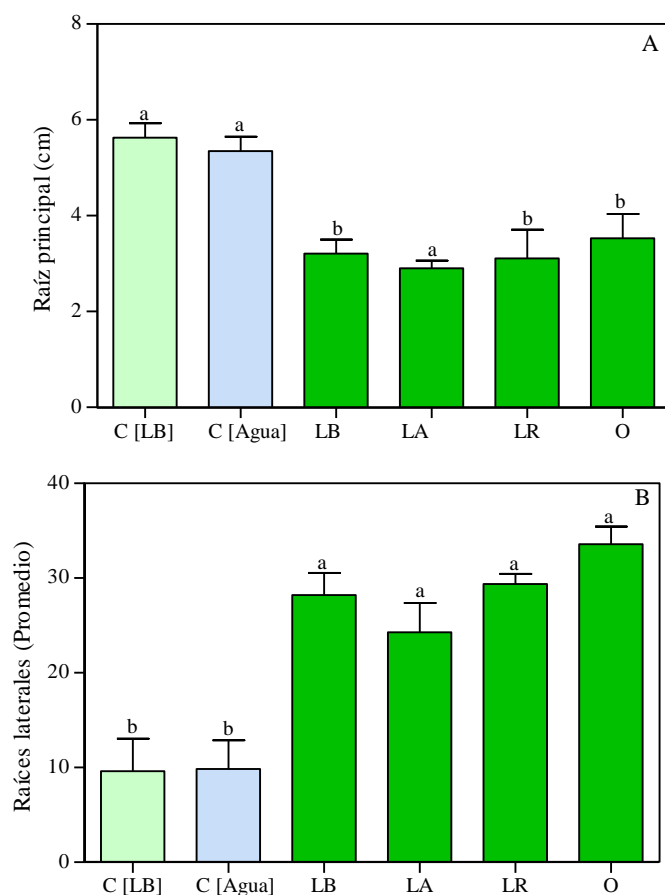


Figura 67. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]) , medio de cultivo MS control (Agua), MS modificado por la adición de sobrenadante y expuesto a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y en condiciones de oscuridad (O), durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

Como se observa en la Figura 67 A, la longitud de la raíz principal de las plántulas de *A. thaliana* crecidas en medio MS con sobrenadante de Az39 y expuesta a las diferentes longitudes de ondas durante 8 h previo al transplante de plántulas, fue menor en aquellas plántulas crecidas en MS expuesto a luz azul en un 10,5 %, siendo esta diferencia estadísticamente significativa con los demás tratamientos. Los controles con LB y agua, mostraron plántulas, cuya raíz principal fue de mayor longitud en alrededor 43,5%, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre si. Por otro lado, en la Figura 67 B, se observó el menor número de raíces laterales en ambos controles con respecto a los tratamientos en luz de alrededor del 50%, mientras que en MS expuesto durante 8 h a luz azul, mostró una leve diferencia con respecto a las plántulas crecidas en MS expuesto a luz blanca, roja y en condiciones de oscuridad, aproximadamente del 8%. Estos resultados, permiten inferir, que determinadas moléculas podrían resultar afectadas por la luz azul, como se pudo observar en el Capítulo IV.

A continuación se observa el desarrollo radicular de plántulas de *Arabidopsis* en medio MS con la bacteria y expuesto durante 8 h a diferentes longitudes de onda.

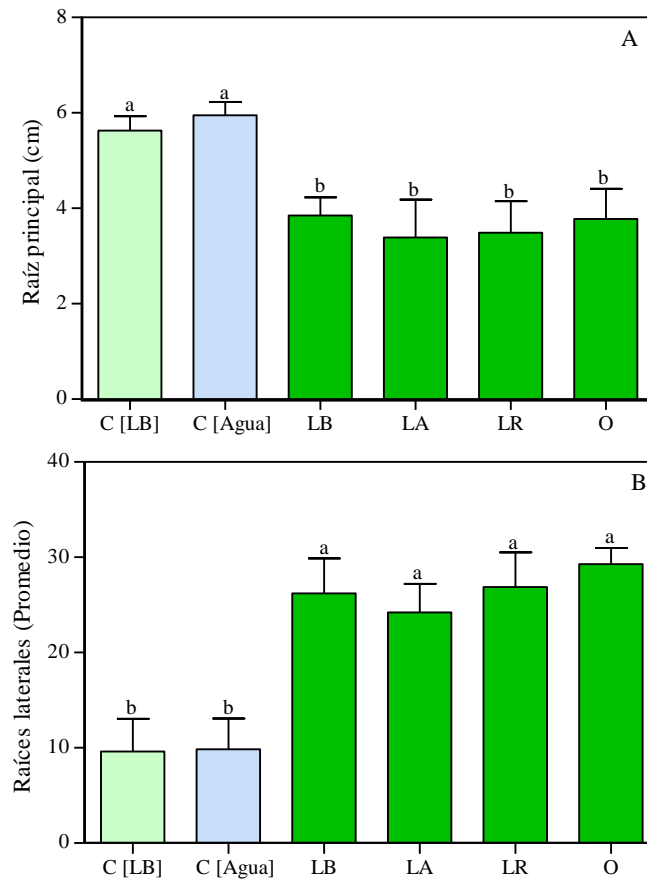


Figura 68. Longitud de la raíz principal (A), número de raíces laterales (B) de plántulas de *A. thaliana* en medio de cultivo MS modificado con LB estéril (C [LB]), medio de cultivo MS control (Agua), MS modificado por la adición de la bacteria y expuesto a luz blanca (LB), luz azul (LA), luz roja (LR) y en condiciones de oscuridad (O), durante 4-6 días en cámara de cultivo 16/8 h (luz/oscuridad) a 22 °C. Las barras corresponden a la media \pm el desvío estándar. Las letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,05$).

En la Figura 68 A, se observa que las plántulas crecidas en MS expuesto a las diferentes luces desarrollaron una longitud de la raíz principal menor en alrededor del 27 % con respecto a los controles (LB y agua). La exposición a las diferentes longitudes de onda de las bacterias en medio MS, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos cuando las plántulas crecieron en estas condiciones. Por último, en la figura 68 B, se observó que el número de raíces laterales aumentó en todas las plántulas crecidas en medio de cultivo MS

previamente expuesto a las diferentes luces (comportamiento similar entre los tratamientos) con respecto a los controles, siendo estos últimos inferiores en alrededor del 50%.

VI.4. Discusión

Para este trabajo de Tesis se seleccionó *A. thaliana* como modelo de estudio debido a que las plántulas de esta especie proporcionan un modelo simple y eficiente para la comprensión de la interacción *Azospirillum*-huésped (Dubrovsky et al., 1994). En nuestros experimentos, la adición de cantidades variables de células de Az39 en el medio de cultivo, determinó un acortamiento de la longitud de la raíz principal, como la respuesta más significativa a la presencia del microorganismo. Estas observaciones coinciden con reportes previos de Doblereae et al., (1999) y Spaepen et al., (2014) en los que se informó que la inoculación con *A. brasilense* Sp245 redujo la longitud de la raíz primaria de trigo, de manera directamente proporcional a la concentración de bacterias inoculadas (10^8 ufc.ml⁻¹). En nuestros experimentos, el número de raíces laterales aumentó proporcionalmente en relación al número de células de Az39 adicionadas en el medio de cultivo. Las plántulas crecidas en medio MS modificado por la adición de 10^8 ufc.ml⁻¹ presentaron un mayor número de raíces laterales. Estos resultados concuerdan con los de Doblereae et al., (1999) y Spaepen et al., (2009 y 2014) quienes informaron que la inoculación con *A. brasilense* Sp245 alteró la arquitectura de la raíz de plantas de trigo y *A. thaliana* respectivamente, al aumentar el número de raíces laterales y la elongación de los pelos radiculares, lo que presumiblemente aumentó la superficie radicular. Por otro lado, se han reportado un número significativo de trabajos para los que la inoculación con *Azospirillum* resulta en un aumento del número y densidad de pelos radiculares (Tien et al., 1979; Jain y Patriquin, 1984; Hadas y Okon, 1987; Morgenstern y Okon, 1987; Barbieri et al., 1991). De acuerdo a lo observado en este trabajo de Tesis, se podría decir que un elevado número de células de Az39 producen el máximo acortamiento de la raíz principal y el mayor incremento del número de raíces laterales en plántulas de *A. thaliana*, en comparación a concentraciones menores y que estos cambios son significativos cuando se comparan con las plantas sin inocular.

Durante décadas, los cambios morfológicos de las raíces de plantas inoculadas con *Azospirillum* fueron atribuidos a la producción bacteriana de fitohormonas y entre ellas principalmente al AIA. Estudios con mutantes de *A. brasilense* deficientes para la biosíntesis

de ésta hormona, han permitido confirmar el importante papel de las auxinas bacterianas en la expresión de la promoción del crecimiento vegetal (Spaepen y Vanderleyden, 2011). Hace más de 20 años que Costacurta et al., (1994) demostraron que las alteraciones en la arquitectura de raíces de trigo que normalmente se observaban por la inoculación con *A.brasilense* Sp245 casi se anulaban por la inoculación con la mutante FAJ0009, deficiente en la biosíntesis de la hormona. Entre los resultados mostrados en este Capítulo, se observó que las plántulas inoculadas con FAJ0009, presentaron un promedio de raíces laterales inferior en comparación con aquellas inoculadas con Az39, Sp245 y el mutante para el sistema de secreción Tipo VI (Δhcp), estos resultados son coincidentes con los reportados por Spaepen et al., (2014) para la misma cepa en *A.thaliana* Este resultado permitiría confirmar que la biosíntesis de AIA podría ser uno de los mecanismos que intervendrían en la respuesta al desarrollo de la raíz principal por esta bacteria en *A. thaliana*. Si bien se podría confirmar que el AIA estaría involucrado en este proceso, no es posible descartar la hipótesis de que la célula bacteriana o alguno de sus componentes celulares o algún otro tipo de molécula producida por la bacteria durante su crecimiento y liberada en el medio de cultivo, podrían modificar el desarrollo radicular, ya que en todos los casos, la presencia del microorganismo *per se* determinó un efecto de acortamiento de la raíz principal y aumento del número de raíces laterales, independientemente de la condición de cultivo adicionado (ej. expuesto o no expuesto a luz).

Con el fin de asociar el efecto de la luz sobre la bacteria, la biosíntesis de AIA y su impacto en la capacidad para promover el crecimiento radical de *A thaliana*, se hizo una analogía con los resultados obtenidos de experimentos preliminares de aplicación exógena de AIA a plántulas de *A. thaliana* (Figura 60) y otros en los cuales se evaluó el comportamiento de Az39 en medio MS pero previamente expuesto a la luz en medio LB (Figura 64 y 66). En los primeros se observó que determinadas concentraciones de la hormona provocaban el típico efecto hormonal de acortamiento de la raíz principal pero aumento del número de raíces laterales; sin embargo las mayores concentraciones de la hormona (algunas ampliamente superiores a las producidas por *Azospirillum* en medio de cultivo), producían un efecto de inhibición del crecimiento radicular a nivel del número de raíces laterales. Así, concentraciones equivalentes a las producidas por la bacteria en medio de cultivo presentaban un efecto equivalente al de la inoculación. En el caso de los cultivos bacterianos expuestos a la luz, se observó que en

condiciones de exposición a luz blanca, se produjo un incremento de la biosíntesis de AIA; mientras que la exposición a luz azul, determinó un efecto opuesto, en el cual se observó una reducción de la concentración de la hormona en el medio de cultivo, probablemente debido a un efecto directo de la luz sobre la molécula. Teniendo esto en cuenta, se analizó la adición de sobrenadantes proveniente de cultivos de Az39 expuestos a luz blanca en *A. thaliana*, y se comprobó que los mismos disminuyeron el número de raíces laterales (Figura 64). Este comportamiento se relaciona de manera directa con el efecto de inhibición del crecimiento radical observado por la aplicación de concentraciones mayores a $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la hormona pura en el medio de cultivo (Figura 60) y a la capacidad de la bacteria para producir mayores concentraciones de la hormona en presencia de luz blanca. En tal sentido, la producción de AIA por Az39 en medio LB expuesto a luz blanca fue mayor a $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Figura 63). En otros reportes, la presencia de altas concentraciones de la hormona generó un acortamiento de la raíz principal y una disminución de la longitud y número de los pelos radiculares laterales en *A. thaliana* (Woodward y Bartel, 2005). Las plántulas crecidas en presencia de sobrenadantes previamente expuestos a luz azul o roja, mostraron un fenotipo con una respuesta de crecimiento típica de la presencia de AIA en el medio de cultivo, en las que se observó una reducción de la longitud de la raíz principal y un incremento del número de raíces laterales. En este caso, no se logró correlacionar la disminución de la biosíntesis de AIA en cultivos de Az39 expuestos a luz azul con la respuesta de crecimiento del sistema radicular, ya que los menores niveles de la hormona deberían considerar un comportamiento diferencial con aquellos sobrenadantes expuestos a luz roja u oscuridad para los que no se produciría una reducción en la concentración de la molécula. Esto permitiría suponer la presencia de otro compuesto producido por la bacteria, que no modificaría su biosíntesis en presencia de luz y que podría estar determinando un efecto sobre la arquitectura de raíces de *Arabidopsis*. En tal sentido, se sabe que ésta bacteria es capaz, además de producir auxinas de producir otras hormonas, como citocininas, giberelinas, etileno y óxido nítrico (Prinsen et al., 1993; Bottini et al., 1989; Tien et al., 1979; Cohen et al., 2008; Strzelczyk et al., 1994; Cassán et al., 2009; Creus et al., 2005), todas relacionadas de manera directa o indirecta con el desarrollo radical (Müller, 1989; Bashán y Holguín, 1998).

De manera complementaria, se evaluó la respuesta *A. thaliana* a la inoculación con células (sin sobrenadante) provenientes de cultivos expuestos a diferentes longitudes de onda (Figura 66).

En tales experimentos, los parámetros analizados no arrojaron diferencias estadísticamente significativas cuando se adicionaron células previamente expuestas a luz blanca, azul y roja en relación a aquellas mantenidas en oscuridad; sin embargo y de manera general, cualquiera de éstos tratamientos presentó un acortamiento de la raíz principal y un aumento del número de raíces laterales en comparación a los controles no inoculados, lo que determinaría que la presencia del microorganismo *per se* o alguno de sus componentes celulares, independientemente de su condición fisiológica, sería responsable, al menos en parte, de la respuesta de la planta a la inoculación. En otras palabras, la planta respondería a la presencia de la bacteria y ésta respuesta no dependería de un mecanismo bacteriano de promoción del crecimiento particular. Si bien esto resulta coherente con estos resultados, los ensayos de inoculación con los mutantes PFJA009 (Figura 62) indicarían que las auxinas serían parte de los argumentos de la bacteria que utiliza para generar un cambio de arquitectura en la raíz, por lo que se puede suponer que tanto la bacteria como lo que la bacteria produce serían responsables del efecto. En concordancia con resultados de experimentos alternativos, en los que se verificó que las plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en medio MS modificado por la adición de células bacterianas y expuesto durante 8 horas a diferentes fuentes de luz (Figura 68), presentaban un incremento del número de raíces laterales independiente del tratamiento lumínico y en comparación con los controles sin inocular, lo que nos indicaría que el simple contacto de la planta con las bacterias, induciría una alteración morfológica de la raíz, lo que coincidiría con resultados de otros trabajos previamente publicados por Spaepen et al., (2014). Una respuesta similar fue observada en las plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en medio MS modificado por la adición exógena de sobrenadantes de cultivos de Az39 y su posterior exposición por 8 horas a diferentes fuentes luminosas (Figura 67), donde se determinó una leve reducción del efecto en sobrenadantes expuestos a luz azul, que se explicaría por una interacción directa de la luz sobre la molécula, pero que no fue estadísticamente significativa en relación al resto de los tratamientos. En estos ensayos, no se observó diferencias significativas en la respuesta de las plántulas de los tratamientos expuestos a diferentes longitudes de onda; sin embargo, aquellas plántulas que crecieron en presencia de sobrenadantes de Az39, presentaron un acortamiento significativo de sus raíces principales y un mayor número de raíces laterales en comparación a los controles sin inocular, por lo que podemos confirmar que el AIA y otras moléculas potencialmente activas, producidas por la

bacteria en el medio de cultivo previo a su fraccionamiento y posterior exposición a diferentes longitudes de onda, serían responsables de la modificación de la arquitectura de la raíz. En otras palabras, una vez que la bacteria liberó el AIA en el medio de cultivo, la exposición por 8 horas a diferentes fuentes lumínicas, no afectaría su concentración (excepto en luz azul de manera no significativa) y el efecto en la planta se observaría de manera similar independientemente del tratamiento de luz. Tiempos de exposición superiores podrían determinar una respuesta diferente, lo que sugiere la necesidad de realizar nuevos experimentos aumentando los tiempos de exposición a la luz.

A partir de estos resultados, se podría resumir que Az39 es una bacteria capaz de inducir cambios significativos en el sistema radical de *A. thaliana* mediante la síntesis de AIA (molécula de estudio en este trabajo), alternativamente por la síntesis de otro metabolito no afectado por la exposición a la luz o por su simple presencia en contacto directo con las raíces de las plantas inoculadas. Debido a la complejidad del modelo experimental desarrollado, no se logró confirmar o descartar que la exposición de la bacteria a diferentes longitudes de onda tenga un efecto sobre este comportamiento, por lo que deberíamos considerar un abordaje experimental alternativo para responder este interrogante de manera inequívoca.

VI.5. Conclusiones

V.5.1. A nivel de la interacción con *A. thaliana*

1. La longitud de la raíz principal de *A. thaliana* disminuyó; mientras que el número de raíces laterales aumentó en presencia de al menos 1.10^8 ufc.ml⁻¹ de Az39. En presencia de concentraciones crecientes de AIA se produjo un acortamiento de la longitud de la raíz principal en las plántulas de *A. thaliana*.
2. El promedio del número de raíces laterales aumentó en presencia de 10 µg.ml⁻¹ de AIA. En concentraciones superiores de AIA (10 µg.ml⁻¹) el desarrollo radicular (raíz principal y raíz lateral) resultó fuertemente inhibido.

VI.5.2. Variantes genotípicas de *Azospirillum* sp.

1. El número de raíces laterales fue menor en presencia de la cepa mutante para la biosíntesis de AIA Sp245 FAJ0009 y Az39 Δhcp, aunque en presencia de ésta última no mostró diferencias estadísticamente significativas en comparación con Az39 y Sp245 wt.

VI.5.3. Exposición de *Arabidopsis* a Az39 o a sobrenadantes de cultivos

1. El desarrollo radicular de las plántulas de *Arabidopsis* crecidas en presencia de células de Az39 provenientes de cultivos mantenidos en oscuridad o expuestos a luz blanca, azul o roja, fue similar y comparable al de las plántulas crecidas en medio MS expuesto por 8 horas a las diferentes longitudes de onda, donde se observó que la presencia de la bacteria en sí misma, produce un acortamiento de la raíz principal y un incremento del número de raíces laterales, con respecto a los controles sin inocular.

2. El desarrollo radicular de las plántulas de *Arabidopsis* crecidas en medio MS modificado por la adición de sobrenadantes de cultivos de Az39 mantenidos en oscuridad o expuestos a luz azul o roja o fue similar entre sí, pero inferior al de los controles sin tratar. Solo en el caso del sobrenadante expuesto a luz blanca pudo correlacionarse un efecto mediado por la producción de concentraciones elevadas de AIA y determinado por la exposición del cultivo bacteriano a ésta longitud de onda. En el caso de los medios MS modificado por sobrenadantes de Az39 y posteriormente expuesto a diferentes longitudes de onda, no se observó diferencias entre sí, pero todos presentaron una respuesta diferencial y del tipo AIA-dependiente en relación a los controles sin tratar.

CAPÍTULO VII: Discusión y Conclusiones generales

VII. 1. Discusión General

La luz es un factor ambiental ubicuo y una fuente esencial para la continuidad de la vida de la mayoría de los seres vivos (Elías-Arnanz et al., 2011); sin embargo, la luz también puede desencadenar daños fotofísicos y fotoquímicos en diversos organismos, fundamentalmente a nivel de ácidos nucleicos, proteínas y lípidos (Ziegelhoffer y Donohue, 2009). El estudio del efecto de la luz en bacterias fotosintéticas ha sido ampliamente desarrollado; sin embargo, con el descubrimiento de proteínas fotoreceptoras en bacterias no fotosintéticas, se han generado nuevos interrogantes, que han conducido a los investigadores a intentar dilucidar el rol de tales proteínas en el estilo de vida bacteriano (Gomelsky et al., 2011), lo que aún resulta incierto en *A. brasilense* bacteria no fotosintética y modelo de rizobacteria promotora del crecimiento vegetal mas estudiada en la actualidad. *A. brasilense* Az39 es la cepa con mayor uso agronómico en América del Sur y particularmente en Argentina, la secuenciación de su genoma (Rivera et al., 2014) permitió avanzar en la comprensión de ciertos mecanismos de promoción del crecimiento y otros relacionados con su estilo de vida, como el de la respuesta de la bacteria a la luz. En base a este escenario, se plantearon diferentes objetivos para esta tesis doctoral.

El primero, involucró el análisis de la secuencia del genoma de Az39, el cual se realizó mediante el uso de diferentes herramientas bioinformáticas, como NCBI, RAST (Aziz et al., 2008) y KEGG (Kanehisa et al., 2012). Como resultado más destacado de éste análisis, se pudo determinar la presencia de dos secuencias codificantes de proteínas del tipo fitocromo (denominadas phyAz39-1 y phyAz39-2), así como una secuencia codificante de una hemo-oxigenasa (bphO-Az39) no descrita previamente en la literatura. Hasta el momento sólo existe un reporte para el género *Azospirillum* (Kumar et al., 2012) en el que describen la presencia de dos bacteriofitocromos en una bacteria de la misma especie, *A. brasilense* Sp7 y en el mismo aseguran que estas proteínas no intervienen en la biosíntesis de pigmentos carotenoides como respuesta a la exposición a luz roja. En el genoma de Az39, se identificó una secuencia que codifica para una bacteriofitocromo hemo-oxigenasa (bphO-Az39); sin embargo, se carece de información específica sobre la función que desempeñaría esta bacteriofitocromo hemo-oxigenasa. El análisis bioinformático comparativo, tampoco permitió atribuir alguna función específica a esta secuencia por similitud con secuencias similares

presentes en otros genomas bacterianos, por lo que sigue siendo aun un campo de investigación poco explorado hasta la fecha en nuestro modelo.

Sabiendo que Az39 contenía en el genoma secuencias de interés se avanzó en el desarrollo de un análisis funcional y como parte de un primer abordaje, se analizó el efecto de la luz sobre ésta cepa y en condiciones de cultivo controladas (*in vitro*) como primer paso hacia la comprensión del modelo molecular. Con este abordaje, se logró comprobar que el crecimiento de Az39 en medio sólido, resultó gravemente afectado cuando la bacteria fue expuesta a luz blanca o azul, llegando a ser letal en la mayoría de los casos, fundamentalmente por la exposición a luz azul. Por el contrario, no se observó un comportamiento diferencial por la exposición a luz roja, por lo que podríamos asumir que la bacteria podría adaptarse de manera efectiva a este tipo de longitud de onda, en relación a lo que ocurre en el caso de la luz azul, lo que daría un rol de gran importancia al sistema fitocromo por encima de cualquier otro tipo de sistema de fotorecepción en este microorganismo. Además se determinó que éste comportamiento de respuesta a la luz es dependiente de la temperatura y de las características nutricionales del medio de cultivo. Con respecto a la temperatura, el crecimiento se inhibió por completo cuando la bacteria creció expuesta a luz blanca y azul a a 28 °C, independientemente de la condición nutricional. Se ha reportado que luz visible induce la muerte celular en *E. coli* debido a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) a diferentes temperaturas (Lipovsky et al., 2010), siendo así variable, la capacidad de supervivencia de la bacteria en cada condición (Pal et al., 2009). Teniendo en cuenta los resultados alcanzados en esta Tesis y la bibliografía disponible, se podría suponer que Az39 no es capaz de evitar la muerte celular por exposición a la luz blanca o azul a una temperatura de 28 °C. Con respecto a la respuesta de Az39 a la luz en relación a la composición del medio de cultivo, se puede decir que la composición del medio sería clave para facilitar o no la modificación en los estados oxidativos de la bacteria, que a su vez conducirían a un aumento en los niveles de glicación y de la frecuencia de mutación, lo que finalmente conduciría a la muerte celular (Mironova et al., 2005; Dimitrova et al., 2004). Por otro lado, en esta Tesis se observó que la bacteria fue menos tolerante a la exposición a luz blanca y azul en condiciones de alta disponibilidad de nutrientes (medio LB) y ésto se debería a la presencia de ciertos nutrientes en composición o a una relación carbono:nitrogeno (C:N), con capacidad de modificar el crecimiento y la fisiología bacteriana, sobre todo a nivel de la composición de la pared celular y de los polisacáridos

exteriores (exopolisacáridos), generando así, una tolerancia inespecífica a la luz. Una segunda hipótesis, se relacionaría con la presencia, en composición, de una mayor concentración de moléculas fotosensibilizadoras en el medio rico y nutricionalmente complejo, que afectarían la respuesta de Az39 a la luz en tales medios. En contrapartida, la modificación del medio de cultivo por la adición del indicador Rojo Congo, determinó que la exposición de la bacteria a luz azul no fuera letal en medio mínimo (MMAB), modificado por la adición del indicador Rojo Congo (RC), probablemente debido a que éste indicador ofrecería un efecto protector a la exposición por luz azul al modificar la composición de la superficie celular debido a un incremento de la producción de exopolisacáridos, como ha sido reportado por Budanova et al., (2018). En relación a la capacidad de desplazamiento de la bacteria en condiciones de exposición a la luz, en esta Tesis se observó que la luz blanca, es altamente inhibitoria de la movilidad de esta bacteria; mientras que la ausencia de luz (oscuridad) permite a la bacteria un mayor desplazamiento. Estos resultados son consistentes con otros reportes que muestran que la luz reprime la movilidad y por el contrario la oscuridad aumenta la movilidad, adhesión y virulencia de *A. tumefaciens* (Oberpichler et al., 2008) en plantas.

El segundo abordaje tuvo que ver con la evaluación del comportamiento de la bacteria en condiciones de cultivo *in vitro*, en medio líquido y así se pudo analizar ciertas respuestas bacterianas relacionadas con el estilo de vida de Az39 y con su capacidad de promover el crecimiento vegetal (PGPR). En medio de cultivo líquido, tanto nutricionalmente complejo (LB), como definido (MMAB) no se observó letalidad por la exposición a cualquier tipo de luz, por el contrario, la producción de biomasa aumentó por exposición a luz roja y oscuridad en el medio definido (MMAB) con un comportamiento similar al reportado por Kumar et al., (2012); mientras que en el medio complejo (LB) fue la luz blanca quien aumentó este parámetro; lo que no se correlacionó en ningún caso con un aumento en el número de células viables. Uno de los mecanismos analizados en tales condiciones experimentales, fue la producción bacteriana de AIA, la que resultó incrementada en condiciones de exposición a luz blanca en medio LB y en contrapartida, se observó la menor concentración de esta hormona por exposición a luz azul. Existen pocos reportes disponibles en los que la biosíntesis de AIA fuera inducida por condiciones de estrés ambiental en *A. brasilense* (Ona et al., 2005; Sun et al., 2014). La adición exógena de AIA al medio de cultivo, resultó en un estímulo para la biosíntesis de la hormona por Az39, que equiparó la acumulación en condiciones de

oscuridad, luz roja y blanca, sin que se observaran diferencias significativas entre estos tratamientos, independientemente del estímulo lumínico impuesto. La capacidad de producir AIA a partir del aminoácido L-Trp es importante en el entorno de la rizósfera para ésta bacteria, ya que se ha demostrado que el triptófano es uno de los componentes comunes de los exudados de las raíces con las que están asociadas las bacterias PGPR (Somers et al., 2004). La luz blanca sería un estímulo positivo para la biosíntesis de la hormona; mientras que la luz azul sería capaz de reducir los niveles de este metabolito en sistemas complejos. Por otro lado, en presencia de luz azul y blanca, Az39 desencadenó el proceso de agregación celular, y la disminución en la concentración de EPS totales. El estrés metabólico implica cambios morfológicos significativos, incluida la pérdida de movilidad, el aumento en la acumulación de sustancias de reserva y de la producción de exopolisacáridos, lo que sugiere que la remodelación de la superficie celular sería una estrategia de respuesta contra el estrés (Bible et al., 2015). El grado de la agregación entre los microorganismos se correlaciona con cantidades de EPS (Sadasivan y Neyra, 1985; Del Gallo et al., 1989; Michiels et al., 1990; Arunakumari et al., 1992; Katupitiya et al., 1995), sin embargo en esta Tesis no se pudo probar esta premisa. Con respecto a la formación de biofilms, bajo las condiciones experimentales propuestas, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos evaluados a lo largo del tiempo, ya que en tiempos prolongados de exposición a luz azul, se observó un aumento de la formación de biofilms, lo cual se correlacionó de manera directa con el fenómeno de agregación celular. Por el contrario, otros autores han determinado en *E. coli* K12, la disminución de la formación de biofilm en presencia a la luz azul (Key, no publicado).

El estudio de la expresión génica en microorganismos revela cómo las bacterias perciben y responden a diferentes estímulos ambientales, por lo que en esta Tesis Doctoral, se incluyó como estrategia experimental, la secuenciación y análisis transcriptómico de Az39 expuesta a diferentes condiciones de exposición a la luz. El análisis transcriptómico, arrojó que de los 6410 genes presentes en el genoma de Az39, alrededor del 50% se sobre o sub-expresó con un valor $p < 0,05$ y un Fold change $\geq \pm 1$ en luz roja, azul, blanca, con respecto al control mantenido en condiciones de oscuridad. De manera particular, el análisis que se realizó de determinados clusters fue diferencial y particular para cada condición de luz. Con respecto a los genes involucrados en los procesos de división celular (*dnaK-1*; *groEL-1*; *ftsL*) o a respuestas al estrés por frío, calor (*rpoH*, *ruberitrina*, *nnrS*, *osmC*), resultaron en su mayoría

inducidos en luz blanca. Por otro lado, en luz blanca, azul y roja, se indujo la bacteriofitocromo hemo-oxigenasa, mientras que los fitocromos, phyAz39-1 y phyAz39-2, respondieron de manera diferente, es decir, la exposición a luz blanca y roja indujo el phyAz39-1, mientras que en luz azul se reprimió; por el contrario se observó en phyAz39-2, que se indujo en luz azul, y reprimió en luz blanca y roja. Los Bacteriofitocromos, suelen estar relacionados a respuestas de estrés, y en este análisis se pudo observar que la expresión de genes relacionados al estrés, fue mayor en luz blanca, por lo que podríamos presuponer que el phyAz39-1 podría estar relacionado con esta sobre-expresión. Coincidente con esto último, se observó en aquellos genes relacionados con el proceso de comunicación entre células o Quorum-sensing y quenching (*amiE*, factor σ^{54} , luxR, AHL acilasa) y biosíntesis flagelar (*flgB*, *flhH*, *flgC*, *flgQ*) que resultaron en su mayoría inducidos en luz blanca, mientras que aquellos que participan del proceso de quimiotaxis (*cheD*, *cheC*, *cheY*, *cheA*) se indujeron en luz roja. Existen reportes en los que afirman que la luz, funciona como estímulo o factor ambiental con capacidad de inducir o reprimir la expresión de genes relacionados con la síntesis de flagelos (Ramos et al., 2004). Por último y con respecto a los genes involucrados en la biosíntesis de AIA, se observó que el gen *ipdc*, clave en la producción de la fitohormona, resultó reprimido en todas las luces.

Uno de los aspectos de mayor interés de ésta Tesis se relacionó con la extrapolación de los resultados obtenidos *in vitro* por la exposición de Az39 a la luz en un sistema *in planta*. Para ello, se siguió el modelo propuesto por (Dubrovsky et al., 1994), utilizando plántulas de *A. thaliana*. En nuestros ensayos, se observó una disminución significativa de la elongación de la raíz principal de *A. thaliana* y un aumento en el número de raíces laterales en presencia de Az39. Para correlacionar esta respuesta de crecimiento con la producción de alguna molécula con actividad biológica sobre la planta por parte de Az39, se realizó un ensayo comparativo de adición exógena de AIA al medio de cultivo, en el que se observó que a concentraciones similares a las producidas por la bacteria ($10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), se produce un acortamiento de la longitud de la raíz principal y un aumento del número de raíces laterales, similar al observado por la inoculación (Spaepen et al., 2014; Creus et al., 2017). En esta Tesis se confirmó que cuando Az39 es cultivado en medio complejo LB y expuesto a la luz blanca, aumenta la producción de AIA ($20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y con el fin de correlacionar dicho comportamiento en un sistema *in planta*, se hizo crecer *A. thaliana* en presencia de sobrenadantes de cultivos de

Az39 previamente expuestos a luz blanca en los que se observó una disminución del promedio de raíces laterales en relación a los demás tratamientos modificados con sobrenadante y los controles sin tratar exógenamente. Profundizando el modelo, se comprobó que plántulas de *Arabidopsis* cultivadas en MS inoculado y expuesto a diferentes fuentes de luz, presentaban un incremento del número de raíces laterales independiente del tratamiento lumínico y en comparación con los controles sin inocular, lo que nos indicó que el simple contacto de la planta con las bacterias, induciría una alteración morfológica de la raíz, lo que además coincidiría con resultados de otros trabajos previamente publicados por Spaepen et al., (2014). A partir de estos resultados, se puede decir que Az39 induce cambios significativos en el sistema radical de *A. thaliana* mediante la síntesis de AIA o alternativamente por la síntesis de otro metabolito no afectado por la luz, pero que su sola presencia en contacto directo con las raíces de las plantas inoculadas sería responsable del cambio morfológico en la raíz y que esto podría modificarse por la exposición de la bacteria a diferentes tipos de luz. A continuación se muestra un esquema en el que se resumen las respuestas más relevantes a la luz por parte de *A. brasilense* Az39.

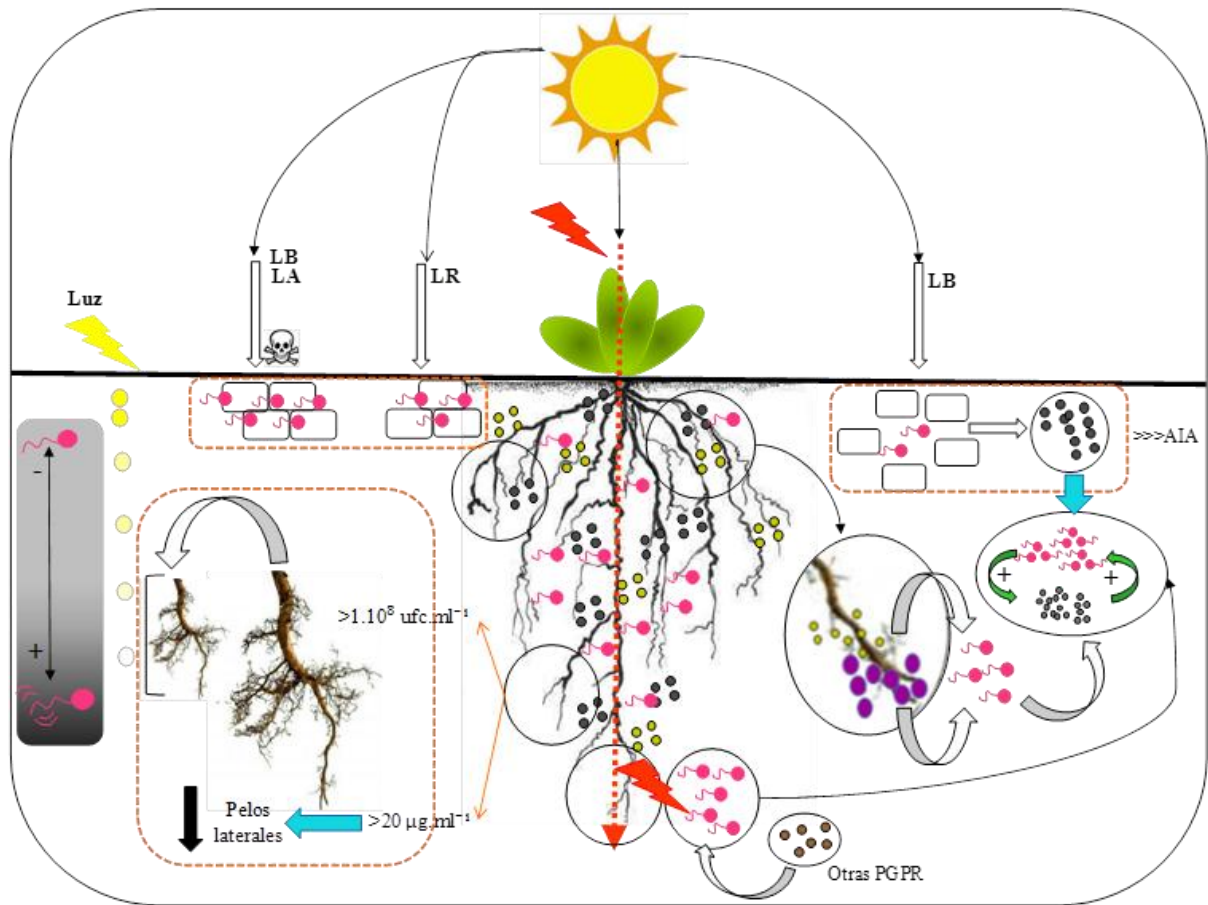


Figura 69. Esquema general del efecto de la luz en el crecimiento y desarrollo de Az39 y el efecto de la presencia de esta bacteria en interacción con *Arabidopsis thaliana*

Tal como puede observarse en la Figura 67, la luz azul y blanca resultaron letales para la bacteria cuando ésta adopta un crecimiento sésil y en forma de colonias, determinado por su cultivo en medio sólido. Por otro lado, la exposición a la luz roja no modifica su crecimiento y su comportamiento es similar al que presenta en condiciones de oscuridad. En la figura, también se visualiza el fenómeno de movilidad en esta bacteria determinado por la presencia de luz, donde tal capacidad se vió incrementada en condiciones de oscuridad, reducida por exposición a luz roja y azul y casi inhibida por completo en condiciones de exposición a la luz blanca. Por otro lado, se planteó que la luz blanca tiene un efecto estimulante para la biosíntesis de AIA en condiciones de buena disponibilidad de nutrientes; es decir que si la luz blanca logra penetrar unos pocos centímetros por debajo del suelo o utilizando la raíz como un cable de fibra óptica, actuaría como un factor de estimulación para la síntesis de esta

fitohormona en proximidad de la superficie o cerca de la raíz, donde la concentración de exudados es significativa, dando como resultado el acortamiento de la raíz principal y un incremento del número de pelos radiculares, que como también se observa en esta figura, en concentraciones superiores a $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA, resultaría inhibitorio para este parámetro, con lo cual disminuiría la formación de las raíces secundarias. Teniendo en cuenta que las raíces liberan exudados y entre las moléculas que componen tales sustancias se encuentran aminoácidos y que el L-Trp es la molécula precursora para la biosíntesis de AIA, la disponibilidad de ésta molécula para Az39 en la rizósfera, sería desencadenante de la biosíntesis de la hormona y con ello se produciría el estímulo del crecimiento radical. Si consideramos que las plantas actúan como un cable de fibra óptica que permiten la llegada de fotones de luz a zonas más profundas del suelo; sabemos que en condiciones de oscuridad aún podría ocurrir la biosíntesis bacteriana de AIA mediada por el efecto lumínico de la raíz.

VII.2. Conclusiones Generales

Las conclusiones más importante de esta Tesis doctoral, que lleva como título “Análisis genómico y funcional del efecto de la luz sobre el crecimiento, desarrollo y capacidad PGPR de *Azospirillum brasilense* Az39, la cepa más utilizada en la formulación de inoculantes para no-leguminosas en la República Argentina” se resumen a continuación:

1. A nivel genómico

1. *Azospirillum brasilense* Az39 contiene en su genoma, dos genes que codifican para proteínas receptoras de luz del tipo Fitocromo, designados en esta Tesis como PhyAz39-1 y PhyAz39-2, y un gen cuyo producto es un Bacteriofitocromo hemo-oxigenasa, BphO-Az39.

2. A nivel funcional

2.1. Sobre las condiciones de cultivo en medio sólido:

1. La luz blanca y azul son letales para el crecimiento sésil de Az39
2. La exposición de la bacteria a luz roja no induce cambios sobre su crecimiento o desarrollo y mantiene un comportamiento similar al que presenta en condiciones de oscuridad.
3. Cuanto más nutricionalmente rico es el medio de cultivo en el que crece la bacteria, menor es su tolerancia a la exposición a luz azul o blanca.

4. El indicador Rojo Congo adicionado en el medio de cultivo tendría un efecto protector ante la exposición de la bacteria a luz azul
5. La exposición de la bacteria a luz azul o blanca a una temperatura de 28 °C inhibe su crecimiento.
6. La bacteria presentó una mayor capacidad de desplazamiento por natación (swimming) en condiciones de oscuridad o por exposición a luz roja; mientras que la exposición de Az39 a luz azul o blanca redujeron casi completamente su desplazamiento.

2.2. Sobre las condiciones de cultivo en medio líquido:

1. Las exposición a cualquier tipo de longitud de onda no genera letalidad en medio de cultivo líquido, pero si genera cambios en el comportamineto de la bacteria dependiendo del medio de cultivo.
2. En medio mínimo se produce un incremento en la producción de la biomasa por exposición a luz roja o en condiciones de oscuridad; mientras que en medio complejo el incremento de la producción de biomasa, ocurre por exposición a la luz blanca. En ningún caso, el incremento de la producción de biomasa, se correlacionó con el número de células por mililitro.
4. En medio mínimo se observó la máxima producción de AIA en condiciones de oscuridad; mientras que en medio rico, se observó un incremento de la producción y acumulación de esta hormona por exposición a la luz blanca. En condiciones de exposición a la luz azul, se observó una menor concentración de la hormona con respecto al control mantenido en condiciones de oscuridad, lo que sugiere un efecto directo de esta longitud de onda sobre la molécula.
5. En medio complejo, la exposición a luz azul y blanca fueron desencadenantes del fenómeno de agregación celular, lo que podría considerarse como un mecanismo de respuesta de la bacteria a una condición desfavorable. Un fenómeno similar fue comprobado a nivel de la formación de biofilms por exposición a luz azul. En contrapartida, la producción de EPS fue menor por exposición a ésta misma longitud de onda.

3. A nivel del análisis transcriptómico

1. Sobre un total de 6410 genes anotados en el genoma de Az39, alrededor del 50 % fueron reprimidos y el 50% restante se sobreexpresaron en condiciones de exposición a la luz.

2. La exposición de la bacteria a la luz blanca indujo mayoritariamente la expresión de genes involucrados en la división celular, respuesta al estrés por frío, calor, quórum sensing y quenching, biosíntesis flagelar.
3. La exposición de la bacteria a luz roja, indujo la expresión de genes involucrados en la quimiotaxis.
4. La exposición a luz azul, blanca y roja, indujo la expresión de la bacteriofitocromo hemo-oxigenasa. El fitocromo phyAz39-1 se indujo en luz blanca y roja; mientras que el phyAz39-2, solo se indujo en luz azul.
5. El gen clave en la biosíntesis de AIA, *ipdc*, se reprimió por la exposición a los tres tipos de luz.

4. Condiciones de cultivo *in vivo* con *Arabidopsis thaliana*

1. La presencia de 1.10^8 ufc.ml⁻¹ de Az39 en contacto con las raíces de *A. thaliana* produjo un acortamiento de la longitud de la raíz principal y un aumento del número de raíces laterales.
2. La concentración de la hormona pura (AIA) en la que se vió un incremento del número de raíces laterales, fue similar a la producida por la bacteria en medio de cultivo químicamente definido (10 µg.ml⁻¹).
3. La adición de sobrenadantes de Az39 proveniente de cultivos expuestos a luz blanca disminuyeron el número de raíces laterales y ésto se correlacionó con un efecto similar en concentraciones superiores de la hormona pura
4. La adición de sobrenadantes de Az39 al medio MS y su posterior exposición a la luz, indujo un incremento en la formación de raíces laterales en todas las condiciones evaluadas, lo que se correlacionó con la presencia de la hormona en tales fracciones del cultivo.
5. La bacteria incorporada en el medio MS, indujo acortamiento de la longitud de la raíz principal y aumento del promedio de raíces laterales, sin presentar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos de luces, lo que sugiere que el simple contacto del microorganismo con la raíz sería en parte responsable de la modificación del crecimiento del sistema radical.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alexandre, G. (2015). Minireview: chemotaxis control of transient cell aggregation. *Journal of bacteriology*, JB-00121.
- Apweiler R., Martin, M. J., O'Donovan, C., Magrane, M., Alam-Faruque, Y., Alpi E., Antunes R., Arganiska J., Casanova B. (2013). Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 41, D43–D47.
- Arunakumari, A., Lamm, R. B. y Neyra-Estens, C. A. (1992). Changes in cell surface properties of *azospirilla* in relation to cell
- Ashkenazi, H., Malik, Z., Harth, Y., Nitzan, Y. (2003). Eradication of *Propionibacterium acnes* by its endogenic porphyrins after illumination with high intensity blue light. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 35:17–24.
- Atkinson, S., Chang, C. Y., Sockett, R. E., Cámara, M., y Williams, P. (2006). Quorum sensing in *Yersinia enterocolitica* controls swimming and swarming motility. *Journal of bacteriology*, 188(4), 1451-1461.
- Aziz, R.K., Bartels, D., Best, A.A., DeJongh, M., Disz, T., Edwards, R.A., Formsma, K., Gerdes, S., Glass, E.M., Kubal, M., Meyer, F., Olsen, G.J., Olson, R., Osterman, A.L., Overbeek, R.A., McNeil, L.K., Paarmann, D., Paczian, T., Parrello, B., Pusch, G.D., Reich, C., Stevens, R., Vassieva, O., Vonstein, V., Wilke, A., Zagnitko, O. (2008). The RAST Server: Rapid Annotations using Subsystems Technology. *BMC Genomics* 9, 75. doi:10.1186/1471-2164-9-75.
- Baek, J.H., Han, M.J., Lee, S.Y., Yoo, J.S. (2009). Transcriptome and proteome analyses of adaptive responses to methyl methanesulfonate in *Escherichia coli* K-12 and *ada* mutant strains. *BMC Microbiol.* 3;9:186. doi: 10.1186/1471-2180-9-186.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., y Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Baldani, V. L. D., Baldani, J. I., y Döbereiner, J. (1987). Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum*) with *Azospirillum* spp. in Brazil. *Biology and fertility of soils*, 4(1-2), 37-40.
- Baldani, V., Baldani, J., y Döbereiner, J. (1987). Inoculation of field-grown wheat (*Triticum aestivum* L.) with *Azospirillum* spp. Brazil. *Biol. Fertil. Soils* 4: 37-40.
- Barbieri, P., Baggio, C., Bazzicalupo, M., Galli, E., Zanetti, G. y Nuti, F.A.P. (1991). *Azospirillum gramineae* interaction: effect of indole-3-acetic acid, in "Nitrogen fixation" (PolsineUi, M., Materassi, R, & Vincenziai, M.) (pp. 161-168). Kluwer Academic Publ., Dordrecht (The Netherlands).
- Barbieri, P., Bernardi, A., Galki, E. y Zanetti, G. (1988). Effet of inoculation with different strains of *Azospirillum brasilense* on wheat root developments, in "*Azospirillum* IV: genetics, phisiology, ecology" OV. Klingmuller (pp. 181-188). Springer-Yerlag, Berlin, Heidelberg.
- Barkovits. .K, Schubert, B., Heine, S., Scheer, M., Frankenberg-Dinkel, N. (2011). Function of the bacteriophytochrome BphP in the RpoS/las quorum-sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*.
- Bashan, Y. (1990). Short exposure to *Azospirillum brasilense* Cd inoculation enhanced proton efflux of intact wheat roots. *Canadian journal of microbiology*, 36(6), 419-425.
- Bashan, Y. (1998). Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*, 16(4), 729-770.

- Bashan, Y., Holguin, G., y De-Bashan, L. E. (2004). *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). Canadian journal of microbiology, 50(8), 521-577.
- Bashan, Y., Levanony, H., y R. E. Whitmoyer. (1991). Root surface colonization of non-cereal crop plants by pleomorphic *Azospirillum brasilense* Cd. Journal of General Microbiology, vol. 137, p. 187-196.
- Bashan, Y., y de-Bashan, L.E. (2010). How the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum* promotes plant growth-a critical assessment 1st ed., Elsevier Inc.
- Bashan, Y., y Holguín, G. (1998). Proposal for the division of plant growth-promoting rhizobacteria into two classifications: biocontrol-PGPB (plant growth promoting bacteria) and PGPB. Soil Biol. Biochem. 30: 1225-1228.
- Bassler, B.L. (1999). How bacteria talk to each other: Regulation of gene expression by quorum sensing. Current Opinion in Microbiology, 2(6), pp.582-587.
- Beijerinck, M. (1925). Über ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann. Zentrallab. Bakteriell. Parasitenkd. Infections. Abt. (2). 63: 353-359.
- Ben, Dekhil., S., Cahill, M., Stackebrandt, E., y Sly, L.I. (1997). "Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largomobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* subsp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov." Syst. Appl. Microbiol. 20:72-77. [No PubMed record available.]
- Benson, D.A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D.J., Ostell, J., Sayers, E.W. (2013). GenBank. Nucleic Acids Res. 41. doi:10.1093/nar/gks1195
- Berka, J., Chen, Y. J., Leamon, J. H., Lefkowitz, S., Lohman, K. L., Makhijani, V. B., Weiner, M. P. (2010). U.S. Patent No. 7.842.457. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Bertani, G. (1951). Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 62:293-300.
- Bhaya, D. (2004). Light matters: phototaxis and signal trans-duction in unicellular cyanobacteria. Mol Microbiol 53:745–754.
- Bhoo, S.H., Davis, S.J., Walker, J., Karniol, B., Vierstra, R.D. (2001). Bacteriophytochromes are photochromic histidine kinases using a biliverdin chromophore. Nature 414:776–779. Bibliographic database. In: McEntyre, J. and Ostell, J. (eds), The NCBI Handbook Biotech, 1–5, DOI: 10.1007/s13205-013-0152-2.
- Bible, A.N., Khalsa-Moyers, G.K., Mukherjee, T., Green, C.S., Mishra, P., Purcell, A., Aksenova, A., Hurst, G., Alexandre, G. (2015). Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation. Appl. Environ. Microbiol., 81(24), 8346-8357.
- Bingle, L.E.H., Bailey, C.M., Pallen, M.J. (2008). Type VI secretion: a beginner's guide. Curr Opin Microbiol 11:3–8
- Bladergroen, MR., Badelt, K., Spaink, H.P. (2003). Infection-blocking genes of a symbiotic *Rhizobium leguminosarum* strain that are involved in temperature-dependent protein secretion. Mol Plant Microb Interact 16:53–64.

- Blair, J.M.A., Richmond, G.E., Bailey, A.M., Ivens, A., Piddock, L.J.V. (2013). Choice of Bacterial Growth Medium Alters the Transcriptome and Phenotype of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium*. PLoS ONE 8(5): e63912. doi:10.1371/journal.pone.0063912.
- Boddey, R.M., de Oliveira, O.C., Urquiaga, S., Reis, V.M., Olivares, F.L., Baldani, V.L.D., y Döbereiner, J. (1995). Biological nitrogen fixation associated with sugar cane and rice: contributions and prospects for improvement. Plant Soil, 174: 195–209
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M. (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. Cell 141: 107–116.
- Boehm, A., Kaiser, M., Li, H., Spangler, C., Kasper, C.A., Ackermann, M. (2010). Second messenger-mediated adjustment of bacterial swimming velocity. Cell 141: 107–116.
- Bogino, P., Oliva, M., Sorroche, F., y Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. International journal of molecular sciences, 14(8), 15838–15859.
- Bolwerk, A., Lagopodi, A. L., Wijffjes, A. H., Lamers, G. E., Chin-A-Woeng, T. F., Lugtenberg, B. J., y Bloemberg, G. V. (2003). Interactions in the tomato rhizosphere of two *Pseudomonas* biocontrol strains with the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Molecular plant-microbe interactions, 16(11), 983–993.
- Bonomi, H.R., Posadas, D.M., Paris, G., del Carmen Carrica, M., Frederickson, M., Pietrasanta, L.I., Bogomolni, R.A., Zorreguieta, A., Goldbaum, F.A. (2012). Light regulates attachment, exopolysaccharide production, and nodulation in *Rhizobium leguminosarum* through a LOV-histidine kinase photoreceptor. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109:12135–12140.
- Bootsma, H.J., Cummings, C., Relman, D.A., y Miller, J.F. (2002) Global expression analysis of the Bordetella virulence regulon. In National Meeting of the American Society for Microbiology, Vol. 102. Salt Lake City, UT. Abstract 1572.
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P. (1989). Identification of gibberellins A1, A3 and iso-A3 in cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol 90:45–47.
- Braatsch, S., Moskvina, O. V., Klug, G., y Gomelsky, M. (2004). Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* Transcriptome to Blue Light under Semiaerobic Conditions. Journal of Bacteriology, 186(22), 7726–7735. <http://doi.org/10.1128/JB.186.22.7726-7735.2004>.
- Braatsch, S., Moskvina, O. V., Klug, G., y Gomelsky, M. (2004). Responses of the *Rhodobacter sphaeroides* Transcriptome to Blue Light under Semiaerobic Conditions. Journal of Bacteriology, 186(22), 7726–7735. <http://doi.org/10.1128/JB.186.22.7726-7735.2004>.
- Brovko, L.Y., Meyer, A., Tiwana, A.S., Chen, W., Liu, H., Filipe, C.D. and Griffiths, M.W. (2009). Photodynamic treatment: a novel method for sanitization of food handling and food processing surfaces. J Food Prot 72, 1020–1024.
- Budanova, A. A., Shirokov, A. A., Shchyogolev, S. Y., y Matora, L. Y. (2018). Analysis of Congo red-induced changes in the cell surface and macrocolony structure of the bacterium *Azospirillum brasilense* Microbiology, 87(1), 60–65.
- Burdman, S., Jurkevitch, E., Schwartzburd, B., Hampel, M., y Okon, Y. (1998). Aggregation in *Azospirillum brasilense*: Effects of chemical and physical factors and involvement of extracellular components. Microbiology, 144(7), pp.1989–1999.

- Burdman, S., Jurkevitch, E., Soria-Díaz, M. E., Serrano, A. M. G., y Okon, Y. (2000). Extracellular polysaccharide composition of *Azospirillum brasilense* and its relation with cell aggregation. *FEMS microbiology letters*, 189(2), 259-264.
- Burdman, S., Okon, Y. y Jurkevitch, E., (2000a). Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant roots. *Critical reviews in microbiology*, 26(2), pp.91–110.
- Cáceres, E. R., Di Ciocco, C., y Basurco, J. P. (1996). Influencia de la inoculación con *Azospirillum brasilense* en trigo cultivado en suelos de la provincia de La Pampa, Argentina. *Ciencia del suelo*, 14, 110-112.
- Camilios-Neto, D., P. Bonato, *et al.* (2014). "Dual RNA-seq transcriptional analysis of wheat roots colonized by *Azospirillum brasilense* reveals up-regulation of nutrient acquisition and cell cycle genes." *BMC Genomics* 15(1): 1-13.
- Canese, K., Jentsch, J., Myers, C. (2002). PubMed: The Bibliographic Database. in *The NCBI Handbook*. NCBI Handb. 0.
- Cangahuala-Inocente, G. C., do Amaral, F. P., Faleiro, A. C., Huergo, L. F., y Arisi, A. C. M. (2013). Identification of six differentially accumulated proteins of *Zea mays* seedlings (DKB240 variety) inoculated with *Azospirillum brasilense* strain FP2. *European journal of soil biology*, 58, 45-50.
- Carreno-López, R., Campos-Reales, N., Elmerich, C., y Baca, B. E. (2000). Physiological evidence for differently regulated tryptophan-dependent pathways for indole-3-acetic acid synthesis in *Azospirillum brasilense*. *Molecular and General Genetics*, 264(4), 521-530.
- Cascales, E. (2008). The type VI secretion toolkit. *EMBO reports*, 9(8), 735-741.
- Casey, A., Fox, E. M., Schmitz-Esser, S., Coffey, A., McAuliffe, O., y Jordan, K. (2014). Transcriptome analysis of *Listeria monocytogenes* exposed to biocide stress reveals a multi-system response involving cell wall synthesis, sugar uptake, and motility.
- Casino, P., Rubio, V., y Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current opinion in structural biology*, 20(6), 763-771.
- Cassán, F., Das, Frederick, Spaepen, Stijn y Vanderleyden, Jos. (2011). IAA biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under biotic and abiotic stress conditions. Abstract CD-ROM [pdf]. Presentado en la Conferencia Internacional Rhizosphere. Ciudad de Perth, Western Australia.
- Cassán, F., Perrig D., Sgroy V., Masciarelli O., Penna C., y Luna V. (2009). *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109 promote seed germination and early seedling growth, independently or co-inoculated in maize (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* 45:28-35. cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la república Argentina. Editorial: D277-80. DOI:10.1093/nar/gkh063
- Cassán, F., Vanderleyden, J., y Spaepen, S. (2014). Physiological and agronomical aspects of phytohormone production by model plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) belonging to the genus *Azospirillum*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 33(2), 440-459.
- Cassán, F., y Diaz-Zorita, M. (2016). *Azospirillum* sp. in current agriculture: From the laboratory to the field. *Soil Biology and Biochemistry*, 103, 117-130.
- Chadsuthi, S., Wong-Ekkabut, J., Triampo, W., Dounghawee, G., y Triampo, D. (2010). Comparison of the effects of UV-A radiation on *Leptospira* interrogans serovar Bataviae, Canicola and Pomona. *African Journal of Biotechnology*, 9(21), 3196-3206.

- Chamam, A., Sanguin, H., Bellvert, F., Meiffren, G., Comte, G., Wisniewski-Dyé, F., Bertrand C., Prigent-Combaret, C. (2013). Plant secondary metabolite profiling evidences strain-dependent effect in the *Azospirillum*–*Oryza sativa* association. *Phytochemistry*, 87, 65-77.
- Cohen, A.C., Bottini, R., Piccoli, P. (2008). *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regul.* 54: 97-103 Crossref, ISI, Google Scholar.
- Costacurta, A., Deijers, v., y Vanderleyden, j. (1994). Molecular and sequence analysis of and *A. brasilense* indole-3-pyruvate descarboxylase gene. *Mol. Gen. Genet.* 243: 463-472. Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R., y Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual review of microbiology*, 49(1), 711-745.
- Creus, C. M., Graziano, M., Casanovas, E. M., Pereyra, M. A., Simontacchi, M., Puntarulo, S., y Lamattina, L. (2005). Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta*, 221(2), 297-303.
- Creus, C. M., Sueldo, R. J., y Barassi, C. A. (1998). Water relations in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings under osmotic stress. *Canadian Journal of Botany*, 76(2), 238-244.
- Croes, C.L., Moens, S., van Bastelaere, E., Vanderleyden, J., y Michiels, K.W. (1993). The polar flagellum mediates *Azospirillum brasilense* adsorption to wheat roots. *Microbiology*, 139(9), 2261-2269.
- Crosson, S., et al. (2003). The LOV domain family: photoresponsive signaling modules coupled to diverse output domains. *Biochemistry* 42, 2–10
- Croucher, N.J., y Thomson, N.R. (2010). Studying bacterial transcriptomes using RNA-seq. *Curr Opin Microbiol.* 2010;13:619–624.
- Crozier, A. P., Arruda, J. M., Jasmim, A. M., Monteiro, y G. Sandberg. (1988). Analysis of indole-3-acetic acid and related indoles in culture medium from *Azospirillum lipoferum* and *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:2833-2837.
- Danhorn, T., y Fuqua, C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 61, 401-422.
- Davies, P.J. (2005). *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* 3rd edn. Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers
- Davis, J., Olsen, G., Overbeek, R., Vonstein, V., Xia, F. (2013). In search of genome annotation consistency: solid gene clusters and how to use them. *3 Biotech* 1–5. doi:doi: 10.1007/s13205-013-0152-2
- Davis, S.J., Vener, A.V. y Vierstra, R.D. (1999). Bacteriophytochromes: phytochrome-like photoreceptors from nonphotosynthetic eubacteria. *Science* 286, 2517±2520.
- De-Bashan, L. E., Schmid, M., Rothballer, M., Hartmann, A., y Bashan, Y. (2011). Cell-cell interaction in the eukaryote-prokaryote model of the microalgae *chlorella vulgaris* and the bacterium *Azospirillum brasilense* immobilized in polymer beads 1. *Journal of phycology*, 47(6), 1350-1359.
- Del Gallo, M. y Haegi, A. (1990). Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis* 9, 155-161.
- Del Gallo, M., Negi, M. y Neyra, C. A. (1989). Cakofluor and lectin-binding exocellular polysaccharides of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Bacteriol* 171, 3504-3510.

- Deng, W., Wang, H. y Xie, J. (2011). Regulatory and pathogenesis roles of *Mycobacterium* Lrp/AsnC family transcriptional factors. *J. Cell. Biochem.*, 112: 2655–2662. doi:10.1002/jcb.23193
- Desikan, R., S. A.-H.-Mackerness, J. T. Hancock, y S. J. Neill. (2001). Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol.* 127:159–172.
- Devoid, S., Overbeek, R., DeJongh, M., Vonstein, V., Best, A.A., Henry, C. (2013). Automated genome annotation and metabolic model reconstruction in the SEED and Model SEED. *Methods Mol. Biol.* 985, 17–45. doi:10.1007/978-1-62703-299-5_2
- Díaz-Saez, Y., Díaz-de los Ríos, M., Alberto-Casas, M., Nuñez-Caraballo, A., y Martínez-Mora, M. (2013). Crecimiento de *Azospirillum brasilense* en presencia de disacáridos: sacarosa y lactosa. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 47(2).
- Díaz-Zorita, M., Fernández Canigia, M. (2008). Análisis de la producción de cereales inoculados con *Azospirillum brasilense* en la República Argentina. Editorial: Asociación Argentina de Microbiología. pp. 153-161. ISBN: 978-987-98475-8-9
- Dimitrova, R., Mironova, R., Ivanov, I. (2004) Glycation of proteins in *Escherichia coli*: effect of nutrient broth ingredients on glycation. *Biotechnol Biotechnol Equip* 18:99 –103. <http://dx.doi.org/10.1080/13102818.2004.10817094>.
- Dische, Z. (1962). Color reactions of hexuronic acids, p. 497-501. In R. L. Whistler and M.L. Wolfrom [ed.], *Methods in carbohydrate chemistry*, vol. 1. Academic Press, Inc., New York.
- Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vande Broek, A., Vanderleyden, J. (1999). Phytostimulatory effect of *Azospirillum brasilense* wild type and mutant strains altered in IAA production on wheat. *Plant Soil* 212:155-164.
- Dobbelaere, S., Vanderleyden, J., y Okon, Y. (2003). Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Critical reviews in plant sciences*, 22(2), 107-149.
- Döbereiner, J., Baldani, V.L.D., Baldani, J.I. (1995). Como isolar e identificar bactérias diazotróficas de plantas não-leguminosas. Brasília: EMBRAPA – SPI: Itaguaí, Rio de Janeiro: EMBRAPA – NPAB, Brazil, 60p.
- Döbereiner, J., Day, J.M. (1976). Associative symbiosis in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen-fixing sites. In: Newton WE, Nyman CT, eds. *Proceedings of the 1st international symposium on nitrogenfixation*, vol. 2. Pullman, WA, USA: Washington State University Press, 518–538. Donlan RM.(2002). *Biofilms: Microbial Life on Surfaces*. *Emerging Infectious Diseases*; 8(9):881-890. doi:10.3201/eid0809.020063.
- Döbereiner, J., y Pedroza, F. (1987). Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants. *Sci. Tech. Publishers/Springer Verlag*, pp. 1-155. Madison, Wis. USA.
- Dons, L., Eriksson, E., Jin, Y., Rottenberg, M. E., Kristensson, K., Larsen, C.N., Olsen, J. E. (2004). Role of Flagellin and the Two-Component CheA/CheY System of *Listeria monocytogenes* in Host Cell Invasion and Virulence. *Infection and Immunity*, 72(6), 3237–3244. <http://doi.org/10.1128/IAI.72.6.3237-3244.2004>
- Dötsch, A., Eckweiler, D., Schniederjans, M., Zimmermann, A., Jensen, V., Scharfe, M., y Häussler, S. (2012). The *Pseudomonas aeruginosa* transcriptome in planktonic cultures and static biofilms using RNA sequencing. *PloS one*, 7(2), e31092.

- Drogue, B., Sanguin, H., Borland, S., Prigent-Combaret, C., Wisniewski-Dyé, F. (2014b). Genome wide profiling of *Azospirillum lipoferum* 4B gene expression during interaction with rice roots. FEMS Microbiology Ecology DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6941.12244> 543-555
- Drogue, B., Sanguin, H., Chamam, A., Mozar, M., Llauro, C., Panaud, O., Prigent-Combaret, C., Picault, N., Wisniewski-Dyé, F. (2014a). Plant root transcriptome profiling reveals a strain-dependent response during *Azospirillum*-rice cooperation. *Front Plant Sci.* 6;5:607. doi: 10.3389/fpls.2014.00607. eCollection 2014.
- Dubrovsky, J. G., Puente, M. E., y Bashan, Y. (1994). *Arabidopsis thaliana* a model system for the study of the effect of inoculation by *Azospirillum brasilense* Sp 245 on root hair growth. *Soil Biology & Biochemistry* 26,1657-1664.
- Eckert, B., Weber, O. B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 17-26.
- El Zemrany, H., Czarnes, S., Hallett, P. D., Alamercury, S., Bally, R., & Monrozier, L. J. (2007). Early changes in root characteristics of maize (*Zea mays*) following seed inoculation with the PGPR *Azospirillum lipoferum* CRT1. *Plant and soil*, 291(1-2), 109-118.
- Elías-Arnanz, M., Padmanabhan, S., y Murillo, F.J. (2011). Light-dependent gene regulation in nonphototrophic bacteria. *Current opinion in microbiology*, 14(2), 128-135.
- Falik, E., Okon, Y., Epstein, E., Goldman, A., Fischer, M. (1989). Identification and quantification of IAA and IBA in *Azospirillum brasilense*-inoculated maize roots. *Soil Biol Biochem* 21:147-153.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Feng, Y., Zhang, Y., Ying, C., Wang, D., Du, C. (2015). Nanopore-based fourth-generation DNA sequencing technology. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* doi:10.1016/j.gpb.2015.01.009
- Feuerstein, O., Persman, N., Weiss, E.I. (2004). Phototoxic effect of visible light on *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*: an in vitro study. *Photochem Photobiol*;80:412-5.
- Fiedler, B., Broc, D., Schubert, H., Rediger, A., Börner, T., Wilde, A. (2004). Involvement of cyanobacterial phytochromes in growth under different light qualities and quantities. *Photochem. Photobiol.* 79:551-555.
- Franck, S., Franck, W.L., Birke, S.R., Chang, W.S., Sangurdekar, D.P., Cytryn, E., Emerich, D.W. (2014). Comparative transcriptomic analysis of symbiotic *Bradyrhizobium japonicum*. *Symbiosis*, 63(3), 123-135. DOI: 10.1007/s13199-014-0294-y
- Fukami, J., de la Osa, C., Ollero, F. J., Megías, M., and Hungria, M. (2018). Co-inoculation of maize with *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium tropici* as a strategy to mitigate salinity stress. *Functional Plant Biology*, 45(3), 328-339
- Fukami, J., Nogueira, M. A., Araujo, R. S., y Hungria, M. (2016). Accessing inoculation methods of maize and wheat with *Azospirillum brasilense*. *AMB Express*, 6(1), 3.
- Gallo, M. D., y Haegi, A. (1990). Characterization and quantification of exocellular polysaccharides in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*. *Symbiosis (Rehovot)*, 9(1-3), 155-161.

- Gao, R., y Stock, A.M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, 63, 133-154.
- Garate, A., y Bonilla, I. (2000). Nutrición mineral y producción vegetal. In: *Fundamentos de fisiología vegetal*. eds. Azcón-Bieto and Talón E. pp 113-130. McGraw-Hill Interam. Madrid.
- Gest, H. (1995). Phototaxis and other sensory phenomena in purple photosynthetic bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 16(4), 287-294.
- Gomelsky, M., Hoff, W.D. (2011). Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol.* 19:441–448.
- Grishanin, R. N., Chalmina, I. I., y Zhulin, I. B. (1991). Behaviour of *Azospirillum brasilense* in a spatial gradient of oxygen and in a 'redox' gradient of an artificial electron acceptor. *Microbiology*, 137(12), 2781-2785.
- Gross, R., y Beier, D. (2012). *Two-component systems in bacteria*. Horizon Scientific Press.
- Guffey, J.S., Wilborn, J. (2006). In vitro bactericidal effects of 405-nm and 470-nm blue light. *Photomed Laser Surg*; 24:684–8.
- Hadas, R., y Okon, Y. (1987). Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biology and Fertility of Soils* 5,241-247.
- Häder, D. P. (1987). Photosensory behavior in procaryotes. *Microbiological reviews*, 51(1)
- Hartmann, A., M. Singh, y W. Klingmller. (1983). Isolation and characterization of *Azospirillum* mutants excreting high amounts of indoleacetic acid. *Can. J. Microbiol.* 29:916-923.
- Hellingwerf, K.J. (2002). The molecular basis of sensing and responding to light in microorganisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81: 51–59.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 263.
- Henry, C.S., Dejongh, M., Best, A.A., Frybarger, P.M., Linsay, B., Stevens, R.L. (2010). Highthroughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nat. Biotechnol.* 28, 977–982. doi:10.1038/nbt.1672
- Heo, A., Jang, H.J., Sung, J.S., Park, W. (2014). Global Transcriptome and Physiological Responses of *Acinetobacter oleivorans* DR1 Exposed to Distinct Classes of Antibiotics. *PLoS One.* 17:9(10):e110215. doi: 10.1371/journal.pone.0110215. eCollection 2014.
- Hessling, M., Spellerberg, B., y Hoenes, K. (2017). Photoinactivation of bacteria by endogenous photosensitizers and exposure to visible light of different wavelengths—a review on existing data. *FEMS microbiology letters*, 364(2).
- Heulin, T., Guckert, A., y Balandreau, J. (1987). Stimulation of root exudation of rice seedlings by *Azospirillum* strains: carbon budget under gnotobiotic conditions. *Biology and fertility of soils*, 4(1-2), 9-14.
- Hirose, Y., Narikawa, R., Katayama, M., y Ikeuchi, M. (2010). Cyanobacteriochrome CcaS regulates phycoerythrin accumulation in *Nostoc punctiforme*, a group II chromatic adapter. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 8854–8859.

- Hirsch, A., Fang, Y., Asad, S., Kapulnik, Y. (1997). The role of phytohormones in plant-microbe symbioses. *Plant and Soil*. 194:171-184.
- Hot, D., Antoine, R., Renauld-Mongenien, G., Caro, V., Hen-nuy, B., Levillain, E., *et al.* (2003). Differential modulation of *Bordetella pertussis* virulence genes as evidenced by DNA microarray analysis. *Mol Genet Genomics* 269: 475–486
- Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B. (2017). RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. doi:10.1002/wrna.1364
- Hughes J, Lamparter T (1999) Prokaryotes and phytochrome. The connection to chromophores and signaling. *Plant Physiol* 121: 1059–1068
- Jain, D. K., y Patriquin, D. G. (1984). Root hair deformation, bacterial attachment, and plant growth in wheat-*Azospirillum* associations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 48(6), 1208-1213.
- Jiang, Z.Y., Rushing, B.G., Bai, Y., Gest, H., and Bauer, C.E. (1998). Isolation of *Rhodospirillum centenum* mutants defective in phototactic colony motility by transposon mutagenesis. *J Bacteriol* 180: 1248–1255.
- Jiang, Z.Y., Rushing, B.G., Bai, Y., Gest, H., y Bauer, C.E. (1998). Isolation of *Rhodospirillum centenum* mutants defective in phototactic colony motility by transposon mutagenesis. *J Bacteriol* 180: 1248–1255.
- Johnson, R., Harris, V. (1967). Differentiation of pathogenic and saprophytic leptospire. I. Growth at low temperatures. *J Bacteriol*; 94:27–31.
- Kado, C.I., y Hooykaas, P.J. (1991). Molecular mechanisms of crown gall tumorigenesis. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 10(1), 1-32.
- Kanehisa, M., Goto, S., Kawashima, S., Okuno, Y., Hattori, M. (2004). The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res.* 32, 277D–280. doi:10.1093/nar/gkh063
- Kanehisa, M., Goto, S., Sato, Y., Furumichi, M., Tanabe, M. (2012). KEGG for integration and interpretation of large-scale molecular data sets. *Nucleic Acids Res.* 40. doi:10.1093/nar/gkr988
- Kapulnik, Y., Gafni, R., y Okon, Y. (1985a). Effect of *Azospirillum* spp. inoculation on root development and NO₃⁻ uptake in wheat (*Triticum aestivum* cv. *Miriam*) in hydroponic systems. *Can. J. Bot.* 63, 627–631.
- Karatan, E., y Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310-347.
- Katupitiya, S., Millet, J., Vesk, M., Viccars, L., Zeman, A., Lidong, Z., Elmerich, C. y Kennedy, I. R. (1995). A mutant of *Azospirillum brasilense* Sp7 impaired in flocculation with a modified colonization pattern and superior nitrogen fixation in association with wheat. *Appl Environ Microbiol* 61, 1987-1995.
- Kaushik, R., Saxena, A., y Tilak, K. V. B. R. (2002) Can *Azospirillum* strains capable of growing at a sub-optimal temperature perform better in field-grown-wheat rhizosphere. *Biology and fertility of soils*, 35(2), 92-95.
- Kehoe, D.M., y Grossman, A.R. (1996). Similarity of achromatic adaptation sensor to phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273: 1409–1412

- Kiang, N.Y., Siefert, J., Govindjee, Blankenship, R.E. (2007). Spectral signatures of photosynthesis. I. Review of Earth organisms. *Astrobiology* 7:222–251.
- Kikuchi, G., Yoshida, T., y Noguchi, M. (2005). Heme oxygenase and heme degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 338(1), 558-567.
- Kircher, M., Kelso, J. (2010). High-throughput DNA sequencing--concepts and limitations. *Bioessays* 32, 524–536. doi:10.1002/bies.200900181
- Klimke, W., O'Donovan, C., White, O., Brister, J.R., Clark, K., Fedorov, B., Mizrachi, I., Pruitt, K.D., Tatusova, T. (2011). Solving the Problem: Genome Annotation Standards before the Data Deluge. *Stand. Genomic Sci.* 5, 168–193. doi:10.4056/sigs.2084864
- Kloepper, J. (1993). Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. In: *Soil Microbial Ecology* (Ed) F. B. Metting Jr. 255-274. Springer Verlag. Germany.
- Kloepper, J., Lifshitz R. y Zablutowicz R. (1989). Free-living bacteria inocula for enhancing crop productivity. *Trends. Biotechnol.* 7: 39-44.
- Knapp, S., y Mekalanos, J.J. (1988). Two trans-acting reg-ulatory genes (*vir* and *mod*) control antigenic modulation in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol* 170: 5059–5066.
- Kolb, W., y Martin, P. (1985). Response of plant roots to inoculation with *Azospirillum brasilense* and to application of indole acetic acid. In *Azospirillum* III (pp. 215-221). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Kolling, R., Lother, H. (1985). *AsnC*: An autogenously regulated activator of asparagine synthetase A transcription in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 164:310–315.
- Koren, S., Treangen, T.J., Hill, C.M., Pop, M., Phillippy, A.M. (2014). Automated ensemble assembly and validation of microbial genomes. *BMC Bioinformatics* 15. doi:10.1186/1471-2105-15-126
- Kraiselburd, I., Alet, A.I., Tondo, M.L., Petrocelli, S., Daurelio, L.D., Monzón, J., y Orellano, E.G. (2012). A LOV protein modulates the physiological attributes of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* relevant for host plant colonization. *PLoS one*, 7(6), e38226-e38226.
- Kram, K.E., Finkel, S.E. (2015). Rich medium composition affects *Escherichia coli* survival, glycation, and mutation frequency during long-term batch culture. *Appl Environ Microbiol* 81:4442–4450. doi:10.1128/AEM.00722-15.
- Krieg, N. R. (1977). Taxonomic studies of *Spirillum lipoferum*, p. 463-472. En A. Hollander (ed.), *Genetic engineering for nitrogen fixation*. Plenum Press. New York.
- Krueger, J. H., y Walker, G. C. (1984). *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR*⁺-dependent fashion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(5), 1499-1503.
- Kucey, R. M. N. (1988). Alteration of size of wheat root systems and nitrogen fixation by associative nitrogen-fixing bacteria measured under field conditions. *Can. J. Microbiol.* 34:735-739.
- Kumar, S., Kateriya, S., Singh, V. S., Tanwar, M., Agarwal, S., Singh, H. y Tripathi, A. K. (2012). Bacteriophytochrome controls carotenoid-independent response to photodynamic stress in a non-photosynthetic rhizobacterium, *Azospirillum brasilense* Sp7. *Scientific reports*, 2.

- Kumar, S., Stecher, Glen., Koichiro Tamura. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*; 33 (7): 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Laria, G., Fernandez R., y Hidalgo, J. (2003). Fiagro San Salvador. <http://www.fiagro.org.sv/archivos/o/431.pdf>.
- Laub, M.T., Goulian, M. (2007). Specificity in two-component signal transduction pathways. *Annu Rev Genet*;41:121–145. [PubMed: 18076326]
- Lavi, R., Sinyakov, M., Samuni, A., Shatz, S., Friedmann, H., Shainberg, A., Breitbart, H. and Lubart, R. (2004). ESR detection of 1O₂ reveals enhanced redox activity in illuminated cell cultures. *Free Radic Res* 38, 893–902.
- Lavrinenko, K., Chernousova, E., Gridneva, E., Galina Dubinina, Vladimir Akimov, Jan Kuever, Anatoly Lysenko, and Margarita Grabovich. (2010). *Azospirillum thiophilum* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from a sulfide spring” 60:2832-2837.
- Leichert, L., C. Scharf, y M. Hecker. (2003). Global characterization of disulfide stress in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185:1967–1975.
- Levanony, H., and Bashan, Y. (1989). Enhancement of cell division in wheat root tips and growth of root elongation zone induced by *Azospirillum brasilense* Cd. *Can. J. Bot.* 67, 2213–2216.
- Li, H., Ruan, J., Durbin, R. (2008). Mapping short DNA sequencing reads and calling variants using mapping quality scores. *Genome Res.* 18, 1851–1858. doi:10.1101/gr.078212.108
- Li, R., Li, Y., Kristiansen, K., Wang, J. (2008). SOAP: Short oligonucleotide alignment program. *Bioinformatics* 24, 713–714. doi:10.1093/bioinformatics/btn025
- Liao, Y.C., Lin, H.H., Sabharwal, A., Haase, E.M., Scannapieco, F.A. (2015). MyPro: A seamless pipeline for automated prokaryotic genome assembly and annotation. *J. Microbiol. Methods* 113, 72–74. doi:10.1016/j.mimet.2015.04.006
- Lin, S. Y., Hameed, A., Liu, Y. C., Hsu, Y. H., Lai, W. A., Shen, F. T., y Young, C. C. (2015). *Azospirillum soli* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from agricultural soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 65(12), 4601-4607.
- Lin, S. Y., Liu, Y. C., Hameed, A., Hsu, Y. H., Huang, H. I., Lai, W. A., y Young, C. C. (2016). *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from cultivated soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(3), 1453-1458.
- Lin, S. Y., Liu, Y. C., Hameed, A., Hsu, Y. H., Lai, W. A., Shen, F. T., y Young, C. C. (2013). *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(10), 3762-3768.
- Lin, S. Y., Shen, F. T., Young, L. S., Zhu, Z. L., Chen, W. M., y Young, C. C. (2012). *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(5), 1185-1190.
- Lin, S. Y., Young, C. C., Hupfer, H., Siering, C., Arun, A. B., Chen, W. M., & Yassin, A. F. (2009). *Azospirillum picis* sp. nov., isolated from discarded tar. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(4), 761-765.

- Lipovsky, A., Nitzan, Y., y Lubart, R. (2008). A possible mechanism for visible light-induced wound healing. *Lasers Surg Med* 40, 509–514.
- Lipovsky, A., Nitzen, Y., Friedmann, H. y Lubart, R. (2009). Sensitivity of *Staphylococcus aureus* strains to broadband visible light. *Photochem Photobiol* 85, 255–260.
- Lipovsky, A., Nitzen, Y., Gedanken, A. y Lubart, R. (2010). Visible light-induced killing of bacteria as a function of wavelength: implication for wound healing. *Lasers Surg Med* 42, 467–472.
- Lister, R., Gregory, B.D., Ecker, J.R. (2009). Next is now: new technologies for sequencing of genomes, transcriptomes and beyond. *Current opinion in plant biology*. 12(2):107-118. doi:10.1016/j.pbi.2008.11.004.
- Liu, W., Yu, Y. H., Cao, S. Y., Niu, X. N., Jiang, W., Liu, G. F. *et al.* (2013). Transcriptome profiling of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* grown in minimal medium MMX and rich medium NYG. *Research in microbiology*, 164(5), 466-479.
- Lugtenberg, B. J., Dekkers, L., y Bloemberg, G. V. (2001). Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 39, 461–490. doi: 10.1146/annurev.phyto.39.1.461
- Lupwayi, N. Z., Rice, W. A., y Clayton, G. W. (1998). Soil microbial diversity and community structure under wheat as influenced by tillage and crop rotation. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(13), 1733-1741.
- Maclean, M., MacGregor, S.J., Anderson, J.G., Woolsey, G. (2008b). High-intensity narrow-spectrum light inactivation and wavelength sensitivity of *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 2008b;285:227–32.
- Magoc, T., Pabinger, S., Canzar, S., Liu, X., Su, Q., Puiu, D., Tallon, L.J., Salzberg, S.L. (2013). GAGE-B: An evaluation of genome assemblers for bacterial organisms. *Bioinformatics* 29, 1718–1725. doi:10.1093/bioinformatics/btt273
- Malhotra, M. y Srivastava, S. (2009). Stress-responsive indole-3-acetic acid biosynthesis by *Azospirillum brasilense* SM and its ability to modulate plant growth. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), pp.73–80. acid biosy. *European Journal of Soil Biology*, 45(1), pp.73–80.
- Marchler-Bauer, A., Zheng, C., Chitsaz, F., Derbyshire, M.K., Geer, L.Y., Geer, R.C., Gonzales, N.R., Gwadz, M., Hurwitz, D.I., Lanczycki, C.J., Lu, F., Lu, S., Marchler, G.H., Song, J.S., Thanki, N., Yamashita, R.A., Zhang, D., Bryant, S.H. (2013). CDD: Conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 41. doi:10.1093/nar/gks1243
- Marguerat, S., y Bähler, J. (2010). RNA-seq: from technology to biology. *Cellular and molecular life sciences*, 67(4), 569-579.
- Margulies, M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A., Berka, J., Braverman, M.S., Chen, Y., Chen, Z., Dewell, B., Du, L., Fierro, J.M., Gomes, X. V, Goodwin, B.C., et al. (2006). Genome Sequencing in Open Microfabricated High Density Picoliter Reactors. *Nat. Biotechnol.* 437, 376–380. doi:10.1038/nature03959. Copyright.
- Markowitz, V.M., Chen, I.M.A., Palaniappan, K., Chu, K., Szeto, E., Grechkin, Y., Ratner, A., Jacob, B., Huang, J., Williams, P., Huntemann, M., Anderson, I., Mavromatis, K., Ivanova, N.N., Kyrpides, N.C. (2012). IMG: The integrated microbial genomes database and comparative analysis system. *Nucleic Acids Res.* 40. doi:10.1093/nar/gkr1044

- Martínez-Morales, L. J., Soto-Urzuía, L., Baca, B. E., y Sánchez-Ahédo, J. A. (2003). Indole-3-butyric acid (IBA) production in culture medium by wild strain *Azospirillum brasilense*. FEMS Microbiology Letters, 228(2), 167-173.
- Maxam, M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 74, 560–4. doi:10.1073/pnas.74.2.560
- Mehnaz, S. Weselowski, B., y Lazarovits G. (2007-1). *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. Int J Syst Evol Microbiol 57, 620-624.
- Metz, S., Haberzettl, K., Frühwirth, S., Teich, K., Hasewinkel, C., Klug, G. (2012). Interaction of two photoreceptors in the regulation of bacterial photosynthesis genes. Nucleic Acids Res. 40:5901–5909.
- Metzker, M.L. (2010). Sequencing technologies - the next generation. Nat. Rev. Genet. 11, 31–46.
- Meyer, F., Overbeek, R., Rodriguez, A. (2009). FIGfams: Yet another set of protein families. Nucleic Acids Res. 37, 6643–6654. doi:10.1093/nar/gkp698
- Meyers, B. C., Tej, S. S., Vu, T. H., Haudenschild, C. D., Agrawal, V., Edberg, S. B., y Decola, S. (2004). The use of MPSS for whole-genome transcriptional analysis in Arabidopsis. Genome research, 14(8), 1641-1653.
- Michiels, K. W., Croes, C. L., y Vanderleyden, J. (1991) Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. Microbiology, 137(9), 2241-2246.
- Micucci, F.G., Díaz-Zorita, M., Baliña, R.M., Fernández Canigia, M.V. (2010). Productividad de cultivos de maíz con tratamientos de semillas con *Azospirillum brasilense* (Trabajo publicado en el IX Congreso Nacional de Maíz. Rosario, Santa Fe).
- Mironova, R., Niwa, T., Handzhiyski, Y., Sredovska, A., y Ivanov, I. (2005). Evidence for non-enzymatic glycosylation of *Escherichia coli* chromosomal DNA. Molecular microbiology, 55(6), 1801-1811.
- Mizuno, T., Kaneko, T., Tabata, S. (1996). Compilation of all genes encoding bacterial two-component signal transducers in the genome of the cyanobacterium, *Synechocystis* sp. strain PCC 6803. DNA Res. 3:407–414.
- Mo, M., Yokawa, K., Wan, Y., y Baluška, F. (2015). How and why do root apices sense light under the soil surface?. Frontiers in plant science, 6, 775.
- Mochida, K., y Shinozaki, K. (2011). Advances in omics and bioinformatics tools for systems analyses of plant functions. Plant and Cell Physiology, 52(12), 2017-2038.
- Moens, S., Michiels, K., Keijers, V., Van Leuven, F. R. E. D., y Vanderleyden, J. (1995). Cloning, sequencing, and phenotypic analysis of *laf1*, encoding the flagellin of the lateral flagella of *Azospirillum brasilense* Sp7. Journal of bacteriology, 177(19), 5419-5426.
- Molina, R., Obando, D., Torres, D., Rivera, D., Cassán, F. (2014). Utilización de un medio de cultivo para la cuantificación y la diferenciación de bacterias presentes en la misma formulación. Libro de resúmenes digital. Pp. 249.
- Molina, R., Rivera, D., Mora, V., López, G., Rosas, S., Spaepen, *et al.* (2018). Regulation of IAA biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. Current microbiology, 75(10), 1408-1418.

- Molina-Favero, C., Creus, C. M., Simontacchi, M., Puntarulo, S., y Lamattina, L. (2008). Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(7), 1001-1009.
- Morgenstern, E., y Okon, Y. (1987). The effect of *Azospirillum brasilense* and auxin on root morphology in seedlings of *Sorghum bicolor* × *Sorghum sudanense*. *Arid Land Research and Management*, 1(2), 115-127.
- Mortazavi, A., Williams, B.A., McCue, K., Schaeffer, L., Wold, B. (2008). Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat. Methods* 5, 621–628. doi:10.1038/nmeth.1226
- Müeller, K., González, J.E. (2011). Complex regulation on symbiotic functions is coordinated by MucR and quorum sensing in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 193, 485–496.
- Müller, M., Deigele, C., y Ziegler, H. (1989). Hormonal interactions in the rhizosphere of maize (*Zea mays* L.) and their effects on plant development. *Zeitschrift für Pflanzenernährung und Bodenkunde*, 152(2), 247-254.
- Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Murray, R.G., y Stackebrandt, E. (1995). "Taxonomic note: implementation of the provisional status Candidatus for incompletely described procaryotes." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45:186-187.
- Murthy, M. G., y, J. K. Ladha. (1988). Influence of *Azospirillum* inoculation on the mineral uptake and growth of rice under hydroponic conditions. *Plant Soil* 108:281-285.
- Nagalakshmi, U., Wang, Z., Waern, K., Shou, C., Raha, D., Gerstein, M., Snyder, M. (2008). The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science* (80-.).320, 1344–1349. doi:10.1126/science.1158441
- Nealson, K.H. y Hastings, J.W. (1979). Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiological reviews*, 43(4), pp.496-518.
- Neyra, C.A., Atkinson, A. y Olubayi, O. (1995). Coaggregation of *Azospirillum* with other bacteria: basis for functional diversity. *NATO ASI Ser. G* 37, 429^439.
- Nikitina, V.E., Ponomareva, E.G., Alenkina, S.A., y Konnova, S.A. (2001). The role of cell-surface lectins in the aggregation of azospirilla. *Microbiology (Moscow, Russ. Ed.)*, 70: 408–412.
- Nocq, J., Celton, M., Gendron, P., Lemieux, S., Wilhelm, B.T. (2013). Harnessing virtual machines to simplify next-generation DNA sequencing analysis. *Bioinformatics* 29, 2075–2083. doi:10.1093/bioinformatics/btt352
- Noguchi, H. (1918). Further study on the cultural conditions of *Leptospira* (Spirochaeta) Icterohaemorrhagiae. *J Exp Med*;27:593– 608.
- Nonaka, G., Blankschien, M., Herman, C., Gross, C.A., Rhodius, V.A. (2006). Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor, sigma32, reveals a multifaceted cellular response to heat stress, *Genes Dev.*, vol. 20 (pg. 1776-1789)
- Nur, I., Okon, Y., y Henis Y. (1980). Comparative studies of nitrogen-fixing bacteria associated with grasses in Israel with *Azospirillum brasilense*. *Can. J. Microbiol.* 26, 714-718.

- Oberpichler, I., Rosen, R., Rasouly, A., Vugman, M., Ron, E. Z., y Lamparter, T. (2008). Light affects motility and infectivity of *Agrobacterium tumefaciens*. *Environmental microbiology*, 10(8), 2020-2029.
- Okon, Y. (1985). *Azospirillum* as a potential inoculant for agriculture. *Trends Biotechnol.* 3: 223-228.
- Okon, Y., Albrecht, S. y Burris, R. (1976). Carbon and ammonia metabolism of *Spirillum lipoferum*. *J. Bacteriol.* 128: 592-597.
- Okon, Y., Heytler, P. G., y Hardy, R. W. F. (1983). N₂ fixation by *Azospirillum brasilense* and its incorporation into host *Setaria italica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 46(3), 694-697.
- Okon, Y., y Kapulnik, Y. (1986). Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. *Plant and soil*, 90(1-3), 3-16.
- Ona, O., Smets I, Gysegom P, Bernaerts K, Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J. (2003). The effect of pH on indole-3- acetic acid (IAA) biosynthesis of *Azospirillum brasilense* sp7. *Symbiosis* 35: 199–208
- Ona, O., van Impe J, Prinsen E, Vanderleyden J. (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmentally controlled. *FEMS Microbiol. Lett* 246:125–132.
- O'toole, G. A., y Kolter, R. (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295-304.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J. V., Chuang, H.Y., Cohoon, M., *et al.* (2005). The subsystems approach to genome annotation and its use in the project to annotate 1000 genomes. *Nucleic Acids Res.* 33, 5691–5702. doi:10.1093/nar/gki866
- Ozsolak, F., y Milos, P. M. (2011). RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature reviews genetics*, 12(2), 87-98.
- Pal, S., Tak, Y.K., Joarder, J., Kim, W., Lee, J.E., Han, M.S. and Song, J.M. (2009). Nanocrystalline silver supported on activated carbon matrix from hydrosol: antibacterial mechanism under prolonged incubation temperatures. *J Nanosci Nanotechnol* 9, 2092–2103.
- Pankievicz, V. C. S., Camilios-Neto, D., Bonato, P., Balsanelli, E., Tadra-Sfeir, M. Z., Faoro, *et al.* (2016). RNA-seq transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* colonizing wheat (*Triticum aestivum*) roots. *Plant molecular biology*, 90(6), 589-603.
- Paredes-Cardona, E., Carcaño-Montiel, M., Mascarúa-Esparza, M., y Caballero-Mellado, J. (1988). Respuesta del maíz a la inoculación con *Azospirillum brasilense*. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 30: 351-355.
- Park, S. C., Pham, B. P., Jia, B., Lee, S., Yu, R., Han, S. W. *et al* (2008). Structural and functional characterization of osmotically inducible protein C (OsmC) from *Thermococcus kodakaraensis* KOD1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1784(5), 783-788.
- Patel, H.K., Suárez-Moreno, Z.R, Degrassi, G., Subramoni, S., González, J.F., Venturi, V. (2013). Bacterial LuxR solos have evolved to respond to different molecules including signals from plants. *Frontiers in Plant Science*. 2013; 4:447. doi:10.3389/fpls.2013.00447.
- Patten, C.L., y Glick, B.R. (2002). Regulation of indoleacetic acid production in *Pseudomonas putida* GR12-2 by tryptophan and the stationary-phase sigma factor RpoS. *Can. J. Microbiol.* 48, 635–642.

- Paul, K., Nieto, V., Carlquist, W.C., Blair, D.F., and Harshey, R.M. (2010). The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a 'backstop brake' mechanism. *Mol Cell* 38: 128–139
- Peng, G., Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y., Wang, E. T., y Tan, Z. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 12631271.
- Pereg, L. (2015). *Azospirillum* Cell Aggregation, Attachment, and Plant Interaction. In: Cassán F., Okon Y., Creus C. (eds) *Handbook for Azospirillum*. Springer, Cham
- Perrig, D., Boiero, M. L., Masciarelli, O. A., Penna, C., Ruiz, O. A., Cassan, F. D., y Luna, M. V. (2007). Plant-growth-promoting compounds produced by two agronomically important strains of *Azospirillum brasilense*, and implications for inoculant formulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 11431150.
- Platko, J.V., Willins, D.A., Calvo, J.M. (1990). The *ilvIH* operon of *Escherichia coli* is positively regulated. *J Bacteriol* 172:4563–4570.
- pleomorphism and aggregation. *Symbiosis* 13,291-305.
- Preininger, C., Sauer, U., Bejarano, A., y Berninger, T. (2018). Concepts and applications of foliar spray for microbial inoculants. *Applied microbiology and biotechnology*, 102(17), 7265-7282.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., y Van Onckelen, H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions*,6, 609-609.
- Prouty, A. M., Schwesinger, W. H., y Gunn, J. S. (2002). Biofilm Formation and Interaction with the Surfaces of Gallstones by *Salmonella* spp. *Infection and immunity*, 70(5), 2640-2649.
- Puente, M. L., Gualpa, J. L., Lopez, G. A., Molina, R. M., Carletti, S. M., y Cassán, F. D. (2017). The benefits of foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* in soybean are explained by an auxin signaling model. *Symbiosis*, 1-9.
- Puente, M. L., Zawoznik, M., de Sabando, M. L., Perez, G., Gualpa, J. L., Carletti, S. M., y Cassán, F. D. (2018). Improvement of soybean grain nutritional quality under foliar inoculation with *Azospirillum brasilense* strain Az39. *Symbiosis*, 1-7.
- Puente, M., Li C, Bashan Y. (2004). Microbial populations and activities in the rhizoplane of rock-weathering desert plants. II. Growth promotion of cactus seedlings. *Plant Biol* 6: 643-650.
- Puente, M., Montecchia, M. y Peticari, A. (2005). Evaluation of *Azospirillum* inoculant strains in wheat. En: *Abstracts 7th International Wheat Conference*, Pp. 211.
- Purcell, E.B., Siegal-Gaskins, D., Rawling, D.C., Fiebig, A., y Crosson, S. (2007). A photosensory two-component system regulates bacterial cell attachment. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 18241–18246.
- Purcell, E.B., y Crosson, S. (2008). *Curr Opin Microbiol* 11(2):168-178. quorum-sensing network of *Pseudomonas aeruginosa*.
- Quail, P. H. (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3(2), 85-93.

- Ragatz, L., Jiang, Z.Y., Bauer, C.E., y Gest, H. (1995). Macroscopic phototactic behavior of the purple photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Arch Microbiol* 163: 1–6.
- Raghavan, V., y Groisman, E. A. (2010). Orphan and hybrid two-component system proteins in health and disease. *Current opinion in microbiology*, 13(2), 226-231.
- Ramos, H.C., Rumbo, M., y Sirard, J.C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends Microbiol* 12: 509–517.
- Ratliff, M., Zhu, W., Deshmukh, R., Wilks, A., y Stojiljkovic, I. (2001). Homologues of Neisserial Heme Oxygenase in Gram-Negative Bacteria: Degradation of Heme by the Product of the *pigA* Gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6394–6403. <http://doi.org/10.1128/JB.183.21.6394-6403.2001>
- Reed, M.L.E. y Glick, B.R. (2004) Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 86 (1), 1–25.
- Reinhold, B. T., Hurek, I., Fendrik, B., Pot, M., Gillis, K., Kersters, S., Thielemans y J. De Ley. (1987). *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37:43-51. resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Res* 32 (Database issue): pp.
- Richardson, A. E., Barea, J. M., McNeill, A. M., y Prigent-Combaret, C. (2009). Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and soil*, 321(1-2), 305-339.
- Rivera, D., Revale, S., Molina, R., Gualpa, J., Puente, M., Maroniche, et al. (2014). Complete genome sequence of the model rhizosphere strain *Azospirillum brasilense* Az39, successfully applied in agriculture. *Genome announcements*, 2(4), e00683-14.
- Rodrigue, A., Quentin, Y., Lazdunski, A., Méjean, V., y Foglino, M. (2000). Cell signalling by oligosaccharides. Two-component systems in *Pseudomonas aeruginosa*: why so many?. *Trends in microbiology*, 8(11), 498-504.
- Rodríguez Cáseres, E. (1982). Improved medium for isolation of *Azospirillum* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 44:990- 991.
- Römling, U., Galperin, M.Y., Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial secondary messenger. *Microbiol Mol Biol Rev* 77:1–52
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlén, M., Nyrén, P. (1996). Real-Time DNA Sequencing Using Detection of Pyrophosphate Release. *Anal. Biochem.* 242, 84–89. doi:10.1006/abio.1996.0432
- Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyrén, P. (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281, 363, 365. doi:10.1126/science.281.5375.363
- Ross, S. J., Findlay, V. J., Malakasi, P., y Morgan, B. A. (2000). Thioredoxin Peroxidase Is Required for the Transcriptional Response to Oxidative Stress in Budding Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 11(8), 2631–2642.
- Ryjenkov, D.A., Simm, R., Römling, U., and Gomelsky, M. (2006). The PilZ domain is a receptor for the second messenger c-di-GMP: the PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *J Biol Chem* 281: 30310–30314.

- Ryter, S. W., Otterbein, L. E., Morse, D., y Choi, A. M. (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Molecular and cellular biochemistry*, 234(1), 249-263.
- Ryu, M. H., Fomicheva, A., O'Neal, L., Alexandre, G., y Gomelsky, M. (2017). Using light-activated enzymes for modulating intracellular c-di-GMP levels in bacteria. In *c-di-GMP Signaling* (pp. 169-186). Humana Press, New York, NY.
- Ryu, M.H., Fomicheva, A., Moskvina, O.M., Gomelsky, M. (2017). Optogenetic module for dichromatic control of c-di-GMP signaling. *J. Bacteriol* pii: JB.00014-17. doi: 10.1128/JB. 00014-17. [Epub ahead of print]
- Sadasivan, L. y Neyra, C.A. (1985). Flocculation in *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: exopolysaccharides and cyst formation. *J. Bacteriol.* 163, 716-723
- Sadasivan, L., y Neyra, C.A. (1987). Cyst production and brown pigment formation in aging cultures of *Azospirillum brasilense* ATCC 29145. *Journal of Bacteriology*, 169(4), pp.1670–1677.
- Saitou, N., y Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Saleh, S.S. y Glick, B.R. (2001). Involvement of *gacS* and *rpoS* in enhancement of the plant growth-promoting capabilities of *Enterobacter cloacae* CAL2 and UW4. *Can. J. Microbiol.* 47, 698–705.
- Salkowski, E., (1885). Ueber das verhalten der skatolcarbonsäure im organismus. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 9(1), 23-33.
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2
- Sanger, F., Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94. doi:10.1016/0022-2836(75)90213-2
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 74, 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463.
- Savakis, P., De Causmaecker, S., Angerer, V., Ruppert, U., Anders, K., Essen, L.O., Wilde, A. (2012). Light-induced alteration of c-di-GMP level controls motility of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Mol. Microbiol.* 85:239 –251. 188.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W., Brown, P.O. (1995). Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science* (80-). 270, 467–470. doi:10.1126/science.270.5235.467
- Schikora, A., Schenk, S. T., Stein, E., Molitor, A., Zuccaro, A., Kogel, K. H. (2011). N-acyl-homoserine lactone confers resistance toward biotrophic and hemibiotrophic pathogens via altered activation of AtMPK6. *Plant Physiol.* 157 1407–1418. doi:10.1104/pp.111.180604 (PMC free article) (PubMed) (Cross Ref)
- Schmitt, M. P. (1997). Utilization of host iron sources by *Corynebacterium diphtheriae*: identification of a gene whose product is homologous to eukaryotic heme oxygenases and is required for acquisition of iron from heme and hemoglobin. *Journal of Bacteriology*, 179(3), 838–845.

- Schneeberger, Cao, J., K., Ossowski, S., Günther, T., Bender, S., Fitz, J., y Wang, X. (2011). Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nature genetics*, 43(10), 956-963.
- Seemann, T. (2014). Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
- Seldin, L., Rosado, A. S., da Cruz, D. W., Nobrega, A., van Elsas, J.D., y Paiva, E. (1998). Comparison of *Paenibacillus azotofixans* strains isolated from rhizoplane, rhizosphere and non-root-associated soil from maize planted in two different Brazilian soils. *Applied and Environmental Microbiology*, oct 1998, p 3860-3868. vol 64, N° 10
- Shalon, D., Smith, S. J., y Brown, P. O. (1996). A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome research*, 6(7), 639-645.
- Shan, Z. H. O. U., Si-da, L. I., Heng, D. O. N. G., Ya-guang, Z. H. A. N., y Fan-suo, Z. E. N. G. (2015). Analysis of the expression patterns of BpHO gene induced by abiotic stress and signal in birch. *Journal of Beijing Forestry University*, 11, 008.
- Sheibani-Tezerji, R., Rattei, T., Sessitsch, A., Trognitz, F., y Mitter, B. (2015). Transcriptome profiling of the endophyte *Burkholderia phytofirmans* PsJN indicates sensing of the plant environment and drought stress. *MBio*, 6(5), e00621-15.
- Sheng, L., Tighe, S.W., Nicolet, C.M., Grove, D., Levy, S., Farmerie, W., Viale, A., Wright, C. (2014). Multi-platform assessment of transcriptome profiling using RNA-seq in the ABRF next-generation sequencing study. *Nature Biotechnology* 32, 915–925. doi:10.1038/nbt.2972
- Skerker, J. M., Prasol, M. S., Perchuk, B. S., Biondi, E. G., y Laub, M. T. (2005). Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. *PLoS biology*, 3(10), e334.
- Skerman, V.B.D., Sly, L.I., y Williamson, M.L. (1983). "*Conglomeromonas largomobilis* gen. nov., sp. nov., a sodium-sensitive, mixed-flagellated organism from fresh waters." *Int. J. Syst. Bacteriol.* 33:300-308.
- Smith H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature* 407:585–591.
- Smith, A.D., Xuan, Z., Zhang, M.Q. (2008). Using quality scores and longer reads improves accuracy of Solexa read mapping. *BMC Bioinformatics* 9. doi:10.1186/1471-2105-9-128
- Smith, R.; Schank, S.; Mac Milan, J. y Baltensperger, A. (1984). Responses of Sorghum and Pennisetum species to the N₂-fixing bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1331-1336.
- Somers, D. J., Isaac, P., y Edwards, K. (2004). A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109(6), 1105-1114.
- Somers, E., Ptacek, D., Gysegom, P., Srinivasan, M., Vanderleyden, J. (2005). *Azospirillum brasilense* produces the auxin-like phenylacetic acid by using the key enzyme for indole-3-acetic acid biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* 71: 1803–1810
- Sorek, R., Cossart, P. (2010). Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat Rev Genet*, 11: 9-16 doi:10.1038/nrg2695

- Soto Sedano, Johana Carolina; López Carrascal, Camilo Ernesto. (2012). RNA-seq: herramienta transcriptómica útil para el estudio de interacciones planta-patógeno. *Fitosanidad*, Agosto-Sin mes, 101-113.
- Southey-Pillig, C.J., Davies, D.G. y Sauer, K. (2005). Characterization of Temporal Protein Production in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *J Bacteriol*, 187(23), pp.8114–8126.
- Spaepen, S., Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., y Vanderleyden, J. (2008). Effects of *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid production on inoculated wheat plants. *Plant Soil* 312: 15–23.
- Spaepen, S., y Vanderleyden, J. (2011). Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(4), a001438.
- Stamm, L. V., y Charon, N. W. (1988). Sensitivity of pathogenic and free-living *Leptospira* spp. to UV radiation and mitomycin C. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(3), 728-733.
- Steenhoudt, O., y Vanderleyden, J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 487–506. doi:10.1111/j.1574-6976.2000.tb00552.x
- Strzelczyk, E., Kamper, M. y Li, C. (1994). Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149:55-60
- Subramoni, S., y Venturi, V. (2009). LuxR-family “solos”: Bachelor sensors/regulators of signalling molecules. *Microbiology*, 155(5), pp.1377-1385.
- Sun Q., Yoda K., Suzuki H. (2005). Internal axial light conduction in the stems and roots of herbaceous plants. *J. Exp. Bot.* 56, 191–203. 10.1093/jxb/eri019
- Sun Q., Yoda K., Suzuki M., Suzuki H. (2003). Vascular tissue in the stem and roots of woody plants can conduct light. *J. Exp. Bot.* 54, 1627–1635. 10.1093/jxb/erg167
- Sun, P.F., Fang W.T., Shin L.Y., Wei J.Y., Fu S.F., Chou J.Y. (2014). Indole-3-Acetic Acid-producing yeasts in the phyllosphere of the carnivorous plant *Drosera indica* L. *PLoS ONE* 9(12): e114196. doi:10.1371/journal.pone.0114196
- Swain, M.T., Tsai, I.J., Assefa, S.A., Newbold, C., Berriman, M., Otto, T.D. (2012). A postassembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nat. Protoc.* 7, 1260–1284. doi:10.1038/nprot.2012.068
- Swartz, T.E., Tseng, T.S., Frederickson, M.A., Paris, G., Comerci, D.J., Rajashekara, G., Kim, J.G., Mudgett, M.B., Splitter, G.A., Ugalde, R.A., Goldbaum, F.A., Briggs, W.R., Bogomolni, R.A. (2007). Blue-light-activated histidine kinases: two-component sensors in bacteria. *Science* 317:1090–1093.
- Tadra-Sfeir, M. Z., Faoro, H., Camilios-Neto, D., Brusamarello-Santos, L., Balsanelli, E., Weiss, V., Baura, V., Wassem, R., Cruz, M, Pedrosa, F., Souza, E., y Monteiro, R. (2015). Genome wide transcriptional profiling of *Herbaspirillum seropedicae* SmR1 grown in the presence of naringenin. *Frontiers in microbiology*, 6, 491.
- Tang, H., Braun, T. F., & Blair, D. F. (1996). Motility protein complexes in the bacterial flagellar motor. *Journal of molecular biology*, 261(2), 209-221.

- Tarrand, J. J., N. R. Krieg, y J. Döbereiner. (1979). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24:967-980.
- Tarutina, M., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, M. (2006). An unorthodox bacteriophytochrome from *Rhodobacter sphaeroides* involved in turnover of the second messenger c-di-GMP. *J Biol Chem* 281:34751–34758
- Tester, M., Morris, C. (1987). The penetration of light through soil. *Plant Cell Environ.* 10, 281–286. 10.1111/j.1365-3040.1987.tb01607.x
- Tien, T.M., Gaskins, M.H. y Hubbell, D.H. (1979). Plant growth substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of pearl millet (*Pennisetum americanum* L.). *Applied and environmental microbiology*, 37(5), pp.1016–1024
- Tyagi, S. y Singh, D.K. (2014). "*Azospirillum himalayense* sp. nov., a nifH bacterium isolated from Himalayan valley soil, India." *Ann. Microbiol.* 64: 259-266.
- van der Horst, M. A., Key, J., y Hellingwerf, K. J. (2007). Photosensing in chemotrophic, non-phototrophic bacteria: let there be light sensing too. *Trends in microbiology*, 15(12), 554-562.
- van der Horst, M. A., y Hellingwerf, K. J. (2004). Photoreceptor proteins, “star actors of modern times”: a review of the functional dynamics in the structure of representative members of six different photoreceptor families. *Accounts of chemical research*, 37(1), 13-20.
- Van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F. *et al.* (2011). Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. *Microb Ecol* (2011) 61:723–728. DOI 10.1007/s00248-011-9819-6.
- Vande Broek, A., Gysegom P, Ona O, Hendrickx N, Prinsen E, Van Impe J y Vanderleyden J. (2005). Transcriptional Analysis of the *Azospirillum brasilense* Indole-3-Pyruvate decarboxylase gene and identification of a cis-acting sequence involved in auxin responsive expression. *MPMI* 18 (4): 311-323
- Vande Broek, A., Lambrecht, M., Eggermont, K. y Vanderleyden, J. (1999). Auxins up-regulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 181, 1338–1342.
- Vanneste, S., y Friml, J. (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136(6), 1005-1016.
- Vanstockem, M., Michiels, K., Vanderleyden, J., Van Gool, A. (1987). Anspoon mutagenesis of *Azospirillum brasilense* and *Azospirillum lipoferum*: ysisal analysis of Tn5 and Tn5-mob insertion mutants. *Applied and vironmental Microbiology* 53: 410–415.
- Vierstra, R. D. y Davis, S. J. (2000). Bacteriophytochromes: new tools for understanding phytochrome signal transduction. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 11, 511±521.
- Vishwakarma, D., Thakur, J. K., y Gupta, S. C. (2017). Study of production of indole acetic acid by soil and plant bacterial isolates on different media. *IJCS*, 5(6), 639-641.
- Vogel J. (2014). Differential RNA-seq: the approach behind and the biological insight gained. *Curr Opin Microbiol.*;19:97–105.
- Wadhams, G. H., y Armitage, J. P. (2004). Making sense of it all: bacterial chemotaxis. *Nature reviews Molecular cell biology*, 5(12), 1024.

- Wang, Z., Gerstein, M., y Snyder, M. (2009). RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature reviews genetics*, 10(1), 57-63.
- Ward, J. A., Ponnala L., y Weber. (2012). Strategies for transcriptome analysis in nonmodel plants. *American Journal of Botany* 99 (2): 267 – 276 .
- Watnick, P., y Kolter, R. (2000). Biofilm, city of microbes. *Journal of bacteriology*, 182(10), 2675-2679.
- Wegele, R., Tasler, R., Zeng, Y., Rivera, M., y Frankenberg-Dinkel, N. (2004). The heme oxygenase (s)-phytochrome system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(44), 45791-45802.
- Weiss, A.A., Hewlett, E.L., Myers, G.A., y Falkow, S. (1983) Tn5-induced mutations affecting virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 42: 33–41.
- Weiss, A.A., y Falkow, S. (1984). Genetic analysis of phasechange in *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* 43: 263–269.
- Wild, J., Rossmeißl, P., Walter, W. A., y Gross, C. A. (1996). Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 178(12), 3608-3613.
- Wilde, A., Fiedler, B., y Börner, T. (2002).The cyanobacterial phytochrome Cph2 inhibits phototaxis towards blue light. *Mol Microbiol* 44: 981–988
- Wisniewski-Dyé, F., Lozano, L., Acosta-Cruz, E., Borland, S., Drogue, B., Prigent-Combaret, C. et al. (2012). Genome sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and comparative analyses of *Azospirillum* core and accessory genomes provide insight into niche adaptation. *Genes* 3: 576–602.
- Wolfe, A.J., y Visick, K.L. (2008). Get the message out:cyclic-di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *J Bacteriol* 190: 463–475.
- Wong-ekkabut, J., Chadsuthi, S., Triampo, W., Dounghawee, G., Triampo, D., y Krittanai, C. (2009). Leptospirosis research: Response of pathogenic spirochete to ultraviolet-A irradiation. *African Journal of Biotechnology*, 8(14), 3341-3352.
- Woodward, A. W., y Bartel, B. (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of botany*, 95(5), 707-735.
- Woolley, J. T., y Stoller, E. W. (1978). Light penetration and light-induced seed germination in soil. *Plant Physiology*, 61(4), 597-600.
- Wu, L., McGrane, R. S., y Beattie, G. A. (2013). Light regulation of swarming motility in *Pseudomonas syringae* integrates signaling pathways mediated by a bacteriophytochrome and a LOV protein. *MBio*, 4(3), e00334-13.
- Xie, B.E., Xu, K., Zhao, H.X., Chen, S.F.(2005). Isolation of transposon mutants from *Azospirillum brasilense* Yu62 and characterization of genes involved in indole-3-acetic acid biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett* 248:57–63
- Xie, C., y Yokota, A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. Nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from de roots of the rice plant *Oryza satava*. *Int J Syst. Evol. Microbiol.* 55: 1435- 1438; DOI 10.1099/ij.s. 0.65503-0.

- Yang, H., Inokuchi, H., y Adler, J. (1996). Phototaxis away from blue light by an *Escherichia coli* mutant accumulating protoporphyrin IX. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 92(16), 7332–7336.
- Yeh, K.C., Wu, S.H., Murphy, J.T., Lagarias, J.C. (1997). A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. Science 277: 1505–1508.
- Yoshihara, S., y Ikeuchi, M. (2004). Phototactic motility in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. Photochem Photobiol Sci 3: 512–518.
- Young, C., Hupfer H, Siering C, M.-J. Ho, A. B. Arun, W.-A. Lai, P. D. Rekha, F.-T. Shen, M.-H. Hung, W.-M. Chen y A. F. Yassin. (2008). *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. Int J Syst Evol Microbiol.
- Young, J. P. W. (1992). Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. Biological nitrogen fixation, 1544, 43-86.
- Yuan, Z.C., Haudecoeur, .E, Faure, D., Kerr, K.F., Nester, E.W. (2008). Comparative transcriptome analysis of *Agrobacterium tumefaciens* in response to plant signal salicylic acid, indole-3-acetic acid and γ -amino butyric acid reveals signaling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. Cell Microbiol 10:2339–2354
- Zakharova, E. A., Shcherbakov, A. A., Brudnik, V. V., Skripko, N. G., Bulkin, N. S., y Ignatov, V. V. (1999). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in *Azospirillum brasilense*. European journal of biochemistry, 259(3), 572-576
- Zheng, M., X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa, y G. Storz. (2001). DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. J. Bacteriol. 183:4562–4570.
- Zhou, S., Han, L., Wang, Y., Yang, G., Zhuang, L. y Hu, P. (2013). *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. Int J Syst Evol Microbiol 63, 2618–2624.
- Zhou, Yu, Wei Wei, Xu Wang, Lihong Xu y Ren Lai (2009). *Azospirillum palatum* sp. nov., isolated from forest soil in Zhejiang province, China, The Journal of General and Applied Microbiology 55: 1-7.
- Ziegelhoffer, E. C. y Donohue, T. J. (2009). Bacterial responses to photo-oxidative stress. Nat Rev Microbiol. 7, 856–863
- Zimmer, W., Roeben, K., Bothe, H. (1988). An alternative explanation for plant growth promotion by bacteria of the genus *Azospirillum*. Planta 176: 333-342.

NEXO

Anexo 1. Medio Luria Bertani [LB] (Luria Bertani, 1951)

Triptona	10 g.L ⁻¹
Extracto de levadura	5 g.L ⁻¹
NaCl	10 g.L ⁻¹
H ₂ O csp	1000 mL

En caso del medio agarizado, agregar 15 g.L⁻¹ de agar antes de autoclavar. Ajustar el pH del medio a 6.8 usando 0.1N NaOH y llevar el volumen hasta 1 litro con agua destilada.

Anexo 2. Medio LB Rojo Congo [LB-RC] (Molina et al., 2014)

Preparar medio LB y adicionar 15 mL.L⁻¹ de una solución de indicador rojo congo (0.5 g en 200 ml de agua destilada).

Anexo 3. Medio Mínimo MMAB (Vanstockem et al., 1987)

Sn. malato 20X	50 ml
Sn. sales 20X	50 ml
Sn. fosfatos 20X	50 ml
H ₂ O destilada csp.	850 ml

Ajustar el pH del medio a 6.8 usando 0.1N NaOH

Para la preparación de las soluciones por separado:

-Sn malato 20X (pH: 7.6)

Malato	100 g.L ⁻¹
--------	-----------------------

-Sn sales 20X

NH ₄ Cl	20 g.L ⁻¹
MgSO ₄ .2H ₂ O	6 g.L ⁻¹
KCl	3 g.L ⁻¹
CaCl ₂	0.2 g.L ⁻¹

FeSO ₄ .2H ₂ O	50 mg.L ⁻¹
--------------------------------------	-----------------------

-Sn Fosfatos 20X

KH ₂ PO ₄	60 g.L ⁻¹
---------------------------------	----------------------

NaH ₂ PO ₄	20 g.L ⁻¹
----------------------------------	----------------------

Una vez preparadas, autoclavar durante 20 min a 1 atm y conservar a 4 ° C.

Anexo 4. Medio Mínimo Rojo Congo [MMAB-RC]

Preparar medio MMAB y adicionar 15 ml.L⁻¹ de una solución de indicador rojo congo (0.5 g en 200 ml de agua destilada).

Anexo 5. Medio Swim

Triptona	10 g.L ⁻¹
----------	----------------------

NaCl	5 g.L ⁻¹
------	---------------------

H ₂ O csp	1000 mL
----------------------	---------

Agar	0,3 p/v
------	---------