

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



Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

**ANÁLISIS GENÓMICO Y FUNCIONAL DE LOS MECANISMOS DE
PROMOCIÓN DEL CRECIMIENTO VEGETAL EN
Bradyrhizobium japonicum E109,
LA CEPA MÁS UTILIZADA PARA LA FORMULACIÓN DE INOCULANTES
PARA SOJA EN LA REPÚBLICA ARGENTINA**

Mic. Daniela Soledad Torres

DIRECTOR: Dr. Fabricio Darío Cassán

Río Cuarto, Córdoba, Argentina

Agosto de 2018

El presente trabajo para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta- Microorganismo, Departamento de Naturales, Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Doctorando: Mic. Daniela Soledad Torres

Director de Tesis: Dr. Fabricio Darío Cassán

Comisión de Tesis:

Dr. Leonardo Erijman

Dr. Ramiro Lascano

Dr. Javier Andrés

Agosto de 2018

DEDICATORIA

**A Vera y Luciano.
Todo lo que hago, es por ustedes.
Los amo con todo lo que soy.**

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis comenzó hace cinco años atrás, por lo cual son muchas las personas involucradas a las cuales agradecer:

- A mi Director, **Fabricio**, por la confianza en este proyecto, por la oportunidad (una vez más), y por todas las etapas que hemos atravesado que nos han hecho crecer en lo personal y profesional.
- A los miembros del jurado, **Leonardo, Ramiro y Javier**, por su profesionalismo y la guía para poder llevar a cabo esta tesis doctoral.
- A la **Universidad Nacional De Río Cuarto y CONICET**, por ofrecerme el espacio físico y los medios necesarios para la realización de esta tesis.
- Al **Laboratorio de Fisiología Vegetal y de la Interacción Planta-Microorganismo; Diego, Romi, Melissa, Jose, Vero, Anita y Gastón** por el día a día, los mates, las risas y el apoyo en lo profesional. Con ustedes es más fácil lo rutinario. Especialmente a **Jose Gualpa**, porque me acompañó en los momentos más difíciles y eso significo mucho para mí, encontrando un amigo.
- A **Melina Talano**, por su disponibilidad, colaboración y profesionalismo.
- A los Doctores que colaboraron en mi estadía en España y Brasil: **Paco Martínez-Abarca Pastor, Félix Aguirre, Rafael Niza Martínez, Lola Molina, Emanuel de Souza, Anelis Marin y Mariana Grillo**.
- A **Ili Benavidez**, por su aporte en el laboratorio.
- A mi Familia:
 - A **Mamá y Papá**, por ustedes soy quien soy. Gracias por el amor y la educación. Los extraño siempre.
 - A mis hermanas, **Gaby y Loly**, siempre están para mí sin importar nada.
 - A mis sobrinos, **Isaías, Sophia, Santiago y Santino**. Son un pedacito de cielo en la tierra.
 - A **Milo y Benicio**, perderlos fue una de las cosas más difíciles de mi vida. Me enseñaron tanto. Los amo profundamente.
 - A mi **Tío Jorge**. Te extraño todos los días, me cuesta aceptar que ya no estas para abrazarnos como solíamos hacerlo. Siempre vas a estar en mí y a mi hija le voy hablar de vos.
 - A mi familia política, **Liti, Sandra, Pocho, Olga y Esmeralda**, porque siempre están conmigo.

- A mis amigos, la vida es más linda acompañada de ustedes; **Matías S., Estefi, Laurita, Diana, Iris, Eli, Marina, Matías F., Eri, Vinchu, Luci L., Mari, Fede, Luci G., y Belu.**
- A mi esposo **Luciano**, por aguantarme (no es tarea fácil). Verte llegar a casa es lo más lindo de mi día. Te amo, siempre.
- A mi hija **Vera**, sos lo más hermoso de esta vida. Tu sonrisa pone mi mundo a andar. Te amo profundamente.

RESUMEN

En esta tesis se presentarán resultados del análisis genómico y funcional de *Bradyrhizobium japonicum* cepa E109, una de las cepas más utilizadas en nuestro país para la formulación de inoculantes para soja. El genoma de esta bacteria contiene un único replicón de 9.224.208 pares de bases (9.2 Mpb). El análisis post-secuenciación determinó la existencia de numerosas secuencias relacionadas con mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y otros relacionados con el estilo de vida rizosférico de este microorganismo. Como uno de los mecanismos más importante se destacó aquel relacionado con la producción de fitohormonas y dentro de ellas el ácido indol-3-acético (AIA). El estudio del metabolismo y homeostasis del AIA y otras auxinas, determinó que en *B. japonicum* E109 no es capaz de acumular concentraciones cuantificables de AIA aunque posea la información genética para biosintetizar esta molécula. E109 tiene capacidad de degradar, tanto auxinas naturales (AIA), como sintéticas (IBA y ANA), aunque la velocidad de degradación es mayor en el caso de las primeras. *B. japonicum* E109 tiene la capacidad de hidrolizar conjugados de AIA con aminoácidos (AIA-amidas) o glucosa y degradar la hormona en una reacción simultánea o posterior pero no es capaz de conjugar la hormona con aminoácidos. La hidrólisis y el catabolismo de AIA y AIA-amidas, se realiza en cualquier fase de la curva de crecimiento bacteriana, pero la fase donde es más rápida es la reacción es la exponencial. Ensayos con la adición exógena de AIA a cultivos puro de E109 determinaron que la cepa es capaz de catabolizar rápidamente la hormona y este fenómeno ocurrió de una forma no independiente a la presencia de la hormona (constitutiva). A través de un abordaje *in silico* e *in vitro*, pudimos confirmar que la degradación de AIA es *B. japonicum* E109 depende de una 3-fenilpropionato dioxigenasa con dos sub-unidades y codificada por los genes *iacC* y *iacD*. El análisis transcriptómico obtenido por el catabolismo de AIA por E109, determinó que esta molécula afectó su metabolismo de manera global y particularmente a nivel de ciertos mecanismos fisiológicos relacionados con la capacidad de la bacteria para promover el crecimiento vegetal. El catabolismo de AIA indujo la sobreexpresión de genes de la fijación de nitrógeno y simbiosis, quimiotaxis y movilidad, y genes de la respuesta generalizada a estrés mientras que reprimió la expresión de genes de la biosíntesis de AIA.

ABSTRACT

This thesis presents the results of the genomic and functional analysis of *Bradyrhizobium japonicum* strain E109, one of the most widely used strains in our country for the formulation of soybean inoculants. The genome of this bacterium contains a single replicon of 9,224,208 base pairs (9.2 Mpb). The genomic analysis determined the existence of numerous sequences related to plant growth promotion mechanisms and others related to the rhizospheric lifestyle of this microorganism. One of the most important mechanisms found was the production of phytohormones, indole-3-acetic acid (IAA) among them. A study of the metabolism and homeostasis of IAA and other auxins determined that E109 is not able to produce IAA, although it possesses the genetic information necessary to biosynthesize this molecule. E109 has the capacity to degrade natural (IAA) and synthetic (IBA and NAA) auxins, although the degradation rate is greater in the first case. *B. japonicum* E109 also has the ability to hydrolyse conjugates of IAA with amino acids (IAA-amides) or glucose, and to degrade the hormone in a simultaneous or subsequent reaction. However, it is not able to conjugate the hormone with amino acids. The hydrolysis and catabolism of IAA and IAA-amides is carried out in any phase of the bacterial growth curve, but it is faster at exponential phase. Experiments with the exogenous addition of IAA to pure E109 cultures showed that the strain is capable of rapidly catabolizing the hormone, a phenomenon that was not independent of the presence of the hormone (i.e. constitutive). Through an *in silico* and *in vitro* approach, we confirmed that IAA degradation in *B. japonicum* E109 depends on a 3-phenylpropionate dioxygenase with two subunits which is encoded by the *iacC* and *iacD* genes. The transcriptomic analysis of IAA catabolism by E109 determined that the molecule affected metabolism in the strain globally, particularly at the level of certain physiological mechanisms related to bacterial plant-growth promoting ability. IAA catabolism induced the overexpression of genes for nitrogen fixation and symbiosis, chemotaxis and mobility, as well as genes associated with the generalized response, whereas it repressed gene expression of IAA biosynthesis.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ÍNDICE DE FIGURAS | XXI |
| ÍNDICE DE TABLAS | XXXI |
| ORGANIZACIÓN DEL MANUSCRITO DE TESIS | XXXIX |
| CAPÍTULO I: Introducción general | 41 |
| I. 1 INTRODUCCIÓN GENERAL | 43 |
| I.1.1 Secuenciación de genomas | 43 |
| I.1.2 Genomas bacterianos y secuenciación | 44 |
| I.1.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal | 44 |
| I.1.4 Bacterias del Orden <i>Rhizobiales</i> | 45 |
| I.1.5 La Familia <i>Bradyrhizobiaceae</i> | 46 |
| I.1.6 El Género <i>Bradyrhizobium</i> | 46 |
| I.1.7 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en bacterias del Orden <i>Rhizobiales</i> | 48 |
| I.1.8 Auxinas y rizobacterias | 49 |
| I.1.8.1 Biosíntesis de auxinas en <i>Bradyrhizobium</i> | 49 |
| I.1.8.2 Catabolismo de auxinas en <i>Bradyrhizobium</i> | 50 |
| I.1.9 <i>B. japonicum</i> E109 como modelo de estudio | 50 |
| I.1.10 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en <i>B. japonicum</i> E109 | 51 |
| I.1.10 Secuenciación masiva en cepas de <i>Bradyrhizobium japonicum</i> | 51 |
| I.2 HIPÓTESIS | 54 |
| I.2.1 Hipótesis principal | 54 |
| I.2.2 Hipótesis secundaria | 54 |
| I.3 OBJETIVOS | 55 |
| I.3.1 Objetivos generales | 55 |
| I.3.2 Objetivos específicos | 55 |
| CAPÍTULO II: Análisis genómico y funcional del genoma de <i>B. japonicum</i> E109 | 57 |
| II.1 INTRODUCCIÓN | 59 |
| II.1.1 Secuenciación Masiva | 59 |
| II.1.2 Tecnologías de Secuenciación de ADN: Segunda generación | 60 |
| II.1.2.1 Sistema Roche 454. Pirosecuenciación | 60 |
| II.1.2.2 Plataforma Solexa/Illumina | 62 |

| | |
|---|-----|
| II.1.2.3 Plataforma SOLiD/Applied Biosystems | 62 |
| II.1.2.3 Plataforma de Secuenciadores PGM compactos | 63 |
| II.1.2.3.1 Ion PGM de Ion Torrent | 63 |
| II.1.2.3.2 MiSeq de Illumina | 63 |
| II.1.3 Ensamblaje de los genomas derivado de la Secuenciación NSG | 64 |
| II.1.4 Anotación del genoma | 65 |
| II.1.4 Procedimientos operativos estándar de anotación (SOPs) | 66 |
| II.1.5 Anotaciones Rápidas utilizando Tecnología de Subsistemas (RAST) | 66 |
| II.1.6 KEGG (Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas) | 67 |
| II.1.6.1 Vías metabólicas por KEGG | 67 |
| II.2 METODOLOGÍA | 68 |
| II.2.1 Material Biológico | 68 |
| II.2.2 Obtención del material genético..... | 68 |
| II.2.3 Secuenciación del genoma de la cepa de <i>B. japonicum</i> E109..... | 68 |
| II.2.4 Contenido plasmídico y electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE) | 69 |
| II.2.5 Análisis funcional <i>in silico</i> de los mecanismos de promoción de crecimiento en <i>B. japonicum</i> E109 mediante RAST y KEGG | 69 |
| II.3 RESULTADOS..... | 71 |
| II.3.1 Secuenciación, ensamblaje y cierre del genoma de <i>B. japonicum</i> E109 | 71 |
| II.3.2 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de <i>B. japonicum</i> E109..... | 71 |
| II.3.3 Análisis genómico de <i>B. japonicum</i> E109 | 72 |
| II.3.4 Análisis funcional del genoma de <i>B. japonicum</i> en base a RAST y KEEG | 77 |
| II.3.4.1 Clasificación en subsistemas según RAST | 78 |
| II.3.4.2 Clasificación en vías metabólicas según KEGG | 83 |
| II.3.4.2.1 Metabolismo de Nitrógeno: reducción y fijación..... | 84 |
| II.3.4.2.2 Quimiotaxis y Movilidad | 86 |
| II.3.4.2.3 Biosíntesis de Poliaminas | 88 |
| II.3.4.2.4 Transporte y Sistema de Secreción..... | 90 |
| II.3.4.2.5 Producción de Fitohormonas | 97 |
| II.4 DISCUSIÓN | 108 |
| II.5 CONCLUSIONES..... | 115 |
| CAPÍTULO III: Metabolismo de Auxinas y Catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109 ... | 117 |

| | |
|--|-----|
| III.1 INTRODUCCIÓN | 119 |
| III.1.1 Auxinas | 119 |
| III.1.1.1 Auxinas en <i>B. japonicum</i> | 119 |
| III.1.2 Metabolismo de Auxinas | 119 |
| III.1.2.1 Biosíntesis de novo | 120 |
| III.1.2.1.1 Biosíntesis de AIA en <i>B. japonicum</i> | 120 |
| III.1.2.2 Hidrólisis de conjugados de AIA | 121 |
| III.1.2.2.1 Hidrólisis de conjugados de AIA en <i>B. japonicum</i> | 122 |
| III.1.2.3 Catabolismo de AIA en bacterias | 122 |
| III.1.2.3.1 Catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> | 123 |
| III. 2 METODOLOGÍA | 125 |
| III.2.1 Material Biológico..... | 125 |
| III.2.2 Cuantificación de AIA por espectrofotometría | 125 |
| III.2.3 Identificación y cuantificación de AIA y otras auxinas por HPLC | 125 |
| III.2.4 Biosíntesis de AIA por <i>B. japonicum</i> E109 | 126 |
| III.2.5 Hidrólisis de conjugados de AIA-amidas por <i>B. japonicum</i> E109..... | 126 |
| III.2.6 Conjugación de AIA con aminoácidos por <i>B. japonicum</i> E109 | 127 |
| III.2.7 Hidrólisis y catabolismo en diferentes fases de crecimiento por <i>B. japonicum</i> E109 | 127 |
| III.2.8 Catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109..... | 127 |
| III.2.8.1 Catabolismo de AIA y otras auxinas sintéticas y naturales por <i>B. japonicum</i> E109 | 127 |
| III.2.8.2 Catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109..... | 128 |
| III.2.8.3 Catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 | 128 |
| III.2.8.4 Cinética de degradación de AIA en <i>B. japonicum</i> E109..... | 129 |
| III.2.8.4.1 Doble inducción con AIA y saturación | 129 |
| III.2.8.4.2 Catabolismo de AIA en diferentes fases de crecimiento | 130 |
| III.2.8.4.3 Catabolismo de AIA en concentraciones crecientes de AIA | 130 |
| III.2.8.5 Efecto de AIA exógeno sobre la fisiología de <i>B. japonicum</i> E109 y su efecto sobre su capacidad de establecer simbiosis con semillas de soja..... | 131 |
| III.2.8.5.1 Efecto del AIA exógeno sobre la fisiología de <i>B. japonicum</i> E109..... | 131 |
| III.2.8.5.2 Recuperación de <i>B. japonicum</i> E109 en semillas de soja..... | 131 |

| | |
|---|-----|
| III.2.8.5.3 Evaluación del establecimiento de la simbiosis <i>B. japonicum</i> E109-soja | 132 |
| III.2.8.6 Perfil de metabolitos y catabolitos en <i>B. japonicum</i> E109 | 132 |
| III.2.8.6.1 Perfil de metabolitos de AIA en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 | 132 |
| III.2.8.6.2 Perfil del catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> E109 | 133 |
| III.2.9 Análisis Estadístico | 134 |
| III.3 RESULTADOS | 135 |
| III.3.1 Biosíntesis de AIA por <i>B. japonicum</i> E109 | 135 |
| III.3.2 Hidrólisis de conjugados de AIA-amidas por <i>B. japonicum</i> E109 | 136 |
| III.3.3 Conjugación de AIA con aminoácidos por <i>B. japonicum</i> E109 | 138 |
| III.3.4 Hidrólisis y catabolismo en diferentes fases de crecimiento por <i>B. japonicum</i> E109 | 139 |
| III.3.4.1 Fase Lag de crecimiento de E109 | 139 |
| III.3.4.2 Fase Exponencial temprana de crecimiento de E109 | 140 |
| III.3.4.3 Fase Exponencial de crecimiento de E109 | 143 |
| III.3.4.4 Fase Estacionaria de crecimiento de E109 | 144 |
| III.3.5 Catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109 | 146 |
| III.3.5.1 Catabolismo de AIA y otras auxinas sintéticas y naturales por <i>B. japonicum</i> E109 | 146 |
| III.3.5.2 Catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109 | 148 |
| III.3.5.3 Catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 | 149 |
| III.3.5.4 Cinética de degradación de AIA en <i>B. japonicum</i> E109 | 150 |
| III.3.5.4.1 Doble inducción con AIA y saturación | 150 |
| III.3.5.4.2 Catabolismo de AIA en diferentes fases de crecimiento | 152 |
| III.3.5.4.3 Catabolismo de AIA en concentraciones crecientes de la AIA | 154 |
| III.3.5.5 Efecto de AIA exógeno sobre la fisiología de <i>B. japonicum</i> E109 y su efecto sobre su capacidad de establecer simbiosis con soja | 155 |
| III.3.5.5.1 Efecto del AIA exógeno sobre la fisiología de <i>B. japonicum</i> E109 | 155 |
| III.3.5.5.2 Recuperación de <i>B. japonicum</i> E109 en semillas de soja | 156 |
| III.3.5.5.3 Evaluación del establecimiento de la simbiosis <i>B. japonicum</i> E109-soja | 157 |
| III.3.5.6 Perfil de metabolitos y catabolitos en <i>B. japonicum</i> E109 | 159 |
| III.3.5.6.1 Perfil de metabolitos de AIA en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 | 159 |
| III.3.5.6.2 Perfil metabólico del catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> E109 | 161 |

| | |
|---|------------|
| III.4 DISCUSIÓN | 164 |
| III.4.1 Biosíntesis de AIA | 164 |
| III.4.2 Hidrólisis de conjugados de AIA con aminoácidos | 164 |
| III.4.3 Conjugación de AIA con aminoácidos | 165 |
| III.4.4 Hidrólisis AIA-amidas en diferentes fases de la curva de crecimiento bacteriana | 165 |
| III.4.5 Catabolismo de AIA | 166 |
| III.5 CONCLUSIONES | 168 |
| CAPÍTULO IV: Análisis de genes involucrados en el catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> | |
| E109 | 169 |
| IV.1 INTRODUCCIÓN | 171 |
| IV.1.1 Peroxidasas en el catabolismo de AIA | 171 |
| IV. 1.2 Clúster <i>iac</i> en el catabolismo de AIA | 171 |
| IV.2 METODOLOGÍA | 174 |
| IV.2.1. Actividad de la enzima peroxidasa para el catabolismo de AIA en E109 | 174 |
| IV.2.1.1 Detección de la actividad peroxidasa en cultivos de E109 | 174 |
| IV.2.1.2 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos modificados por la adición de HRP | 174 |
| IV.2.1.3 Catabolismo de AIA en sobrenadantes modificados por la adición de H₂O₂ 175 | |
| IV.2.1.4 Construcción de una mutante Δ<i>per12</i> de <i>B. japonicum</i> E109 | 175 |
| IV.2.1.5 Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 Δ<i>per12</i> | 176 |
| IV.2.1.6 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos puros de E109 y E109 Δ<i>per12</i> | 177 |
| IV.2.2 Análisis del perfil de proteínas presentes en E109 potencialmente relacionadas con la degradación de AIA | 177 |
| IV.2.2.1 Búsqueda de secuencias codificantes el catabolismo de AIA en el genoma de E109 | 177 |
| IV.2.2.2 Perfil proteómico del catabolismo de AIA en E109 | 178 |
| IV.2.2.3 Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en E109 | 179 |
| IV.2.2.4 Evaluación del catabolismo de AIA en la mutante <i>B. diazoefficiens</i> 8620 para el gen <i>ngrC</i> (similar a <i>iacA</i>) | 180 |

| | |
|---|-----|
| IV.2.3 Actividad de la enzima codificada por el gen <i>iacC</i> para el catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> E109 | 180 |
| IV.2.3.1 Análisis in silico del genoma | 180 |
| IV.2.3.2 Construcción de la mutante <i>B. japonicum</i> E109 $\Delta iacC$ | 180 |
| IV.2.3.3 Construcción de la mutante complementada de <i>B. japonicum</i> E109 $\Delta iacC$... | 181 |
| IV.2.3.4 Biosíntesis de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$ | 182 |
| IV.2.3.5 Evaluación del catabolismo de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$ | 182 |
| IV.2.9 Análisis Estadístico | 183 |
| IV.3 RESULTADOS | 184 |
| IV.3.1 Actividad de la enzima peroxidasa para el catabolismo de AIA en E109..... | 184 |
| IV.3.1.1 Detección de la actividad peroxidasa en cultivos de E109..... | 184 |
| IV.3.1.2 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos de E109 modificados por la adición de HRP | 186 |
| IV.3.1.3 Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de E109 modificados por la adición de H ₂ O ₂ | 187 |
| IV.3.1.4 Construcción de una mutante de <i>B. japonicum</i> E109 Δper | 189 |
| IV.3.1.5 Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 $\Delta per12$ | 190 |
| IV.3.1.6 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos puros de E109 y E109 $\Delta per12$ | 193 |
| IV.3.2 Análisis del perfil de proteínas de E109 relacionadas con la degradación de AIA | 194 |
| IV.3.2.1 Búsqueda bioinformática de secuencias codificantes relacionadas con el catabolismo de AIA en el genoma de E109 | 194 |
| IV.3.2.2 Perfil proteómico del catabolismo de AIA en E109 | 197 |
| IV.3.2.3 Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en E109 | 199 |
| IV.3.2.4 Evaluación del catabolismo de AIA en la mutante <i>B. diazoefficiens</i> 8620 para el gen <i>ngrC</i> (similar a <i>iacA</i>) | 200 |
| IV.3.3 Actividad de la enzima codificada por el gen <i>iacC</i> para el catabolismo de AIA en E109 | 201 |
| IV.3.3.1 Análisis in silico del genoma | 201 |
| IV.3.3.2 Construcción de la mutante <i>B. japonicum</i> E109 $\Delta iacC$ | 203 |
| IV.3.3.3 Biosíntesis de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$ | 204 |

| | |
|---|-----|
| IV.3.3.4 Evaluación del catabolismo de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$ | 204 |
| IV.4 DISCUSIÓN | 206 |
| IV. 5 CONCLUSIONES | 208 |
| CAPÍTULO V: Catabolismo de Indol por <i>B. japonicum</i> E109 | 209 |
| V.1 INTRODUCCIÓN..... | 211 |
| V.1.1 Catabolismo de Indol | 211 |
| V.1.2 Degradación microbiana de Indol..... | 211 |
| V.1.3. Importancia del indol en la naturaleza y similitud funcional con el AIA..... | 213 |
| V.2 METODOLOGÍA | 215 |
| V.2.1 Evaluación del catabolismo de Indol en cultivos de E109..... | 215 |
| V.2.2 Metodología general para la cuantificación de Indol por espectrofotometría | 215 |
| V.2.3 Evaluación del catabolismo de Indol en sobrenadantes de E109 | 215 |
| V.2.4 Catabolismo del indol en diferentes fases de crecimiento de E109 | 216 |
| V.2.5 Catabolismo de Indol en concentraciones crecientes de indol..... | 216 |
| V.2.6 Evaluación del catabolismo de indol en la mutante para el gen <i>ngrC</i> (similar a <i>iacA</i>) de <i>B. diazoefficiens</i> 8620..... | 217 |
| V.2.7 Evaluación del catabolismo de indol por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$ | 217 |
| V.3 RESULTADOS..... | 218 |
| V.3.1 Evaluación del catabolismo de Indol en cultivos de E109..... | 218 |
| V.3.2 Evaluación del catabolismo de Indol en sobrenadantes de E109 | 219 |
| V.3.3 Catabolismo del indol en diferentes fases de crecimiento de E109 | 220 |
| V.3.4 Catabolismo de Indol en concentraciones crecientes de indol..... | 220 |
| V.3.5 Evaluación del catabolismo de indol en la mutante para el gen <i>ngrC</i> (similar a <i>iacA</i>) de <i>B. diazoefficiens</i> 8620..... | 221 |
| V.3.6 Evaluación del catabolismo de indol por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$ | 222 |
| V.4 DISCUSIÓN..... | 224 |
| V.5 CONCLUSIONES | 225 |
| CAPÍTULO VI: Análisis transcriptómico del catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109.. | 227 |
| VI.1 INTRODUCCIÓN | 229 |
| VI.1.1 Secuenciación de ARN (RNA-Seq) y análisis transcriptómico | 229 |
| VI.1.1.1 Construcción de la biblioteca de RNA-seq | 231 |
| VI.1.1.2 Bioinformática en RNA-seq | 231 |

| | |
|--|-----|
| VI.1.1.3 Nivel de transcripción de RNA-seq | 231 |
| VI.1.2 Transcriptómica en el estudio de <i>Bradyrhizobium</i> | 231 |
| VI.1.3 Análisis transcriptómico del efecto de AIA sobre los microorganismos | 232 |
| VI.1.3.1 Evaluación transcriptómica del efecto de AIA en <i>Bradyrhizobium</i> sp. | 233 |
| VI.1.4 Importancia del análisis transcriptómico en el catabolismo de AIA en E109 | 234 |
| VI.2 METODOLOGÍA | 235 |
| VI.2.1 Catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> E109 para análisis de transcriptómica | 235 |
| VI.2.2 Extracción de ARN por el método de Trizol® | 235 |
| VI.2.3 Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN | 236 |
| VI.2.4 Tratamiento con la enzima DNasa | 236 |
| VI.2.5 Depleción de rRNA | 236 |
| VI.2.6 Construcción de las bibliotecas de ADNc y secuenciación | 236 |
| VI.2.7 Análisis del Transcriptoma | 237 |
| VI.3 RESULTADOS | 238 |
| VI.2.1 Catabolismo de AIA en <i>B. japonicum</i> E109 para análisis de transcriptómica | 238 |
| VI.3.2 Evaluación de la integridad del ARN | 238 |
| VI.3.3 Análisis transcriptómico del catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109 | 239 |
| VI.3.3.1 Genes expresados diferencialmente | 240 |
| VI.3.3.2 Metabolismo de Nitrógeno | 241 |
| VI.3.3.3 Simbiosis | 245 |
| VI.3.3.4 Quimiotaxis y movilidad | 245 |
| VI.3.3.5 Transporte y Sistema de Secreción | 247 |
| VI.3.3.6 Biosíntesis de AIA | 250 |
| VI.3.3.7 Genes involucrados en la respuesta bacteriana a estrés | 251 |
| VI.3.3.7.1 Biosíntesis de EPS | 251 |
| VI.3.3.7.2 Respuesta bacteriana a estrés térmico | 252 |
| VI.3.3.7.3 Estrés oxidativo | 254 |
| VI.4 DISCUSIÓN | 255 |
| VI.5 CONCLUSIONES | 259 |
| CAPÍTULO VII: Discusión y Conclusiones Generales | 261 |
| VII.1 DISCUSIÓN GENERAL | 263 |
| VII.2 CONCLUSIONES GENERALES | 267 |

| | |
|--|-----|
| BIBLIOGRAFÍA | 269 |
| ANEXOS | 301 |
| Anexo 1. Reporte de la secuenciación del genoma de <i>B. japonicum</i> E109 | 301 |
| Anexo 2. Métricas de la secuenciación del genoma de <i>B. japonicum</i> E109 mediante WGS a partir del software PRINSEQ. | 307 |
| Anexo 3. Métricas de la secuenciación del genoma de <i>B. japonicum</i> E109 mediante paired-end a partir del software PRINSEQ. | 315 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Fotografía del gel obtenida de PFGE, donde se puede observar un banda débil en la corrida de E109 correspondiente al cromosoma de la bacteria. En la misma gráfica se presentan los resultados de las determinaciones realizadas para <i>Azospirillum brasilense</i> | 72 |
| Figura 2. Representación circular del cromosoma de <i>B. japonicum</i> E109. Los dos círculos externos muestran las secuencias codificantes, representadas como flechas azules, presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido de la molécula. Los círculos interiores indican el contenido GC relativo (en negro) y la desviación GC (verde/morado). Esta imagen fue generada por CGView Comparison Tool (Grant et al., 2012). | 74 |
| Figura 3. Representación circular de la comparación de los cromosomas de <i>B. japonicum</i> E109 comparada con el equivalente en <i>B. japonicum</i> USDA38 (BLAST 1, rojo), USDA6 (BLAST 2, verde) y SEMIA 5079 (BLAST 3, azul). Los dos círculos más externos muestran los genes presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido. | 75 |
| Figura 4. Características generales de la secuencia del cromosoma de <i>B. japonicum</i> E109 comparada con <i>B. elkanii</i> 587 (BLAST 1, rojo), USDA76 (BLAST 2, verde) y USDA3254 (BLAST 3, azul). Los dos círculos más externos muestran las secuencias codificantes (flechas azules) presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido. | 76 |
| Figura 5. Características generales de la secuencia del cromosoma de <i>B. japonicum</i> E109 comparada con <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 (BLAST 1, rojo) y ORS278 (BLAST 2, verde). Los dos círculos más externos muestran las secuencias codificantes (flechas azules) presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido. | 77 |
| Figura 6. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de <i>B. japonicum</i> E109 | 78 |
| Figura 7. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de <i>B. japonicum</i> USDA6..... | 79 |
| Figura 8. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de <i>B. diazoefficiens</i> USDA110.. | 79 |
| Figura 9. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de <i>B. elkanii</i> 587 | 80 |
| Figura 10. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de <i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS278 | 80 |
| Figura 11. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de <i>Bradyrhizobium</i> sp. BTAi1 | 81 |
| Figura 12. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de <i>Bradyrhizobium</i> sp. S2332181 | |
| Figura 13. Vía metabólica relacionada al metabolismo del nitrógeno, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 85 |
| Figura 14. Vía metabólica relacionada al sistema de quimiotaxis bacteriana, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 87 |

| | |
|--|-----|
| Figura 15. Vía metabólica relacionada al sistema de movilidad, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 88 |
| Figura 16. Vía metabólica relacionada al metabolismo de arginina y prolina, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 89 |
| Figura 17. Vía metabólica relacionada a degradación de lisina, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 89 |
| Figura 18. Sistema de secreción tipo I, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 92 |
| Figura 19. Sistema de secreción tipo II, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 93 |
| Figura 20. Sistema de secreción tipo III, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 94 |
| Figura 21. Sistema de secreción tipo IV, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 95 |
| Figura 22. Sistema de secreción tipo V, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 96 |
| Figura 23. Sistema de secreción tipo VI, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 97 |
| Figura 24. Vía metabólica relacionada con el metabolismo del ácido α -linolénico, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 98 |
| Figura 25. Vía metabólica relacionada con la biosíntesis de diterpenoides, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 99 |
| Figura 26. Imagen obtenida luego de hacer un blast de la secuencia de ent-kaureno sintasa (EC: 5.5.1.13) de USDA110 contra E109 y una cepa de referencia, <i>Mesorhizobium loti</i> MAFF303. Referencias (Genes): (1 y 4): proteínas hipotéticas (difosfato copalil sintasa y ent-kaureno sintasa); (2 y 6): Citocromo P450; (3) dehidrogenasa; (5) Octaprenil difosfato sintasa (EC 2.5.1.90)/ Dimetilalliltransferasa (EC 2.5.1.1)/(2E,6E)-farnesil difosfato sintasa (EC 2.5.1.10)/ Geranilgeranil difosfato sintasa (EC 2.5.1.29). | 99 |
| Figura 27. Vía metabólica relacionada con la biosíntesis de carotenoides, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 100 |
| Figura 28. Vía metabólica relacionada con la biosíntesis de carotenoides, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 102 |

| | |
|--|-----|
| Figura 29. Vía metabólica relacionada con el metabolismo de metionina y cisteína, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 103 |
| Figura 30. Vía metabólica relacionada con el metabolismo de triptófano, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 104 |
| Figura 31. Vías hipotéticas y actuales de la síntesis de AIA en rizobacterias. Modificado por Spaepen et al. (2008). | 106 |
| Figura 32. Vía metabólica relacionadas con la degradación de estireno, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para <i>B. japonicum</i> E109. | 107 |
| Figura 33. Procesos biológicos y bioquímicos que integran el metabolismo del AIA en la naturaleza. IBA: ácido indol butírico. | 120 |
| Figura 34. Crecimiento (DO_{595}) de <i>B. japonicum</i> E109 y síntesis de AIA, expresada como $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ en función del tiempo. | 135 |
| Figura 35. Concentración de conjugados AIA-amida ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en medio EMA modificados por la adición de 0.1 mM AIA-phe, AIA-leu o AIA-ala durante la fase de crecimiento exponencial ($DO_{595}=0,613$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Barras negras representan la concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en los sobrenadantes. | 137 |
| Figura 36. Concentración de auxinas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase de crecimiento lag ($DO_{595}= 0,075$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA libre ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en los sobrenadantes. | 140 |
| Figura 37. Concentración de auxinas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en el medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial temprana ($DO_{595}= 0,475$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA libre ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en los sobrenadantes. | 142 |
| Figura 38. Concentración de auxinas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en el medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial ($DO_{595}=1,025$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras | |

diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en los sobrenadantes. 144

Figura 39. Concentración de auxinas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en el medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase estacionaria ($\text{DO}_{595}=1.728$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA libre ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes. 145

Figura 40. Concentración de auxinas en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 en medio EMA modificados por la adición de auxinas exógenas (AIA, IBA o ANA) en fase de crecimiento exponencial ($\text{DO}_{595}=0,613$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ 147

Figura 41. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109 modificados por la adición exógena de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y la T el SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ 148

Figura 42. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. elkanii* SEMIA 5019 modificados por la adición exógena de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y la T el SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ 149

Figura 43. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y sobrenadantes desnaturalizados por calor, modificados por la adición de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y la T el SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ 150

Figura 44. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos y sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y cultivos de *B. elkanii* SEMIA 5019, modificados por la adición exógena de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un $p < 0,05$. SD significa que no se identificó AIA. . 151

Figura 45. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y *B. elkanii* 5019, modificados por la adición exógena de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un $p < 0,05$. SD significa que no se identificó AIA. 152

| | |
|---|-----|
| Figura 46. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes en fase exponencial y estacionaria de <i>B. japonicum</i> E109 con la adición exógena de $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD (n=3) y sd (sin datos). Letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un $p < 0,05$ | 153 |
| Figura 47. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes en fase exponencial y estacionaria de <i>B. japonicum</i> E109 con la adición exógena de $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD (n=3) y sd (sin datos). Letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un $p < 0,05$ | 153 |
| Figura 48. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 con la adición exógena 0-5 mM de AIA. Las barras representan el promedio y su SD (n=3). | 154 |
| Figura 49. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109, modificados por la adición exógena de 0.1 mM de AIA. Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un $p < 0,05$ | 156 |
| Figura 50. Recuperación de células viables de <i>B. japonicum</i> E109 ($\text{ufc}\cdot\text{semillas}^{-1}$) a partir de semillas de soja a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación. La gráfica representa las típicas curvas bifásicas de muerte para dos cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 en medio EMA con y sin la inducción con 0.1 mM de AIA. Los valores mostrados representan la media \pm SD. | 157 |
| Figura 51. Concentración de metabolitos ($\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 obtenidos en medio de cultivo EMA o EMA modificado por la adición de L-Trp. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD. Sd significa sin datos. | 159 |
| Figura 52. Concentración de metabolitos ($\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de <i>B. elkanii</i> 5019 obtenidos en medio de cultivo EMA o EMA modificado por la adición de L-Trp. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD. Sd significa sin datos | 160 |
| Figura 53. Concentración de metabolitos ($\text{pmol}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 obtenidos luego de la adición exógena de AIA en el medio de cultivo. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, | |

| | |
|--|-----|
| (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD..... | 161 |
| Figura 54. Concentración de metabolitos (pmol.ml ⁻¹) en cultivos de <i>B. elkanii</i> 5019 obtenidos luego de la adición exógena de AIA en el medio de cultivo. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD..... | 162 |
| Figura 55. Comparación de los genes del locus <i>iac</i> en <i>P. putida</i> 1290 con los grupos de genes de tipo <i>iac</i> en otros genomas bacterianos. Los tamaños de los genes y espacios intergénicos no están en escala y los genes <i>iac</i> homólogos en otras bacterias se indican con el mismo color. La orientación de cada gen se indica en la figura (Leveau y Gerards, 2008)..... | 172 |
| Figura 56. Vía propuesta para la degradación de AIA en <i>P. putida</i> 1290 por el clúster <i>iac</i> . Se muestran los tres intermedios, uno confirmado (catecol) y los otros dos aparentemente (2-hidroxi-AIA, o 2-OH-AIA; 3-hidroxi-2-oxo-AIA, o diOxIAA). El producto del gen <i>iacA</i> está implicado en el paso 1, <i>iacE</i> en el paso 2 e <i>iacC</i> en el paso 3..... | 173 |
| Figura 57. Valores de DO ₄₇₀ de la cinética de ECN y HRP en función del tiempo..... | 184 |
| Figura 58. Valores de DO ₄₇₀ para los ensayos de cinética desarrollados en 100 y 200 μ l de medio de cultivo puros de <i>B. japonicum</i> E109 a la mezcla de reacción a pH 5..... | 185 |
| Figura 59. Valores de DO ₄₇₀ para los ensayos de cinética desarrollados en 300 y 500 μ l de medio de cultivo puros de <i>B. japonicum</i> E109 a la mezcla de reacción a pH 7..... | 186 |
| Figura 60. Concentración de AIA (μ g.ml ⁻¹) en cultivos y sobrenadantes de E109 modificados por la adición exógena de AIA (μ g.ml ⁻¹) y HRP. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ | 187 |
| Figura 61. Concentración de AIA (μ g.ml ⁻¹) en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 modificados por la adición exógena de AIA (μ g.ml ⁻¹) y 20 μ M de H ₂ O ₂ . Las barras representan el promedio y la T el SD (n=2). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ | 188 |
| Figura 62. Concentración de AIA (μ g.ml ⁻¹) en sobrenadante de E109 y medio EMA, modificados por la adición exógena de AIA (μ g.ml ⁻¹) y 80 μ M de H ₂ O ₂ . Las barras representan el promedio y la | |

| | |
|---|-----|
| T el SD (n=2). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05. | 189 |
| Figura 63. Electroforesis de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de estudio en el que se muestra el producto de amplificación de Δper . En cada uno de los pozos corresponden a clones de <i>E. coli</i> DH5- <i>a</i> con diferentes mix de primers..... | 190 |
| Figura 64. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 y la mutante E109 $\Delta per12$, modificados por la adición exógena de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05..... | 191 |
| Figura 65. Concentración de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 y la mutante E109 $\Delta per12$, modificados por la adición exógena de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05..... | 192 |
| Figura 66. Concentración de AIA en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 y la mutante E109 $\Delta per12$, modificados por la adición exógena de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05..... | 192 |
| Figura 67. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 y la mutante E109 $\Delta per12$, modificados por la adición exógena de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05..... | 193 |
| Figura 68. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 y la mutante $\Delta per12$, modificados por la adición exógena de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05. | 194 |
| Figura 69. Concentración de AIA agregado exógenamente (30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109, <i>B. diazoefficiens</i> USDA110 sp4 y 8620 en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un p <0,05..... | 200 |
| Figura 70. Estrategia utilizada para la obtención de la mutante de E109 $\Delta iacC$ | 203 |
| Figura 71. Concentración de AIA agregado exógenamente (40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 y la mutante <i>B. japonicum</i> E109 $\Delta iacC$ en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un p <0,05..... | 204 |

| | |
|---|-----|
| Figura 72. Degradación de Indol vía catecol (a), vía ácido antranílico (b) y vía ácido gentísico (c). | 212 |
| Figura 73. Degradación de indol por biotransformación vía indol-3-aldehído (a) y vía índigo (b). | 213 |
| Figura 74. Concentración de indol agregado exógenamente (5-30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$ | 218 |
| Figura 75. Concentración de indol agregado exógenamente (5-30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) en sobrenadantes de <i>B. japonicum</i> E109 en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$ | 219 |
| Figura 76. Concentración de indol agregado exógenamente (40 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 en fase exponencial y estacionaria, en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$ | 220 |
| Figura 77. Concentración de indol ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 en función del tiempo (h) con la adición exógena 0-5 mM de indol. Las barras representan el promedio y su SD (n=3). | 221 |
| Figura 78. Concentración de indol ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109, <i>B. diazoefficiens</i> USDA110 sp4 y la mutante <i>B. diazoefficiens</i> 8620 en función del tiempo (h) con la adición exógena 0.5 mM de indol. Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$ | 222 |
| Figura 79. Concentración de indol (mM) en cultivos de <i>B. japonicum</i> E109 y la mutante <i>B. japonicum</i> E109 $\Delta iacC$ en función del tiempo (h) con la adición exógena 0.5 mM de indol. Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$ | 223 |
| Figura 80. Protocolo de trabajo para el desarrollo de la metodología de RNA seq. Los ARN se convierten primero en una biblioteca de fragmentos de ADNc a través de la fragmentación del ARN o la fragmentación del ADN. Los adaptadores de secuenciación se añaden posteriormente a cada fragmento de ADNc y se obtiene una secuencia corta de cada ADNc usando tecnología de secuenciación de alto rendimiento. Las lecturas (o reads) de secuencia resultantes están alineadas con el genoma de referencia y se puede construir un patrón de expresión. | 230 |
| Figura 81. Concentración de AIA en cultivos control de <i>B. japonicum</i> E109 y <i>B. japonicum</i> E109 con la adición de 0.5 mM de AIA en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y | |

| | |
|---|-----|
| su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$ | 238 |
| Figura 82. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualiza el ARN total de todas la réplicas de ambos tratamientos; Tratamiento Control (C1, C2, C3, C4 y C5) y Tratamiento con 0.5 mM de AIA (A1, A2, A3, A4 y A5). | 239 |
| Figura 83. Número de genes expresados diferencialmente durante el catabolismo de AIA en E109. | 240 |
| Figura 84. Genes expresados diferencialmente, clasificados según las vías metabólicas de KEGG, durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 241 |
| Figura 85. Genes sobreexpresados en el metabolismo de nitrógeno, durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 242 |
| Figura 86. Genes reprimidos en el metabolismo de nitrógeno, según KEGG, durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 243 |
| Figura 87. Genes sobreexpresados de la fijación de nitrógeno, durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 244 |
| Figura 88. Genes de la simbiosis sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109. | 245 |
| Figura 89. Genes de la quimiotaxis sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109. | 246 |
| Figura 90. Genes de la movilidad sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109. | 247 |
| Figura 91. Genes del sistema de secreción tipo II sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109. | 248 |
| Figura 92. Genes de los sistemas de secreción tipo I y VI sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109. | 249 |
| Figura 93. Genes de los sistemas de secreción tipo I, II y VI reprimidos durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 250 |
| Figura 94. Genes de la biosíntesis de AIA reprimidos durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 251 |
| Figura 95. Genes de la biosíntesis de EPS sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 252 |
| Figura 96. Genes relacionados a la respuesta bacteriana a estrés por calor y frío sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 253 |
| Figura 97. Genes relacionados con la respuesta bacteriana al estrés por calor y frío reprimidos durante el catabolismo de AIA por <i>B. japonicum</i> E109. | 254 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|-----|
| Tabla 1. Características más representativas del Género <i>Bradyrhizobium</i> sp..... | 47 |
| Tabla 2. Resumen del estado de secuenciación de las cepas de <i>B. japonicum</i> | 53 |
| Tabla 3. Datos obtenidos a partir de la secuenciación del genoma de <i>B. japonicum</i> E109..... | 71 |
| Tabla 4. Características generales del genoma de <i>B. japonicum</i> E109 en comparación otras cepas de la misma especie y género..... | 73 |
| Tabla 5. Clasificación de los Subsistemas de RAST de las cepas de <i>Bradyrhizobium</i> | 82 |
| Tabla 6. Subsistemas de movilidad y quimiotaxis de diferentes <i>Bradyrhizobium</i> de acuerdo a la clasificación en subsistemas y funciones de RAST. | 86 |
| Tabla 7. Los subsistemas de Movilidad y Quimiotaxis obtenidos de la secuencia del genoma de <i>Bradyrhizobium</i> sp. de acuerdo a la clasificación en subsistemas y funciones de RAST. | 90 |
| Tabla 8. Enzimas principales de la vía de síntesis de AIA identificados en E109 y en otras cepas del género <i>Bradyrhizobium</i> | 105 |
| Tabla 9. Valores de la producción de biomasa (DO ₅₉₅), número de células (ufc.ml ⁻¹) y la concentración de AIA (µg.ml ⁻¹) por E109 en medios EMA o EMA modificados por la adición de L-Trp. Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05.. | 136 |
| Tabla 10. Producción de biomasa (DO ₅₉₅), viabilidad (ufc.ml ⁻¹) y producción de EPS (µg.ml ⁻¹) por E109 en los medios de EMA o EMA modificados por la adición de amidas de AIA (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial de crecimiento (DO ₅₉₅ aprox. 0,6). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05. | 137 |
| Tabla 11. Producción de biomasa (DO ₅₉₅), viabilidad (ufc.ml ⁻¹) y producción de EPS (µg.ml ⁻¹) por E109 en medio EMA y EMA modificado por la adición de AIA y aminoácidos (L-phe, L-leu y L-ala) durante la fase de crecimiento exponencial (DO ₅₉₅ aprox. 0,6) después de 24 y 48 horas de incubación. Diferentes letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05. | 138 |
| Tabla 12. Producción de biomasa (DO ₅₉₅), viabilidad (ufc.ml ⁻¹) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO ₅₉₅) de E109 en medios de EMA o EMA modificados mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amidas (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase lag de crecimiento..... | 139 |
| Tabla 13. Producción de biomasa (DO ₅₉₅), viabilidad (ufc.ml ⁻¹) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO ₅₉₅) de E109 en medios de EMA o EMA modificado mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial | |

| | |
|---|-----|
| temprana. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ | 141 |
| Tabla 14. Producción de biomasa (DO_{595}), viabilidad (ufc.ml ⁻¹) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO_{595}) de E109 en medios de EMA o EMA modificado mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ | 143 |
| Tabla 15. Producción de biomasa (DO_{595}), viabilidad (ufc.ml ⁻¹) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO_{595}) de E109 en medios de EMA o EMA modificado mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase estacionaria de crecimiento. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ | 145 |
| Tabla 16. Producción de biomasa (DO_{595}), número de células (ufc.ml ⁻¹) y producción de EPS ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) de E109 en los medios de EMA o EMA modificado por adición de auxinas exógenas (AIA, IBA y ANA) durante la fase exponencial de crecimiento (DO_{595} aprox.0, 6). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$ | 146 |
| Tabla 17. Producción de biomasa (DO_{595}), número de células (ufc.ml ⁻¹) y producción de EPS ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) de <i>B. japonicum</i> E109 crecieron en medios EMA y EMA modificados mediante la adición de AIA (0.1 mM) y se incubaron durante 48 horas en condiciones similares. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. (N = 3)..... | 155 |
| Tabla 18. Efectos sobre el crecimiento y nodulación de plántulas de soja después de 4 horas y 6 días de la inoculación con <i>B. japonicum</i> E109 en medios EMA y EMA con la adición de AIA durante la fase de crecimiento exponencial. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. (+) Representan el porcentaje de diferencias positivas contra el tratamiento EMA..... | 158 |
| Tabla 19. Composición del medio EMA modificado..... | 179 |
| Tabla 20. Secuencias codificantes del clúster <i>iac</i> en E109 y <i>H. seropedicae</i> SmR1 en relación con las secuencias homólogas del clúster de <i>P. putida</i> 1290. | 196 |
| Tabla 21. Proteínas del clúster <i>iac</i> identificadas, con cobertura media, en el sobrenadante inducido con AIA de <i>B. japonicum</i> E109 | 198 |
| Tabla 22. Proteínas del clúster <i>iac</i> identificadas, con cobertura baja, en el sobrenadante inducido con AIA de <i>B. japonicum</i> E109 | 198 |
| Tabla 23. Valores de la producción de biomasa (DO_{595}) y el número de células (ufc.ml ⁻¹) por <i>B. japonicum</i> E109 en el medio EMA o EMA modificados por la adición de AIA como fuente de | |

carbono. Las letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un $p < 0,05$ 199

Tabla 24. Búsqueda de enzimas dioxigenasas en el genoma de E109 mediante RAST 202

GLOSARIO

| Abreviación | Significado |
|-------------------|--|
| A | Adenina |
| ABA | Ácido Abscísico |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AG ₃ | Ácido giberélico |
| AIA | Ácido indol-3-acético |
| ANA | Ácido acético-1-naftaleno |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNt | Ácido ribonucleico de transferencia |
| Asp | Ácido aspártico |
| ATP | Trifosfato de adenosina |
| Biocontrol-PGPB | Bacterias promotoras del crecimiento vegetal por control biológico |
| C | Carbono |
| C | Citocina |
| Ca ²⁺ | Calcio |
| CCD | Dispositivo de carga acoplada |
| dATP | Desoxiadenosina trifosfato |
| dCTP | Desoxicitocina trifosfato |
| ddNTP | Didesoxinucleótido |
| DDT | Ditiotreitol |
| dGTP | Desoxiguanina trifosfato |
| dNTP | Desoxirribonucleótido trifosfato |
| DO | Densidad óptica |
| dTTP | Desoxitimina trifosfato |
| ECN | Extracto Crudo de Nabo |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EPS | Exopolisacáridos |
| FBN | Fijación biológica de nitrógeno |
| FeCl ₃ | Cloruro de hierro |
| G | Guanina |
| g.l ⁻¹ | Gramos por litro |
| Gas | Giberelinas |
| GC | Guanina-Citocina |

| | |
|--------------------------------|---|
| h | Horas |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrógeno |
| H ₂ SO ₄ | Ácido sulfúrico |
| HCl | Ácido clorhídrico |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta eficiencia |
| HRP | Peroxidasa de rábano picante |
| IAM | Indol-3-piruvato |
| IAN | Indol-3-acetonitrilo |
| IBA | Ácido indol butírico |
| IMP | Proteína de la membrana interna |
| IPyA | Indol-3-piruvato |
| ISGA | Servicio integrado para el análisis genómico |
| JA | Ácido jasmónico |
| K | Cinetina |
| Kb | Kilobase |
| KEGG | Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas |
| L-ala | Alanina |
| LC-MRM-MS | Cromatografía líquida-monitoreo de múltiples reacciones-espectrometría de masas |
| LCO | Lipoquitoologosacáridos o factores Nod |
| L-leu | Leucina |
| L-phe | Fenilalanina |
| L-Trp | L-Triptófano |
| M | Molar |
| Mb | Mega pares de base |
| MCP | Proteínas quimiotácticas que aceptan grupos metilo |
| mg | Miligramos |
| mg.l ⁻¹ | Miligramos por litro |
| min | Minutos |
| ml | Mililitros |
| ml.min ⁻¹ | Mililitro por minuto |
| mM | Milimolar |
| MS | Espectrometría de masas |
| N | Nitrógeno |
| NCBI | Centro Nacional para la Información Biotecnológica |

| | |
|----------------------|---|
| NGS | Secuenciación de segunda generación |
| NH ₃ | Amoníaco |
| nm | Nanómetro |
| nt | Nucleótidos |
| OMP | Proteína de la membrana externa |
| OPDA | Ácido 12-oxofitodienoico |
| p/v | Peso en volumen |
| PAA | Ácido fenilacético |
| pb | Pares de base |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PFGE | Electroforesis en gel de campo pulsátil |
| PGM | Máquina de genoma personal |
| PGPR | Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal |
| pmol | Picomol |
| PO ₄ | Fosfato |
| RNA-seq | Secuenciación de ARN |
| RPKM | Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RT | Tiempo de retención |
| s | Segundos |
| SOP | Procedimientos operativos estándar |
| SPE | Extracción en fase sólida |
| T | Timina |
| T1SS | Sistema de secreción tipo I |
| T2SS | Sistema de secreción tipo II |
| T3SS | Sistema de secreción tipo III |
| T4SS | Sistema de secreción tipo IV |
| T5SS | Sistema de secreción tipo V |
| T6SS | Sistema de secreción tipo VI |
| TAM | Triptamina |
| TBE | Tris-borato-EDTA |
| TE | Tris EDTA |
| TSO | Oxidasa de cadena lateral de triptófano |
| ufc.ml ⁻¹ | Unidades formadoras de colonias por mililitro |

| | |
|---------------------------|---|
| ufc.semilla ⁻¹ | Unidades formadoras de colonias por semilla |
| V | Voltios |
| v/v | Volumen en volumen |
| WGS | Whole genome shotgun |
| Z | Zeatina |
| µg | Microgramo |
| µl | Microlitro |
| µm | Micrómetro |

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 sobre el concepto de bacterias promotoras del crecimiento, la clasificación filogenéticas y los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal de *B. japonicum* E109. Además se presenta la hipótesis y objetivos de esta tesis doctoral.

Capítulo II. Análisis genómico y funcional del genoma de *B. japonicum* E109

Este capítulo se presentan los resultados del análisis genómico y funcional de E109, utilizando herramientas bioinformáticas, comparándolos con otras cepas del mismo género como así también especies. Dentro del análisis funcional, se detallan las vías metabólicas de los principales mecanismos de promoción de crecimiento vegetal.

Capítulo III. Metabolismo de Auxinas y Catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

En este tercer capítulo se presentan los resultados del metabolismo de auxinas (biosíntesis, hidrólisis, conjugación y catabolismo), y particularmente el catabolismo de AIA de E109.

Capítulo IV. Análisis de genes y mutantes involucrados con el catabolismo de AIA de *B. japonicum* E109

En este cuarto capítulo se presentan los resultados de la modificación a nivel molecular de aquellos genes vinculados con catabolismo de auxinas (AIA) y su correlación e importancia en los procesos de interacción planta-microorganismo.

Capítulo V. Catabolismo de Indol de *B. japonicum* E109

En este capítulo se presentan los resultados del catabolismo de indol en E109. Estos son resultados que derivan de la investigación del catabolismo de AIA y que no estaban planteados en los objetivos iniciales de esta tesis.

Capítulo VI. Análisis transcriptómico del catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

Este capítulo muestra los resultados de la evaluación de la transcriptómica durante el catabolismo de AIA y el posterior análisis de la expresión de los genes.

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

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

I. 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

En los últimos años, en nuestro país hubo una expansión de los cultivos y esa expansión ha sido acompañada por el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, en productos definidos particularmente como inoculantes y de manera general como bioinsumos. Uno de los cultivos más importantes en nuestro país en términos de superficie cultivada y área bajo tratamiento biológico es la soja, que representa cerca del 94% de la superficie sembrada y 95% de la producción total del país, de la que cerca de un 85% sería inoculada. Este escenario presenta una inmejorable oportunidad para el desarrollo de nuevos productos (bioinsumos) por lo que todo avance sobre la comprensión del modelo de interacción planta-microorganismo se consideraría estratégico para nuestro país y la región. Las rizobacterias promotoras del crecimiento han sido extensamente estudiadas desde el punto de vista taxonómico, bioquímico y fisiológico, como así también como a nivel de la comprensión de los mecanismos que utilizarían para promover el crecimiento vegetal; sin embargo, a la fecha no existía un abordaje molecular masivo que permitiese obtener un modelo más detallado de tales mecanismos. Por ello, secuenciar el genoma de *Bradyrhizobium japonicum* E109, la cepa más utilizada para el tratamiento biológico del cultivo de soja en nuestro país, nos permite:

- incrementar el conocimiento básico sobre la interacción de la leguminosa y otras especies vegetales con la rizobacteria,
- dilucidar los mecanismos fisiológicos que operan en tal interacción, como así también los fundamentos del éxito de la aplicación agronómica de este microorganismo, que lo posiciona como uno de los principios activos de mayor importancia para la formulación de inoculantes en nuestro país.

I.1.1 Secuenciación de genomas

El avance de tecnologías de secuenciación en los últimos 40 años ha permitido el estudio y comprensión de los genomas. 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). La primer tecnología de secuenciación fue el “método Sanger” (Sanger y Coulson, 1975). Esta técnica, además de ser revolucionaria permitió el desarrollo del Proyecto Genoma Humano. El desarrollo tecnológico permitió la evolución de las técnicas de secuenciación, como las tecnologías de “segunda generación” entre las que se destacan 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 *B. japonicum* E109.

I.1.2 Genomas bacterianos y secuenciación

La secuenciación de los genomas de procariotas, ha ido aumentando en los últimos años debido a que ha disminuido considerablemente el costo de la tecnología de secuenciación del genoma completo (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 softwares 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 disponible de los científicos y laboratorios para lograr resultados significativos (Nocq et al., 2013). Actualmente, de los proyectos de secuenciación de procariotas: 14.803 proyectos son proyectos completos y publicados, 123.124 son borradores permanentes, 72.734 son proyectos incompletos y 1124 son proyectos targets (<https://gold.jgi.doe.gov/>).

I.1.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal

El suelo es el soporte natural en el que proliferan comúnmente un gran número de microorganismos. Se utiliza el término rizósfera para describir la parte del suelo en la que se induce la proliferación de microorganismos por la presencia del sistema radical de las plantas (Gárate y Bonilla, 2000). Las bacterias de la rizósfera denominadas rizobacterias, tienen la capacidad de colonizar el interior o exterior de las raíces de muchas especies vegetales y se pueden separar entre las que generan una relación simbiótica con la planta y las que no lo hacen, denominadas de vida libre, que se ubican cerca, sobre las raíces o dentro de ellas como endofíticas (Kloepper et al., 1989). Los rizobios han sido extensamente estudiados desde la perspectiva de su asociación con leguminosas y en términos de la fijación biológica de nitrógeno. Sin embargo, nueva evidencia sugiere que gran parte de los miembros de este género tendrían potencialidad para promover el crecimiento vegetal por mecanismos distintos a la fijación biológica de nitrógeno, biocontrolar ciertos microorganismos deletéreos para las plantas o regular el desarrollo vegetal en condiciones de estrés, tanto en leguminosas como en no-leguminosas (Biswas et al., 2000). Así, cuando estas bacterias o las de vida libre se consideran benéficas para el crecimiento de las plantas se las

denomina en general como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal o PGPR (del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria) (Kloepper y Metting Jr., 1992). Entre las asociaciones más exitosas de la naturaleza se destacan las de las leguminosas con bacterias simbiotes fijadoras de nitrógeno, comúnmente denominadas rizobios, como la de *Bradyrhizobium*-soja, y la asociación benéfica entre gramíneas y ciertas cepas PGPR de vida libre pertenecientes a los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azotobacter* y *Azospirillum*, capaces de colonizar la rizósfera de dichas plantas o sus tejidos de manera endofítica (Döbereiner y Pedroza, 1987). Bashan y Holguin (1998) introdujeron un nuevo concepto que divide este grupo entre las PGPR, que promueven el crecimiento mediante mecanismos directos y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal por control biológico o biocontrol-PGPB (del inglés, Plant Growth Promoting Biocontrol) que promueven el crecimiento de las plantas por mecanismos indirectos mediados por la inhibición del desarrollo o actividad de fitopatógenos. La promoción directa del crecimiento se produce cuando una PGPR proporciona moléculas con actividad biológica que directamente afectan al metabolismo de la planta o cuando se facilita la adquisición de nutrientes no disponibles en el suelo para las plantas. En las PGPR los mecanismos directos más importantes que han sido propuestos, además de la fijación biológica del nitrógeno son: (a) la actividad nitrato reductasa, (b) la solubilización de fosfatos, (c) la producción de sideróforos y (d) la biosíntesis de fitohormonas y otros compuestos reguladores del crecimiento vegetal, tal como el ácido indol-3-acético (AIA) (Prinsen et al., 1993).

I.1.4 Bacterias del Orden *Rhizobiales*

La clase *alphaproteobacterias* es muy diversa y encontramos bacterias fotótrofas, parásitos intracelulares, oligótrofos, entre otros. La clase se compone de los siguientes Órdenes; *Caulobacterales*, *Holosporales*, *Kiloniellales*, *Kopriimonadales*, *Kordiimonadales*, *Magnetococcales*, *Micropepsales*, *Parvularculales*, *Pelagibacterales*, *Rhodobacterales*, *Rhodospirillales*, *Rhodothalassiales*, *Rickettsiales*, *Sneathiellales*, *Sphingomonadales* y *Rhizobiales*. El Orden *Rhizobiales* se compone de diferentes familias tales como *Aurantimonadaceae*, *Bartonellaceae*, *Beijerinckiaceae*, *Brucellaceae*, *Chelatococcaceae*, *Cohaesibacteraceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Mabikibacteraceae*, *Methylobacteriaceae*, *Methylocystaceae*, *Notoacmeibacteraceae*, *Phyllobacteriaceae*, *Rhizobiaceae*, *Rhodobiaceae*, *Roseiarcaceae*, *Xanthobacteraceae* y *Bradyrhizobiaceae*. Este Orden es fenotípicamente heterogéneo, amplio y reúne a bacterias gran negativas y su clasificación se basa únicamente en el secuenciamiento del gen 16s RNA (Kuykendall, 2005). Un tipo de bacterias muy importante desde el punto de vista agronómico, dentro del Orden, es el que está conformado por aquellas que son capaces de establecer simbiosis mutualistas específicas con leguminosas. Entre ellas encontramos bacterias de

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (antes *Sinorhizobium*), *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Phyllobacterium*, *Microvirga*, *Azorhizobium*, *Ochrobactrum*, *Methylobacterium*, *Cupriavidus*, *Devosia*, *Shinella* (Weir, 2016) y *Aminobacter* (Maynaud et al., 2012). *Bradyrhizobium* es el género el de interés para nuestro trabajo de investigación.

I.1.5 La Familia *Bradyrhizobiaceae*

La nomenclatura tradicional, *Rhizobium*, se modificó cuando el género *Bradyrhizobium* fue descrito por Jordan (1982), el cual incluía todas las bacterias que fijan biológicamente el nitrógeno (FBN) en asociación simbiótica con leguminosas. La nomenclatura se basa en los rasgos fisiológicos de los rizobios. Los avances en los métodos moleculares para el análisis filogenético, han llevado a la creación de la familia *Bradyrhizobiaceae*, que incluye géneros de bacterias fijadoras de nitrógeno que tienen características diferentes del resto de los géneros que la componen, pero que tienen tasas similares de crecimiento, considerado lento (5-6 días) en medio de cultivo (Garrity et al. 2005; Turner y Young, 2000). Además del género *Bradyrhizobium* (derivado del *bradus* término latino, que significa crecimiento lento) (Garrity et al. 2005; Euzéby, 2006), la familia *Bradyrhizobiaceae* comprende los siguientes géneros: *Afipia*, *Blastobacter*, *Bosea*, *Nitrobacter*, *Oligotropha*, *Photorhizobium*, *Rhodopseudomonas*, *Salinarimonas*, *Tardiphaga* y *Variibacter*. La taxonomía en *Bradyrhizobiaceae* es bastante confusa y hace esta familia una de las más distintas en términos de la inclusión de géneros que son fenotípicamente diversos y que presentan características fisiológicas y ecológicas extremas (Marcondes de Souza et al. 2014).

I.1.6 El Género *Bradyrhizobium*

El género *Bradyrhizobium*, se caracteriza porque las bacterias son pequeñas y en forma de bacilos en cultivos jóvenes, pero son pleomórficas en cultivos de mayor edad o bajo condiciones adversas. Las diferentes especies del género *Bradyrhizobium* forman nódulos en simbiosis con raíces de las leguminosas tropicales (*Leguminosae*), en el que las bacterias viven como microsimbiontes fijadores de nitrógeno. Tienen gránulos de poli- β -hidroxibutirato que son que son refráctiles por microscopía de contraste de fase y los bacteroides pueden presentar inclusiones de polifosfato. Son Gram-negativas, móviles y no formadoras de esporas. Las células bacterianas de este género se caracterizan por una división bifurcada que se traduce en las células en forma de Y en los cultivos. En medio de cultivo sólido que contiene arabinosa, extracto de levadura, o gluconato (Kuykendall 1987; Kuykendall et al 1988), las colonias de *Bradyrhizobium* se caracterizan por ser opacas, rara vez translúcidas, blancas, y convexas; pueden tener un aspecto granular; y nunca son más grande que 1 mm de diámetro después de la incubación durante 5-6 días. En medio líquido, la turbidez sólo

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

aparece después de 3-4 días, y el tiempo de generación de estas especies se calcula que es entre 9 y 18 horas.

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

| Género <i>Bradyrhizobium</i> | |
|--|---|
| Morfología | Bacilos (0.5-0.9 x 1.2-3.0 μ m) |
| División Celular | Se hinchan y se bifurcan en forma de Y |
| Cápsula y estructura interna | Gránulos Poli- β -hidroxibutirato |
| Movilidad | Un flagelo polar o subpolar |
| Compuestos importantes o de almacenamiento | Poli- β -hidroxibutirato Polisacárido extracelular soluble en agua |
| Contenido Guanina-Citocina (GC) | 61-65% |
| Tamaño de la colonia, apariencia y color | >1.0 mm, circular, opaca, blanca y convexa |
| Temperatura óptima | 25-30 °C |
| pH óptimo | pH 6-7. Tolerante al ácido |
| | Aeróbicas |
| | Quimioorganótrofas |
| Metabolismo y características de cultivo | No crecen en medio con 2% NaCl Absorben levemente el indicador rojo Congo en medio EMA |
| | Usan varias fuentes de carbono y ácidos |
| Principal fuente de Carbono | Orgánicos |
| Principal fuente de Nitrógeno | Sales de amonio, nitrato y aminoácidos |
| Fijación de Nitrógeno | En simbiosis con la raíces de leguminosas |
| Asimilación de Carbono | No |

El género *Bradyrhizobium* cuenta con 50 especies descritas hasta el momento: *B. betae* (Rivas et al., 2004), *B. canariense* (Vinuesa et al., 2005), *B. cytisi* (Chahboune et al., 2011), *B. daqingense* (Wang et al., 2013), *B. denitrificans* (Van Berkum et al., 2006), *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1991), *B. embrapense* (Delamuta et al., 2015), *B. erythrophlei* (Yao et al., 2015), *B. ferriligni* (Yao et al., 2015), *B. ganzhouense* (Lu et al., 2014), *B. guangdongense* (Li et al., 2015), *B. huanghuaihaiense* (Zhang et al., 2012), *B. icense* (Durán et al., 2014a), *B. ingae* (da Silva et al., 2014), *B. iriomotense* (Islam et al., 2008), *B. japonicum* (Jordan, 1982), *B. jicamae* (Ramírez-Bahena et al., 2009), *B.*

kavangense (Grönemeyer et al., 2015), *B. lablabi* (Chang et al., 2011), *B. liaoningense* (Xu et al., 1995), *B. lupini* (Peix et al., 2015), *B. manausense* (Silva et al., 2014), *B. neotropicae* (Zilli et al., 2014), *B. oligotrophicum* (Ramírez-Bahena et al., 2013), *B. ottawaense* (Yu et al., 2014), *B. pachyrhizi* (Ramírez-Bahena et al., 2009), *B. paxllaeri* (Durán et al., 2014a), *B. retamae* (Guerrouj et al., 2013), *B. rifense* (Chahboune et al., 2012), *B. stylosanthis* (Delamuta et al., 2016), *B. subterraneum* (Grönemeyer et al., 2015), *B. tropiciagri* (Delamuta et al., 2015), *B. viridifuturi* (Helene et al., 2015), *B. yuanmingense* (Yao et al., 2002), *B. americanum* (Ramírez-Bahena et al., 2016), *B. centrosemae* (Ramírez-Bahena et al., 2016), *B. arachidis* (Wang et al., 2013), *B. diazoefficiens* (Delamuta et al., 2013), *B. guangxiense* (Li et al., 2015), *B. mercantei* (Helene et al., 2017), *B. namibiense* (Grönemeyer et al., 2017), *B. valentinum* (Durán et al., 2014b), *B. vignae* (Grönemeyer et al., 2016), *B. brasilense* (Martins da Costa et al., 2017), *B. cajani* (Araújo et al., 2017), *B. sacchari* (de Matos et al., 2017), *B. centrolobii* (Michel et al., 2017), *B. macuxiense* (Michel et al., 2017), *B. forestalis* (Martins da Costa et al., 2018) y *B. algeriense* (Ahnia et al., 2018). Las diferentes especies del género *Bradyrhizobium* se caracterizan por ser considerados habitantes comunes de suelo y potencialmente capaces de invadir los pelos radicales de leguminosas de zonas tropicales y en algunos casos de zonas templadas e inducen la formación de nódulos y la interacción simbiótica con la planta que termina con la fijación biológica de nitrógeno atmosférico. Estas cepas causan la formación de nódulos en *Glycine max* (soja), *Vigna* (caupí), *Macroptilium* (siratiro), ciertas especies de *Lotus*, y una amplia variedad de las leguminosas, que también son noduladas por *Mesorhizobium loti*, como *Acacia*. Debido a que las cepas de *Bradyrhizobium* son difíciles de aislar directamente del suelo, el aislamiento requiere el uso de la planta de la leguminosa de la que se seleccionan los nódulos para el aislamiento. *Bradyrhizobium* sp. produce lipoquitologosacáridos (LCO) o comúnmente denominados factores Nod para controlar la especificidad del hospedador (Dénarié et al., 1992; Carlson et al., 1993; Stacey et al., 1995).

I.1.7 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en bacterias del Orden *Rhizobiales*.

El primer mecanismo propuesto para explicar el efecto en la promoción del crecimiento de las bacterias del orden *Rhizobiales* en plantas superiores fue la Fijación Biológica de Nitrógeno (FBN) (Devron, 1983); sin embargo, cada vez se obtienen reportes de la capacidad de ciertos bradyrhizobios y entre ellos la cepa E109 para promover el crecimiento de las no-leguminosas por mecanismos diferentes para FBN (Cassán et al., 2009). Terouchi y Syōno (1990) probaron que *Rhizobium* sp. podía adherirse de manera reversible a la superficie de monocotiledóneas, de la misma manera que se adhería a las raíces de dicotiledóneas. Adicionalmente, Peña-Cabrales y Alexander (1983) establecieron que *Bradyrhizobium* sp. podía crecer eficientemente sobre la

superficie de semillas de gramíneas o leguminosas durante su germinación, pudiendo además, desarrollarse en su sistema radical de manera endofítica de la misma manera que una bacteria de *vida libre*. En experimentos realizados en condiciones agronómicas, Höflich et al. (1995) obtuvieron importantes incrementos en el crecimiento y la producción de materia seca por la inoculación de semillas de trigo (*Triticum aestivum* L.) y cebada (*Hordeum vulgare* L.) con una cepa de referencia de *Rhizobium leguminosarum*. En un modelo similar, Yanni et al. (1997), demostraron que otra cepa de la misma especie bacteriana podía colonizar eficientemente raíces de arroz (*Oryza sativa* L.); consecuentemente mejorar su crecimiento y aumentar su productividad en sistemas de cultivo. En otros experimentos, Noel et al. (1996) demostraron que la inoculación de lechuga (*Lactuca sativa* L.) y canola (*Brassica napá* L.) con una cepa de referencia de *R. leguminosarum* podía promover el desarrollo temprano del sistema radical, así como aumentar el número de raíces secundarias en sistemas hidropónicos de cultivo. Estos autores, así como Chabot et al. (1996) establecieron que parte de la capacidad de tales cepas de *R. leguminosarum* podría deberse a la presencia de mecanismos directos de promoción del crecimiento vegetal, tal como la producción de sideróforos, solubilización de fosfatos y principalmente por la producción de compuestos reguladores del crecimiento vegetal del tipo fitohormonas y dentro de ellas, el ácido indol-3-acético. Tien et al. (1979) fueron los primeros en sugerir que las bacterias rizosféricas, podrían mejorar el crecimiento vegetal por excreción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA) y las citocininas.

I.1.8 Auxinas y rizobacterias

Las auxinas se caracterizan por tener un anillo cíclico, por lo menos un doble enlace en el anillo cíclico, un grupo funcional carboxílico y otro funcionalmente análogo. Son un grupo de fitohormonas que actúan como reguladoras del crecimiento vegetal y provocan la elongación de las células en la región sub-apical y que logran reproducir el efecto fisiológico de AIA. En rizobacterias, se han propuesto al menos seis vías metabólicas para la síntesis del AIA cinco dependientes del aminoácido triptófano (L-Trp) como precursor y una vía independiente. Las vías se denominan según su intermediario: vía del indol-3-piruvico (IPyA); vía de la triptamina (TAM) y vía del ácido-3-acetamida (IAM), el triptófano de la cadena lateral oxidasa (TSO), indol-3-acetonitrilo (IAN) las cuales son dependientes de L-Trp y una vía de triptófano-independiente.

I.1.8.1 Biosíntesis de auxinas en *Bradyrhizobium*

Actualmente para las bacterias del género *Bradyrhizobium*, ha sido descrita la producción de auxinas como parte de la capacidad promotora del crecimiento, fundamentalmente a nivel del

desarrollo del sistema radical y en la formación de nódulos durante la simbiosis. Se ha descrito la capacidad de *Bradyrhizobium* de sintetizar AIA en diversos experimentos. Hunter (1987; 1989) demostraron que los nódulos producidos por una cepa de *B. japonicum* hiperproductora de AIA contienen mayor cantidad de hormonas, que los nódulos de la cepa control. Esto permite inferir que la bacteria es capaz de sintetizar la auxina cuando se encuentra en el estado de bacteroide. Minamisawa y Fukai (1991) reportaron la síntesis de AIA en diferentes cepas de *B. japonicum* entre ellos la cepa USDA110 (actualmente *B. diazoefficiens*). Boiero et al. (2007) identificó y cuantificó la fitohormonas AIA en cultivos de *B. japonicum* E109.

I.1.8.2 Catabolismo de auxinas en *Bradyrhizobium*

La actividad de degradación o catabolismo de AIA implica la pérdida de actividad de la molécula o la asimilación como fuente de carbono y nitrógeno. Además de sintetizar AIA, algunas cepas de *B. japonicum* tienen capacidad de catabolizar esta molécula. A finales de la década del 80, Nielsen et al. (1988) observaron la actividad de degradación de AIA *in vivo* en *B. japonicum*. Este fue el primer reporte de la degradación de AIA. Minamisawa y Fukai (1991) no solo reportaron la biosíntesis de la auxina, sino que además hicieron una diferenciación entre cepas que sintetizaban AIA de aquellas que no, basando su teoría en que no se podía cuantificar la fitohormona en los cultivos de algunas cepas porque existía una actividad catabólica fuerte. Investigaciones posteriores, hipotizaron que esta reacción sería dependiente de oxígeno y que el producto final de la degradación sería ácido antranílico (Egebo et al., 1991; Jensen et al. 1995). Resultados previos en nuestro laboratorio, determinaron que *B. japonicum* E109 tiene la capacidad de degradar AIA en cultivos conteniendo células metabólicamente activas o sobrenadantes sin células (Cassán et al. 2011).

I.1.9 *B. japonicum* E109 como modelo de estudio

En la década del 70, cuando se produjo la expansión del cultivo en nuestro país, se consideró la introducción de cepas seleccionadas de *B. japonicum* en semillas de soja destinadas a la producción agrícola. Varias cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* sp. se recibieron en Argentina a partir de diferentes colecciones de todo el mundo para ser evaluadas en condiciones agronómicas, incluida la cepa 2860 (anteriormente llamado USDA 138 y que corresponde al serogrupo *Bradyrhizobium japonicum* USDA 6), enviada por el Departamento de Investigación Científica e Industrial (DSIR) en Nueva Zelanda. Luego de una exhaustiva evaluación, selección y re aislamiento de nódulos de soja, la cepa fue rebautizada como E109. Hasta la fecha, *B. japonicum* E109 ha sido la única cepa recomendada por el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria

(INTA) para la inoculación de soja debido a su capacidad para colonizar efectivamente la planta y fijar el nitrógeno, y como consecuencia directa produce un aumento en la productividad de los cultivos (Perticari et al. 1996). Junto con esta capacidad, se han propuesto mecanismos alternativos para explicar la promoción del crecimiento, especialmente en no leguminosas. Boiero et al. (2007) y Cassán et al. (2009) evaluaron *in vitro* e *in vivo* alguno de los mecanismos de promoción del crecimiento que operan en *B. japonicum* E109. En tal sentido, la producción de fitohormonas parecería tener un rol fundamental en los procesos de interacción con la planta y promoción del crecimiento en especies no-leguminosas.

I.1.10 Mecanismos de promoción del crecimiento vegetal en *B. japonicum* E109

Resultados previos de nuestro laboratorio (Boiero et al., 2007; Cassán et al. 2009) sugieren que esta cepa sería capaz de promover el crecimiento de plantas inoculadas a través de la producción de fitohormonas y su consecuente liberación en las formulaciones biológicas utilizadas para el tratamiento de semillas. En el trabajo de Boiero et al. (2007) se han identificado y cuantificado las fitohormonas del tipo ácido indol-3-acético (AIA), zeatina (Z) y ácido giberélico (AG₃), producidas y liberadas al medio de cultivo. En trabajos similares otros autores sugieren la capacidad de otras cepas de la misma especie para mineralizar fósforo por la solubilización de fosfatos (Halder et al., 1991) o captar hierro a través de la producción de sideróforos (Chabot et al., 1996).

I.1.10 Secuenciación masiva en cepas de *Bradyrhizobium japonicum*

El avance de la tecnología de secuenciación ha permitido secuenciar muchas especies del género *B. japonicum*. En la actualidad existen 22 genomas secuenciados. El primer genoma de *B. japonicum* en secuenciarse fue el la cepa USDA 6 en el año 2011 (Kaneke et al., 2011). En 2012 se secuenciaron cinco cepas; CCBAU 15354, CCBAU 15517, CCBAU 15618, CCBAU 25435 y CCBAU 83623 (Tian et al., 2012). Un año más tarde, se secuenciaron nueve cepas; USDA 124 (https://genome.jgi.doe.gov/B370DRAFT_10443/B370DRAFT_10443.info.html), is5 (https://genome.jgi.doe.gov/Brajapis5_FD/Brajapis5_FD.info.html), in8p8 (https://genome.jgi.doe.gov/Brajapin8p8_FD/Brajapin8p8_FD.info.html), USDA 4 (https://genome.jgi.doe.gov/BrajapUSDA4_FD/BrajapUSDA4_FD.info.html), USDA 38 (https://genome.jgi.doe.gov/Braja_USDA_38/Braja_USDA_38.info.html), USDA 135 (<https://gold.jgi.doe.gov/project?id=9850>), USDA 122 (https://genome.jgi.doe.gov/YUEDRAFT_8370/YUEDRAFT_8370.info.html), 22 (<https://genome.jgi.doe.gov/Brajap22/Brajap22.info.html>), y USDA 123 (https://genome.jgi.doe.gov/BrajapUSDA123_FD/BrajapUSDA123_FD.info.html). En 2014 se

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

secuenciaron 2 cepas de *B. japonicum*, SEMIA 5079 o CPAC 15 (Siqueira et al., 2014) y Is-34 (Tsurumaru et al., 2014). En 2015, se secuenciaron las cepas FN1 (Kohlmeier et al. 2015), Is-1 (Sakata et al., 2015) y E109 (Torres et al., 2015). En 2017, se obtuvo la secuencia completa de la cepa J5 (Kanehara y Minamisawa, 2017) y UBMA197 (Chekireb et al., 2017). Sin embargo, no todas las cepas secuenciadas tienen su genoma cerrado completamente ya que se encuentran a nivel de scaffold o contig. La siguiente Tabla muestra un resumen del estado de todas las secuenciaciones de las cepas de *B. japonicum*.

Tabla 2. Resumen del estado de secuenciación de las cepas de *B. japonicum*

| Cepa | Nivel de ensamblaje | Tecnología de secuenciación | Longitud de secuencia total |
|-------------|---------------------|---|-----------------------------|
| USDA 6 | Complete Genome | 454 GS FLX; ABI 3730 | 9,207,384 |
| CCBAU 15354 | Contig | Illumina HiSeq2000 | 10,126,594 |
| CCBAU 15517 | Contig | Illumina HiSeq2000 | 9,917,031 |
| CCBAU 15618 | Contig | Illumina HiSeq2000 | 9,824,012 |
| CCBAU 25435 | Contig | Illumina HiSeq2000 | 9,460,795 |
| CCBAU 83623 | Contig | Illumina HiSeq2000 | 10,074,298 |
| USDA 124 | Scaffold | 454-GS-FLX-Titanium; Illumina | 9,002,274 |
| is5 | Contig | Illumina HiSeq 2000 | 7,588,794 |
| in8p8 | Scaffold | Illumina HiSeq 2000 | 7,589,915 |
| USDA 4 | Scaffold | 454-GS-FLX-Titanium; Illumina | 8,737,671 |
| USDA 38 | Scaffold | 454-GS-FLX-Titanium; Illumina | 9,608,975 |
| USDA 135 | Scaffold | 454-GS-FLX-Titanium; Illumina | 7,703,324 |
| USDA 122 | Scaffold | 454-GS-FLX-Titanium; Illumina | 8,976,980 |
| 22 | Scaffold | Illumina HiSeq 2000 | 7,504,559 |
| USDA 123 | Scaffold | 454-GS-FLX-Titanium; Illumina HiSeq 2000 | 10,457,665 |
| SEMIA 5079 | Complete Genome | 454 | 9,583,027 |
| Is-34 | Scaffold | Illumina MiSeq | 10,326,597 |
| FN1 | Scaffold | Illumina MiSeq | 9,138,496 |
| Is-1 | Scaffold | Illumina MiSeq | 8,983,878 |
| E109 | Complete Genome | 454 | 9,224,208 |
| J5 | Complete Genome | Illumina MiSeq | 10,138,651 |
| UBMA197 | Contig | Illumina Hiseq 2*250; Miseq 2*300 | 10,442,239 |

Teniendo en cuenta estos antecedentes y considerando que en nuestro modelo de bacteria se ha determinado que es capaz de promover el crecimiento en leguminosas por mecanismos como la FBN y la producción de fitohormonas, desde más de 40 años debido a su uso agronómico y dado que no hay una comprensión genómica de cómo están determinados esos mecanismos de promoción de crecimiento vegetal, la secuenciación masiva nos permitirá conocer el genoma de *Bradyrhizobium japonicum* E109 de manera precisa y detallada y de este modo incrementar el conocimiento básico sobre los mecanismos que dominan la interacción benéfica entre plantas y bacterias de este género y consecuentemente la mejora de inoculantes formulados con esta bacteria.

I.2 HIPÓTESIS

En base a los antecedentes, se sugirieron las siguientes hipótesis de trabajo.

I.2.1 Hipótesis principal

El análisis genómico y la comprobación fisiológica de ciertos mecanismos de promoción del crecimiento vegetal presentes en *B. japonicum* E109 nos permitirán generar un modelo más detallado de la interacción planta-rizobacteria y consecuentemente optimizar la funcionalidad de los inoculantes formulados en base a este microorganismo.

I.2.2 Hipótesis secundaria

El catabolismo del ácido indol-3-acético por *B. japonicum* E109 modifica su comportamiento simbiótico y saprofito y podría utilizarse como un mecanismo de interés para la optimización de los inoculantes formulados en base a esta bacteria.

I.3 OBJETIVOS

I.3.1 Objetivos generales

Generar un modelo funcional más detallado de la interacción *Bradyrhizobium*-soja, así como proponer alternativas tecnológicas para optimizar la producción de inoculantes en nuestro país. En este plan de tesis realizaremos el análisis de la secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109, la secuenciación transcriptómica en diferentes condiciones experimentales relacionadas con el metabolismo de auxinas, en particular con su catabolismo de AIA y su comprobación molecular y fisiológica, desde el punto de vista básico y tecnológico.

Para ello, nos hemos planteado los siguientes objetivos generales:

1. Analizar el genoma de *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina.
2. Identificar secuencias relacionadas con funciones metabólicas asociadas al metabolismo de auxinas y particularmente el catabolismo de AIA en el genoma.
3. Secuenciar el transcriptoma de *B. japonicum* E109 y analizar la expresión génica en diferentes condiciones metabólicas relacionadas con el catabolismo de auxinas.
4. Modificar a nivel molecular, aquellas funciones metabólicas vinculadas con el catabolismo de auxinas (AIA) y establecer su correlación e importancia en los procesos de interacción planta-microorganismo.

I.3.2 Objetivos específicos

1. Realizar un análisis bioinformático del genoma de *B. japonicum* E109 a nivel de los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal y principalmente sobre el metabolismo de auxinas. Comparar tales mecanismos con aquellos descritos en otras cepas del mismo género previamente secuenciadas.
2. Secuenciar el transcriptoma de *B. japonicum* E109 obtenido en condiciones de cultivo relacionadas con el catabolismo y la homeostasis bacteriana de auxinas y analizar los resultados desde el punto de vista bioinformático y fisiológico.
3. En base a la secuenciación, generar variantes genotípicas para las funciones metabólicas que resulten de mayor interés y evaluar su comportamiento molecular, microbiológico y fisiológico.
4. Correlacionar las funciones modificadas con la capacidad de *B. japonicum* E109 para promover el crecimiento y desarrollo en ciertas especies vegetales.

CAPÍTULO II: Análisis genómico y funcional del genoma de *B. japonicum* E109

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

II.1 INTRODUCCIÓN

Argentina es uno de los países productores de cereales y leguminosas más importante a nivel global. En el caso de las leguminosas, la expansión de los cultivos ha sido y es actualmente acompañada por el uso de bacterias PGPR, en productos definidos particularmente como inoculantes. La soja, es una de las leguminosas con más área sembrada: 18 millones de hectáreas en la campaña 2017-2018, con un rendimiento aproximado de 53,5 millones de toneladas (<http://www.bolsadecereales.com/>), donde al menos el 85%, en promedio, son tratados biológicamente con bacterias del tipo bradyrhizobios (Piccinetti et al. 2013). La soja es un cultivo con altos requerimientos nutricionales, donde el nitrógeno es uno de los elementos más importantes y su disponibilidad condiciona en gran medida la productividad de los cultivos. Uno de los mecanismos más importantes de las PGPR, la fijación biológica de nitrógeno (a través de la inoculación de las semillas con bacterias de *B. japonicum*) puede aportar una gran proporción del N total. *B. japonicum* E109 es la cepa más utilizada en la formulación de inoculantes desde hace varias décadas y existen muchos reportes científicos de su desempeño en condiciones tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo hasta 2012 no existía un abordaje molecular masivo que permitiese obtener un modelo más detallado de los mecanismos que operan en la cepa, además de la FBN, para la inoculación de cultivos de soja. Por ello, la secuenciación del genoma y su posterior análisis funcional de *B. japonicum* E109 nos permitió: (1) Incrementar el conocimiento básico sobre la interacción leguminosa-*Bradyrhizobium*; (2) Conocer los mecanismos PGPR que operan en la interacción, además de la FBN.

II.1.1 Secuenciación Masiva

La secuenciación del ADN (ácido desoxirribonucleico) 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). Tal método dependía de la utilización de la ADN polimerasa para transcribir regiones específicas del ADN bajo condiciones controladas. 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. Esta metodología se basa en la química de la secuenciación, usando un terminador de la cadena de ADN de didesoxinucleótidos (ddNTP), molécula que carece de un grupo hidroxilo en el carbono 3' del azúcar desoxirribosa (Sanger et al., 1977). Durante la síntesis de ADN, un desoxirribonucleótido trifosfato entrante (dNTP) puede formar un enlace fosfodiéster entre su grupo 5' α -fosfato y el grupo 3' hidroxilo del último nucleótido. Sin embargo, si un didesoxinucleótido es incorporado en el extremo de la cadena en crecimiento, el crecimiento de la cadena de ADN termina. Los cuatro didesoxinucleótidos utilizados en la secuenciación de Sanger se marcan con cuatro colorantes fluorescentes y cada colorante representa un nucleótido particular (Smith et al., 1986). Los ddNTPs marcados con colorante se añaden a la mezcla de reacción que contiene molde de la cadena simple de ADN, cebadores, ADN polimerasa y los cuatro dNTP. Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se separan mediante electroforesis capilar de acuerdo con sus masas. Cada tinte fluorescente emite luz tras su activación por un láser en el extremo del capilar. Por lo tanto, la secuencia de ADN puede ser determinada por el orden de las señales (Swerdlow et al., 1990).

Después de décadas de mejoras, las secuencias de hasta ~ 1 Kb de ADN se pueden obtener con una precisión tan alta como 99.999% (Shendure y Ji, 2008). 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.

II.1.2 Tecnologías de Secuenciación de ADN: Segunda generación

II.1.2.1 Sistema Roche 454. Pirosecuenciación

Roche 454 fue el primer sistema de próxima 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 moverse 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 gracias a 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.1.2.2 Plataforma Solexa/Illumina

Es actualmente la plataforma de secuenciación de ADN más ampliamente utilizada. Illumina genera secuencias de lectura más cortas, por lo general 36 nucleótidos de longitud y fue pensado originalmente para re-secuenciación de genomas (Farrer et al., 2009). La química de secuenciación detrás de esta técnica se basa en la técnica de secuenciación de ADN de Sanger (Bentley et al., 2008). La técnica de secuenciación de Solexa consta de dos partes, en primer lugar se realiza un fraccionamiento del genoma, seguido de la amplificación clonal de fragmentos de ADN. De esta forma se crean racimos de fragmentos clonados. El siguiente paso consiste en la secuenciación mediante síntesis. Lo característico de este sistema es el empleo de los cuatro nucleótidos (A, C, T, G) marcados con fluorescencia de distintos colores para la secuenciación de los millones de racimos presentes en la superficie de la celda de flujo. Estos nucleótidos modificados contienen terminaciones reversibles, lo que permite que cada ciclo del proceso de secuenciación ocurra en presencia de los cuatro nucleótidos simultáneamente. La longitud de las lecturas (entre 35-150 nt) es muy inferior a la de las lecturas obtenidas mediante la tecnología 454 (Lee y Tang, 2012) lo cual complica el ensamblaje de genomas completos. La disociación de la reacción enzimática y la captura de imágenes permite un rendimiento óptimo y la capacidad de secuenciación teóricamente ilimitado (Mardis, 2008; Kircher y Kelso, 2010).

II.1.2.3 Plataforma SOLiD/Applied Biosystems

La plataforma sólida utiliza una biblioteca de fragmento ligado al adaptador similares a los de las otras plataformas de próxima generación, y utiliza un enfoque de PCR en emulsión con pequeñas perlas magnéticas para amplificar los fragmentos para la secuenciación (Dressman et al., 2003). A diferencia de las otras plataformas, SOLiD utiliza ADN ligasa en lugar de una polimerasa y un enfoque único para secuenciar los fragmentos amplificados. Antes de la secuenciación, el ADN se amplifica por PCR en emulsión. Las perlas resultantes, cada uno que contiene una sola copia de la

misma molécula de ADN, se depositan sobre un portaobjetos de vidrio (Valouev et al., 2008). La estrategia seguida por esta plataforma conlleva la unión de unas sondas de 8 bases (octámeros) marcadas con fluorocromos que contienen las dos primeras bases específicas y el resto de bases degeneradas. Las bases específicas de estos octámeros consisten en una de las 16 posibles combinaciones y su identidad se relaciona con un fluorocromo distinto. En cada ciclo de secuenciación se produce la ligación de un octámero, se graba el color de la fluorescencia que emite y se corta químicamente entre las posiciones 5 y 6 (eliminando así el fluorocromo para el siguiente ciclo y generando el grupo 5'-PO₄ para la unión del siguiente octámero). Las secuencias se pueden determinar en paralelo durante más de 50 millones de grupos de perlas, lo que resulta en un muy alto rendimiento de la orden de gigabases por corrida (Ansorge, 2009; Lee y Tang, 2012).

II.1.2.3 Plataforma de Secuenciadores PGM compactos

La máquina de genoma personal Ion Personal o PGM (del inglés Personal Genome Machine) y MiSeq fueron lanzados por Ion Torrent e Illumina. Ambos son de pequeño tamaño y cuentan con tasas de rotación rápidas, pero un rendimiento de datos limitado debido a que están dirigidos a aplicaciones clínicas y laboratorios pequeños.

II.1.2.3.1 Ion PGM de Ion Torrent

PGM utiliza tecnología de secuencia de semiconductores. Cuando la polimerasa incorpora un nucleótido en la molécula de ADN, se libera un protón. Al detectar el cambio en el pH, PGM reconoce si se agrega o no el nucleótido. Cuando se adhiere el nucleótido correcto, no hay cambio de voltaje mientras que si hay 2 nucleótidos añadidos, se detecta doble voltaje (Flusberg et al., 2010). PGM es la primera máquina de secuenciación comercial que no necesita fluorescencia, siendo un equipamiento veloz (permite lecturas de 200 pb en 2 horas y el tiempo de preparación de la muestra es de menos de 6 horas para 8 muestras en paralelo), barato y tiene un tamaño pequeño para tener en laboratorios cotidianos (Liu et al., 2012).

II.1.2.3.2 MiSeq de Illumina

MiSeq utiliza tecnología SBS (secuenciación por síntesis) fue lanzado por Illumina. Integra las funciones de generación de clúster, SBS y análisis de datos en un solo instrumento en solo 8 horas. La secuencia basada en el terminador reversible de Illumina por síntesis química se utilizó en esta ingeniería innovadora. MiSeq sobresale porque permite obtener datos de más alta integridad y un rango más amplio de aplicaciones, que incluyen la secuenciación de amplicones, la verificación de

clonación, ChIP-Seq y la secuenciación de genomas pequeños. Realiza desde lecturas de 36 pb hasta 2×150 pb (Liu et al., 2012).

II.1.3 Ensamblaje de los genomas derivado de la Secuenciación NSG

Las lecturas de secuenciación generados por las diferentes tecnologías de secuenciación (NSG) oscilan desde 35 hasta 1000 pb. Para obtener el genoma completo, es necesario que los fragmentos estén alineados y unidos entre sí. Esto se logra utilizando un software específico denominado ensamblador.

Los ensambladores pueden unir secuencias juntas (en las regiones solapadas entre las secuencias), basado en el supuesto de que las secuencias de dos lecturas tienen origen en el mismo lugar en el genoma. Después del ensamblaje, se obtiene, por lo general, una colección de "contigs" en lugar de un cromosoma entero. Un "contig" se define como la longitud contigua de las secuencias genómicas en la que el orden de las bases es conocido por un alto nivel de confianza. Un "scaffold" es una serie de contigs cuyo orden y la orientación se reconstruyen. El aumento de la cobertura de la secuenciación del genoma ayudará a reducir el número de contigs. La limitación de este proceso reside en los métodos de secuenciación, los que producen lecturas relativamente cortas comparadas con el tamaño total del genoma. Este problema ha forzado a que la mayoría de ensambladores desarrollados utilicen varias aproximaciones heurísticas. Dependiendo de la estrategia en la que se basen, se clasifican en una de las tres categorías principales: aproximación "greedy", aproximación OLC (overlap-layout-consensus) y aproximación "del gráfico de Brujin" (Miller et al., 2010; Lee y Tang, 2012).

La elección del enfoque a tomar depende de la característica del origen de los datos ensamblados. Por ejemplo, para el enfoque del gráfico de Brujin basado en que el ensamblaje ha tenido éxito en lecturas cortas de alta precisión (<100 pb, como los generados por la tecnología Illumina), mientras que para el enfoque OLC o gráfico de cadena son usados comúnmente para lecturas más largas, datos imprecisos (>200 pb, como los datos de secuencia de Roche 454 y la secuenciación de Sanger) (Nagarajan y Pop, 2013). Sin embargo, esto no es una disposición exclusiva: los ensambladores del gráfico de Brujin han utilizado con éxito con más largo lecturas mediante el uso de una etapa de pre-procesamiento para corregir errores de secuenciación (Pevzner et al., 2001; Ronen et al., 2012) y ensambladores basados en solapamiento eficientes para lecturas cortas también se han desarrollado (Simpson y Durbin, 2012).

El ensamblaje de los genomas se puede realizar mediante programas que usan un genoma de referencia ("mapping" o ensamblaje por referencia), como es el caso de Bowtie, SOAP o Mosaik, o mediante ensambladores que prescinden de éste (ensamblaje de *novo*), entre los que encontramos

Celera, Mira, Velvet o Newbler. El ensamblaje de *novo* se ve facilitado por las lecturas largas obtenidas con la tecnología 454 comparadas con aquellas obtenidas a partir de las tecnologías Illumina y SOLiD. Por este motivo, junto a la baja tasa de error de identificación de bases, hacen que la tecnología 454 sea la más usada en la secuenciación de genomas completos (Kircher y Kelso, 2010).

El inconveniente de un ensamblaje de *novo* con lecturas cortas es la presencia de numerosos contigs a los que se les debe asignar una posición y orientación para los scaffolds. Este proceso se ha visto facilitado por el desarrollo de un método basado en la construcción de genotecas denominadas "paired end" (Ng et al., 2006; Jarvie and Harkins, 2008). Esta genoteca permite determinar contigs que deben ser contiguos pero estar separados por una región de secuencia repetida. Otro problema de los ensamblajes de *novo*, causado por las regiones repetidas en los genomas, se podría solventar con el aumento de la longitud de las lecturas obtenidas con la tecnología 454 (Jiang et al., 2012). Aun así, las técnicas de tercera generación de secuenciación tienen el potencial para acabar con las limitaciones que encontramos en las técnicas de SGS respecto a la calidad de los ensamblajes, dado que tanto la precisión del método como la longitud de las lecturas son mayores, eliminando la necesidad de usar genotecas "paired end" para construir el andamiaje (Schadt et al., 2010).

Así, para obtener la secuencia completa del genoma es necesario llevar a cabo un proceso denominado de cierre o "finishing", con el que se rellenan todos los huecos entre contigs generados por el ensamblador. Los métodos experimentales más utilizados para realizar esta tarea se fundamentaban en reacciones de PCR; sin embargo, en la actualidad se han desarrollado aproximaciones computacionales que se basan en el uso de las lecturas pareadas para llevar a cabo un ensamblaje local en zonas conflictivas del genoma (Lee y Tang, 2012).

II.1.4 Anotación del genoma

La anotación de un genoma se podría definir aún más ampliamente para abarcar cualquier información electrónica acerca de varios tipos de datos genómicos, incluyendo datos enteros de la secuencia del genoma y la secuencia metagenómica (Angiuoli et al., 2008). Este proceso de anotación involucra la predicción de genes codificadores de proteínas (ORFs), así como otras unidades funcionales del genoma, tales como ARNs estructurales, ARNt, ARN pequeños, pseudogenes, regiones de control, repeticiones directas e invertidas, secuencias de inserción, transposones y otros elementos móviles.

El NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica) proporciona un servicio de anotación de genomas procariotas (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/) en GenBank. Ciertos indicadores se pueden utilizar para evaluar la calidad de la anotación de los

genomas procariotas. El NCBI ha establecido una relación con otras bases de datos con el fin de desarrollar normas para la anotación del genoma procariota. Esta colaboración ha dado lugar a un conjunto de normas de anotación aprobado y aceptado por las principales anotaciones de pipeline (Klimke et al., 2011).

II.1.4 Procedimientos operativos estándar de anotación (SOPs)

Los documentos procedimientos operativos estándar o SOPs (del inglés, Standar Operating Procedures) describen los pasos de un proceso y son ampliamente adoptados en muchas disciplinas en las que es importante que un proceso sea repetible o auditable. Los SOPs de la anotación de un genoma deben cumplir una serie de tareas. Se deben documentar los procesos específicos utilizados para generar anotaciones sobre una secuencia genómica. Cada SOPs debe enumerar las entradas y salidas del proceso de anotación, referencia a cualquier herramienta o softwares externos que se utilizaron y describir los pasos principales del proceso en detalle. Una anotación SOPs a menudo incluye una combinación de cálculo (automatizadas) o curatoriales (manual) de una serie de pasos de generación de datos o procedimiento de análisis de datos. El procedimiento de anotación deberá describirse con el suficiente detalle de manera que un experto del dominio (bioinformática) podría replicar la anotación utilizando las herramientas mencionadas. Los SOPs deben incluir una descripción de cómo las salidas de los paquetes de software son interpretados, filtrados o combinado con otras salidas (Angiuoli et al., 2008).

II.1.5 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 (Overbeek et al., 2005).

RAST está diseñada para realizar consistentemente anotaciones comparables en calidad a los producidas por los mejores anotadores humanos y extender esas anotaciones a tantos genes que

codifican proteínas en el mayor número posible de genomas. 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 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.1.6 KEGG (Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas)

Kyoto Enciclopedia de Genes y Genomas, 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 auto-suficiencia se convierte en una representación por ordenador de la célula y el organismo, y tal vez la biósfera, así que permite el análisis *in silico* 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).

II.1.6.1 Vías metabólicas por KEGG

Las vías metabólicas KEGG son diagramas que representan el conocimiento de la interacción molecular y redes de reacción para el metabolismo, procesamiento de la información genética y de la información ambiental, los procesos celulares, entre otros. Cada mapa se dibuja manualmente con un software propio llamado KegSketch, resumiendo la evidencia experimental en la literatura publicada. Las cajas de mapas metabólicos normales y líneas de los mapas metabólicos globales, tanto para grupos ortólogos KEGG (KO), también están vinculados a enzimas identificadas por números EC y las reacciones identificadas por números R (Kanehisa et al., 2012).

II.2 METODOLOGÍA

II.2.1 Material Biológico

B. japonicum E109 fue provista por el Banco de cepas del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA-INTA) Castelar.

II.2.2 Obtención del material genético

Para la extracción del ADN genómico se utilizaron Kits comerciales NucleoSpin® de la firma Macherey-Nagel, con un rendimiento típico de 25-30 µg cada 100 µl de buffer. El procedimiento se ajustó sobre cultivos bacterianos en fase exponencial y se tomaron alícuotas de 500 µl a una DO₅₉₅ aproximadamente de 1.0 equivalente a un título de 1.0x10⁹ ufc.ml⁻¹. Para la utilización del ADN con fines analíticos, las muestras fueron analizadas a nivel de su concentración por el uso de un fluorómetro Nanodrop® y a nivel de su grado de pureza a través de una electroforesis en geles de agarosa y la relación DO_{260/280}.

II.2.3 Secuenciación del genoma de la cepa de *B. japonicum* E109

La secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109 fue realizado sobre la base de un consorcio internacional conformado y liderado por el Laboratorio de Fisiología vegetal y de la interacción planta-microorganismo de la Universidad Nacional de Río Cuarto y constituido por la Plataforma Genómica y Bioinformática del Instituto de Agrobiotecnología Rosario (INDEAR); el Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, (IMYZA-INTA) Castelar; el Instituto Leloir de Buenos Aires; la Universidad de Granada; la Universidad Católica de Leuven de Bélgica, la Universidad de Lyon de Francia y el TAGC Institute en Norwich en Reino Unido.

Para la secuenciación, se realizaron dos procedimientos complementarios, el método del "whole genome shotgun" (WGS) y el método de "paired ends" de 8 Kb. Para ambos procedimientos, se utilizó la tecnología Roche 454 GS FLX con un pirosecuenciador Titanium. El conector utilizado para la creación de la genoteca fue el linker Titanium. Además, fue realizado el ensamblado de *novo* mediante el ensamblador Newbler v2.9 con el parámetro URT (Roche). Se estimó una profundidad de secuenciación de 16X y un tamaño esperado de 7,9 Mb. Las determinaciones cuantitativas de la secuenciación, denominadas métricas, de las dos secuenciaciones de *B. japonicum* E109 se obtuvieron mediante el software PRINSEQ (Schmieder y Edwards, 2011) (<http://prinseq.sourceforge.net/>). Además, para la construcción del mapa genómico se utilizó la herramienta CGView Comparison Tool (Grant et al., 2012) (<http://stothard.afns.ualberta.ca/downloads/CCT/>). Para la visualización del ensamblaje se utilizó el programa Geneouis R7 (Kearse et al., 2012). La anotación del genoma se llevó a cabo utilizando los

SOPs del Servicio integrado para el análisis genómico o ISGA (Hemmerich et al., 2010) y del servidor de anotación RAST (Aziz et al., 2008) y KEEG (Kanehisa et al., 2012).

II.2.4 Contenido plasmídico y electroforesis en gel de campo pulsátil (PFGE)

Este procedimiento fue realizado en colaboración con el grupo de Ecología Microbiana de la Universidad de Lyon, Francia. Para ello, los perfiles de los plásmidos presentes en E109 fueron determinados mediante la técnica de electroforesis en gel de agarosa modificado por Eckhardt, como se describió previamente por Mavingui et al. (2002). Brevemente, la cepa E109 fue cultivada a 30°C en medio EMA (Vincent, 1970) hasta la fase semilogarítmica, y se recolectó por centrifugación a 5000 X g. El pellet fue lavado dos veces en buffer Tris EDTA o TE (10 mM Base Tris a pH 7,5, 0,1 mM EDTA) y finalmente se resuspendió en TE para lograr una concentración de 5×10^9 ufc.ml⁻¹. Un volumen idéntico de 1.6% de agarosa de bajo punto de fusión (Euromedex, Mundolsheim, Francia) preparada en agua fue agregada a la suspensión celular. La mezcla fue vertida en moldes (100 µl pozo⁻¹; Bio-Rad Laboratories) y enfriada a 4°C durante 30 min. Los tapones de agarosa conteniendo a los microorganismos fueron tratados con 1.2 mg.ml⁻¹ de lisozima (Roche, Meylan, Francia) durante 24 horas a 37°C, se enjuagaron brevemente con TE, y luego se trataron durante 48 h a 37°C con 2 mg.ml⁻¹ de proteínasa K (Euromedex) disuelta en 0.5 M de EDTA que contiene 1% sarkosyl (Sigma, St Quentin Fallavier, Francia). Los tapones se lavaron a continuación en un buffer TE y se almacenaron a 4°C en 0.5M EDTA hasta su uso. La técnica de PFGE fue llevada a cabo en un sistema Chef-DRIII (Bio-Rad Laboratories) a 14°C en un gel de agarosa al 0.8% (Agarosa certificada para campo pulsátil; Bio-Rad Laboratories) en 0.5X de buffer TBE (Tris-borato-EDTA) (Euromedex). Las condiciones de migración para la separación de los plásmidos fueron 5 V cm⁻¹ durante 15 h con un tiempo de interrupción de 20 a 40 s y un ángulo de campo de 120°, seguido por 3.5 V cm⁻¹ durante 30 h con un tiempo de interrupción de 120 a 240 s y un ángulo de campo de 120°C. Para la separación de los mayores replicones, las condiciones fueron 4.5 V cm⁻¹ durante 60 h con un tiempo de interrupción de 70 a 160 s y un ángulo de campo de 120°C. Los tamaños de los plásmidos fueron estimados mediante el uso de marcadores de peso molecular y en comparación con aquellos presentes en algunas cepas bacterianas empleadas como control.

II.2.5 Análisis funcional *in silico* de los mecanismos de promoción de crecimiento en *B. japonicum* E109 mediante RAST y KEGG

Luego de la secuenciación, se llevó a cabo la anotación del genoma a través de RAST (Aziz et al., 2008) (<http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>). El análisis *in silico* de los sistemas biológicos se realizó a

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

través de KEEG (Kanehisa et al., 2004; Kanehisa et al., 2012) <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>). Abordamos además, el análisis del metabolismo de auxinas relacionado con la hipótesis alternativa de esta tesis.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Secuenciación, ensamblaje y cierre del genoma de *B. japonicum* E109

La secuencia completa del genoma de *B. japonicum* E109 fue desarrollada por el método de WGS y la estrategia 8-kb paired-end con el pirosecuenciador Roche 454 GS FLX Titanium en INDEAR, resultando en una cobertura del genoma de 24X. Los reads de secuenciación se ensamblaron de *novo* (Newbler versión 2.9), lo que dio como resultado 142 contigs ordenados en 4 scaffolds (> 737 kp cada uno; N₅₀, 4.081.299 pb) correspondientes a un único replicón (revelado mediante análisis Echhardt, que se detalla a continuación). Los cierres de los huecos intra e inter scaffolds se lograron mediante una observación detallada de las lecturas de secuencia relevantes utilizando la plataforma de software Geneious R7 (Kearse et al., 2012) con los parámetros definidos por defecto. El cierre del genoma, se llevó a cabo en colaboración con el Laboratorio de Ecología Genética de la Rizósfera-CSIC y el Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, España bajo la dirección del Dr. Francisco Martínez-Abarca Pastor.

En la **Tabla 3**, se detalla la información obtenida a partir de la secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109.

Tabla 3. Datos obtenidos a partir de la secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109

| <i>Bradyrhizobium japonicum</i> cepa E109 | |
|---|---------------------|
| Nivel de ensamblaje | Completo |
| Tecnología de secuenciación | 454 GS FLX Titanium |
| Cobertura del genoma | 24X |
| Método de ensamblaje | Newbler v. 2.9 |
| Longitud de secuencia total | 9,224,208 |
| Número total de cromosomas y plásmidos | 1 |
| Contenido G+C | 63.6% |

Los datos de la secuenciación se encuentran detallados en el **Anexo 1**. Las métricas obtenidas con el software PRINSEQ, para ambas secuenciaciones se encuentran en el **Anexo 2 y 3**.

II.3.2 Electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) de *B. japonicum* E109

La PFGE es una técnica utilizada para la separación de moléculas grandes de ADN mediante la aplicación a una matriz de gel de un campo eléctrico que cambia periódicamente de dirección. El objetivo de esta técnica fue evaluar si E109 poseía plásmidos en su genoma. En el caso de nuestro análisis, los resultados de tal metodología se resumen en la **Figura 1**.

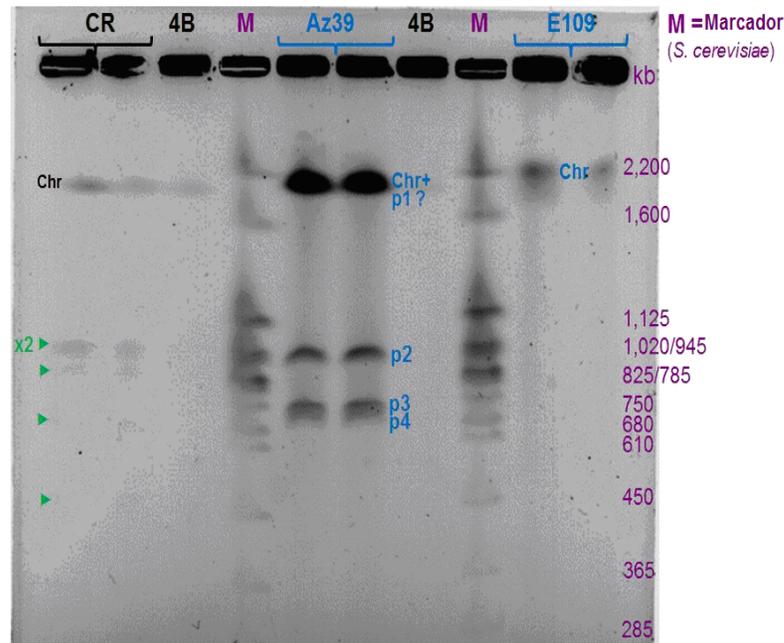


Figura 1. Fotografía del gel obtenida de PFGE, donde se puede observar un banda débil en la corrida de E109 correspondiente al cromosoma de la bacteria. En la misma gráfica se presentan los resultados de las determinaciones realizadas para *Azospirillum brasilense*.

El análisis PFGE de *B. japonicum* E109, mostró que no hay banda visible en el gel Eckhardt (gel de plásmidos) y hay una banda débil en PFGE, indicando solo la presencia de un replicón; sin embargo, aunque el cromosoma migra a cerca de 2.2 Mb, no se puede estimar su tamaño por PFGE ya que esta metodología es poco precisa para elementos de gran tamaño. En base a los resultados de ambas secuenciaciones y del PFGE se realizó el análisis de la estructura general del genoma de *B. japonicum* E109 comparándolos con otras cepas del mismo género y especie.

II.3.3 Análisis genómico de *B. japonicum* E109

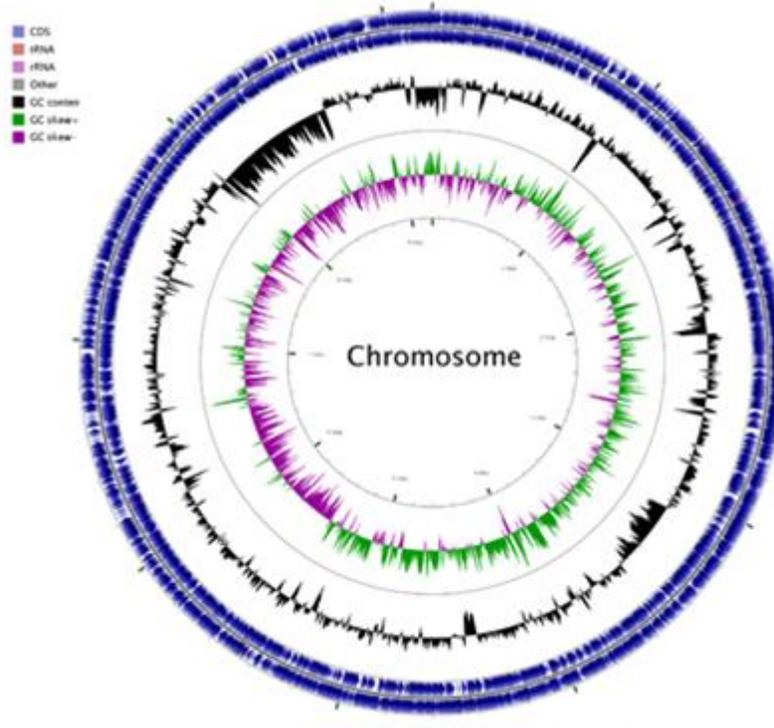
Para el análisis genómico de E109 utilizamos las herramientas RAST y las comparamos con las siguientes bacterias; *B. japonicum* USDA6, *B. diazoefficiens* USDA110, *Bradyrhizobium* sp. S23321, ORS 278 y BTAi1. En la **Tabla 4**, se detallan las características generales.

Tabla 4. Características generales del genoma de *B. japonicum* E109 en comparación otras cepas de la misma especie y género.

| Generalidades | <i>B. japonicum</i> | | <i>B. diazoefficiens</i> | <i>Bradyrhizobium sp.</i> | | |
|--|---------------------|-----------|--------------------------|---------------------------|-----------|-----------|
| | E109 | USDA 6 | USDA110 | S23321 | ORS 278 | BTAi1 |
| Tamaño | 9,224,208 | 9,207,384 | 9,105,828 | 7,231,841 | 7,456,587 | 8,493,513 |
| Contenido G-C | 63,6 | 63,67 | 64,01 | 64,3 | 65,5 | 64,8 |
| Número de RNA | 58 | 58 | 52 | 49 | 56 | 58 |
| Número de secuencias codificantes | | | | | | |
| En subsistemas | 8719 | 8846 | 8317 | 6977 | 6838 | 7622 |
| no hipotéticos | 3302 | 3060 | 2696 | 2735 | 2171 | 2840 |
| hipotéticos | 3126 | 2899 | 2519 | 2599 | 2072 | 2668 |
| No en subsistemas | 176 | 161 | 177 | 136 | 99 | 172 |
| no hipotéticos | 5417 | 5786 | 5899 | 4242 | 4667 | 4782 |
| hipotéticos | 2262 | 2087 | 1743 | 1539 | 2169 | 2364 |
| Número de Subsistemas | 3155 | 3699 | 4156 | 2703 | 2498 | 2418 |
| | 510 | 496 | 496 | 470 | 427 | 465 |

En esta tabla se resumen las características más representativas de cada uno de los genomas comparados, según RAST de acuerdo a los diferentes subsistemas, de los que se pueden extraer el conjunto de familias de proteínas disponibles.

A continuación se mostrara la representación gráfica del cromosoma de *B. japonicum* E109 y luego la comparación de nuestra cepa de estudio con otras bacterias utilizando el programa CGView Comparison Tool (Grant et al., 2012).



***Bradyrhizobium japonicum* E109**

Figura 2. Representación circular del cromosoma de *B. japonicum* E109. Los dos círculos externos muestran las secuencias codificantes, representadas como flechas azules, presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido de la molécula. Los círculos interiores indican el contenido GC relativo (en negro) y la desviación GC (verde/morado). Esta imagen fue generada por CGView Comparison Tool (Grant et al., 2012).

Además de la representación gráfica, utilizamos otra herramienta del programa CGView Comparison Tool (Grant et al., 2012) que permite comparar genomas. En las siguientes figuras se muestran las comparaciones con: *B. japonicum* USDA38, USDA6 y SEMIA 5079; *B. elkanii* 587, USDA76 y USDA3254; *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 y ORS278.

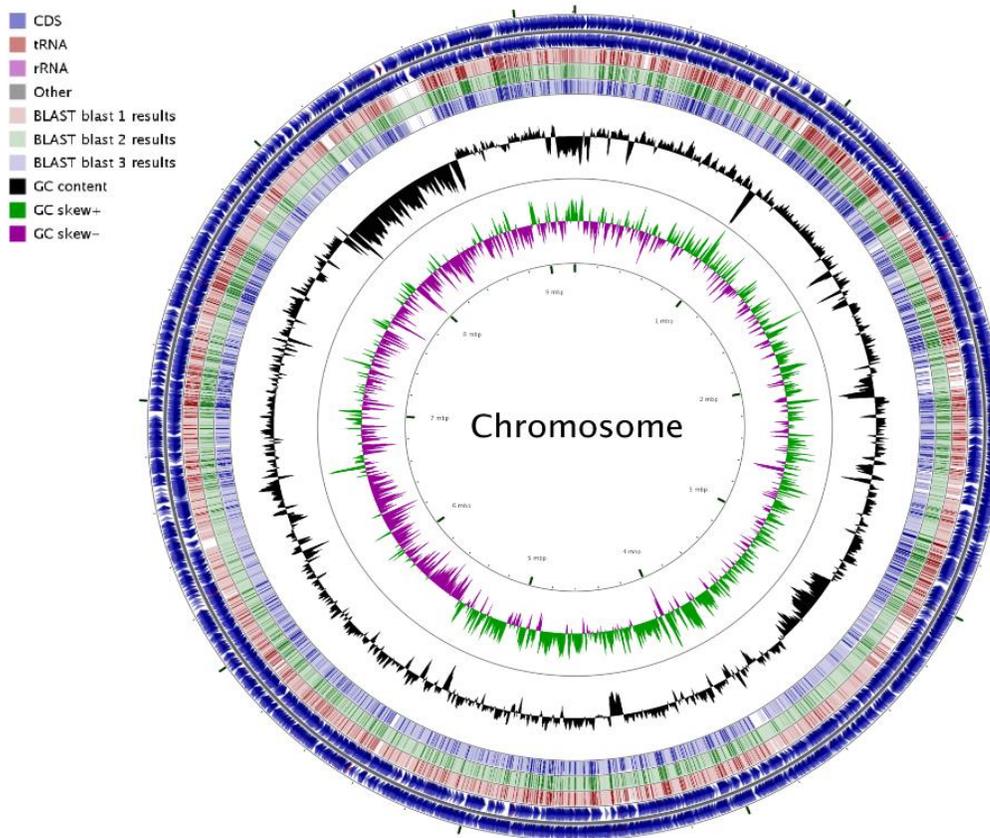


Figura 3. Representación circular de la comparación de los cromosomas de *B. japonicum* E109 comparada con el equivalente en *B. japonicum* USDA38 (BLAST 1, rojo), USDA6 (BLAST 2, verde) y SEMIA 5079 (BLAST 3, azul). Los dos círculos más externos muestran los genes presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido.

De la representación gráfica, de la **Figura 3**, obtenida por la comparación de E109 con otras cepas de la misma especie, podemos observar que *B. japonicum* USDA6 es la más similar a E109 debido a que comparten secuencias codificantes de ambos genomas.

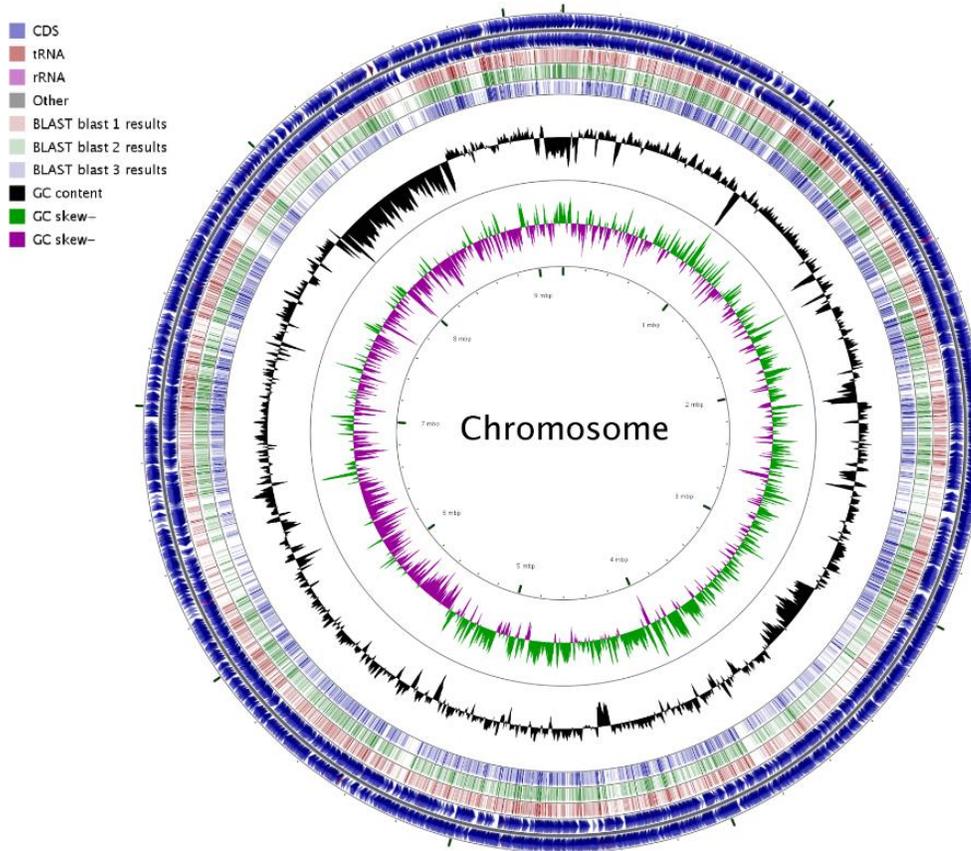


Figura 4. Características generales de la secuencia del cromosoma de *B. japonicum* E109 comparada con *B. elkanii* 587 (BLAST 1, rojo), USDA76 (BLAST 2, verde) y USDA3254 (BLAST 3, azul). Los dos círculos más externos muestran las secuencias codificantes (flechas azules) presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido.

En la **Figura 4** observamos la representación comparativa de E109 con cepas de otras especie, observando que la similitud compartida de las secuencias codificantes es menor respecto a aquellas cepas de la misma especie.

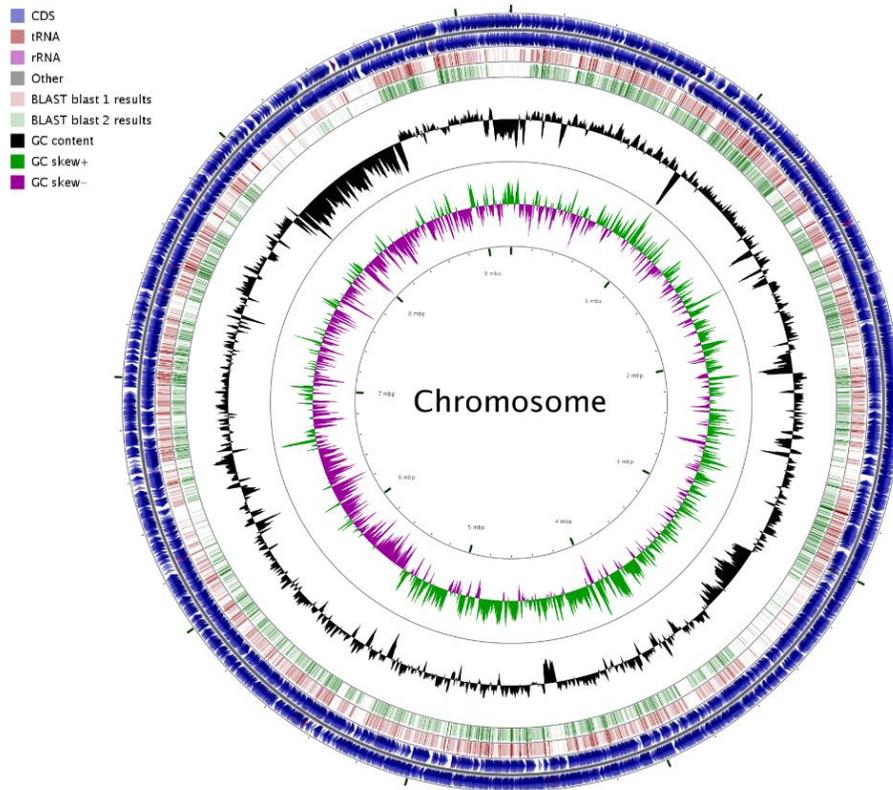


Figura 5. Características generales de la secuencia del cromosoma de *B. japonicum* E109 comparada con *Bradyrhizobium* sp. BTAi1 (BLAST 1, rojo) y ORS278 (BLAST 2, verde). Los dos círculos más externos muestran las secuencias codificantes (flechas azules) presentes en la cadena sentido (el externo) y antisentido.

En la **Figura 5**, donde está representado gráficamente la comparación de E109 con bacterias del mismo género, observamos que las dos cepas son las que menos similitud comparten con nuestra cepa de interés.

De las figuras observadas, podemos inferir que *B. japonicum* E109 tiene mayor similitud con la cepa USDA6 y que muchas de las secuencias codificantes identificadas en su genoma se comparten con las bacterias comparadas. Sin embargo, la semejanza es mayor con las cepas de la misma especie, y a medida que se alejan del árbol filogenético se van perdiendo similitud como consecuencia de la biología y diversidad de las especies.

II.3.4 Análisis funcional del genoma de *B. japonicum* en base a RAST y KEEG

La herramienta RAST (Aziz et al., 2008) realiza un análisis de los genes y clasificación de ellos en subsistemas, como así también un análisis comparativo y otras formas de pruebas. KEEG es

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

utilizado para la comprensión y utilidades de la célula o el organismo a partir de la información generada del genoma (Kanehisa et al., 2004; Kanehisa et al., 2012). Con el uso de estas herramientas, observamos la clasificación del genoma en subsistemas y en los mapas de las diferentes vías metabólicas para *B. japonicum* E109.

II.3.4.1 Clasificación en subsistemas según RAST

A continuación observaremos la clasificación en subsistemas del genoma de E109 como también de los genomas de bacterias de la misma especie y/o género.

B. japonicum E109

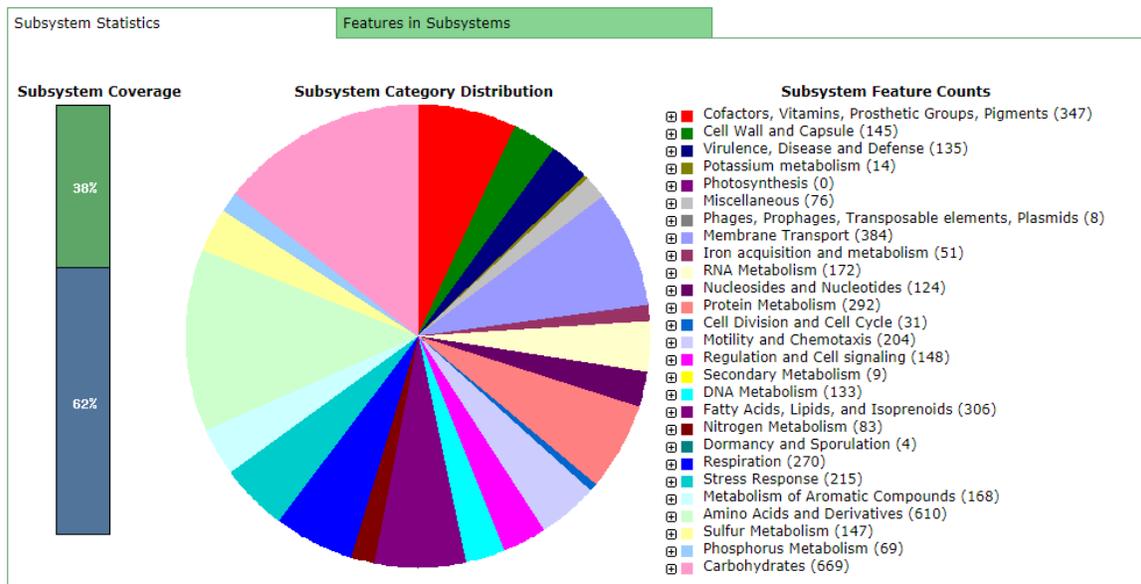


Figura 6. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de *B. japonicum* E109

En la **Figura 6** observamos la clasificación en los subsistemas de RAST, indicando el número de secuencias codificantes asociadas a cada una de las funciones.

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

***B. japonicum* USDA6**

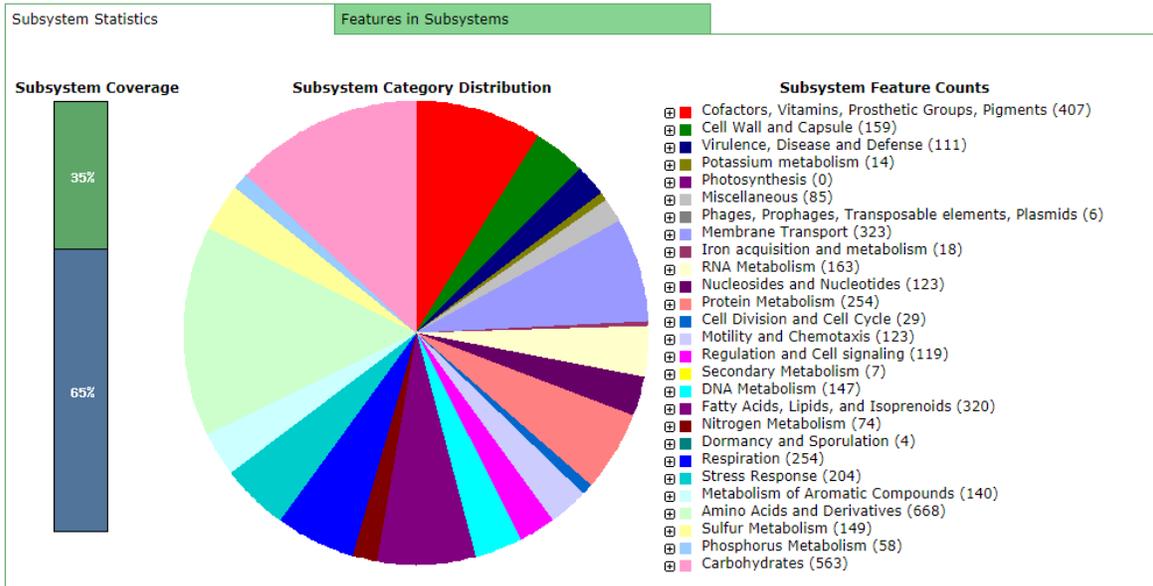


Figura 7. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de *B. japonicum* USDA6

***B. diazoefficiens* USDA110**

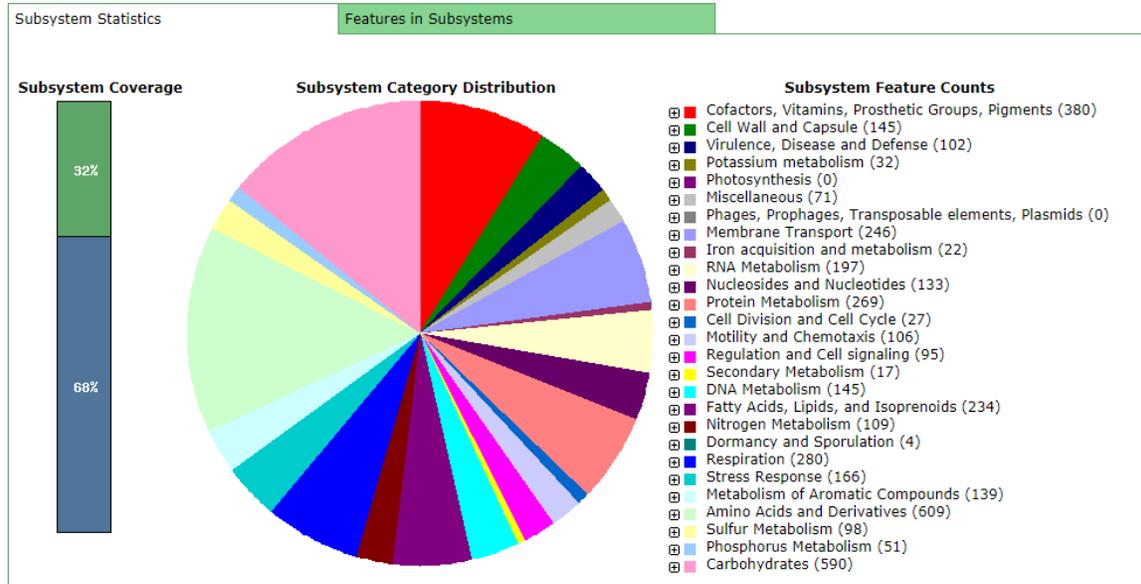


Figura 8. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de *B. diazoefficiens* USDA110

***B. elkanii* 587**

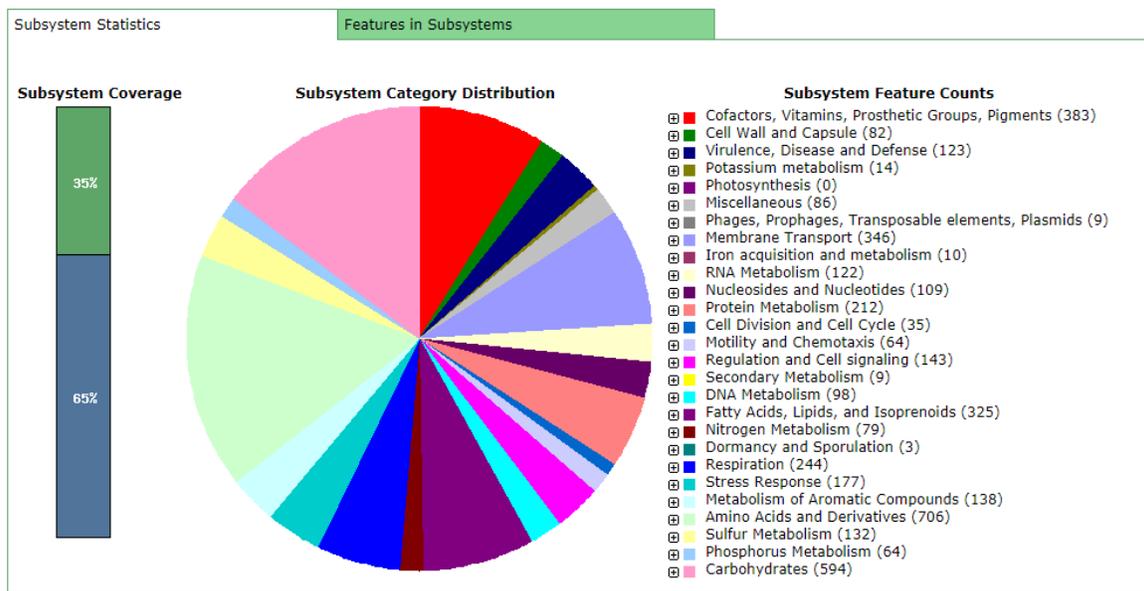


Figura 9. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de *B. elkanii* 587

***Bradyrhizobium* sp. ORS278**

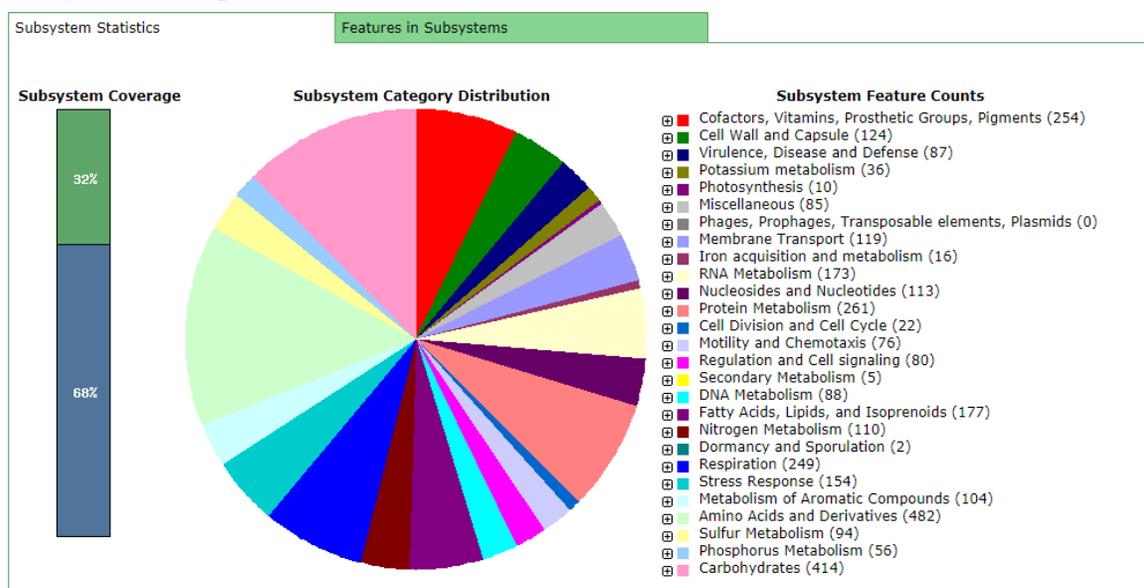


Figura 10. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de *Bradyrhizobium* sp. ORS278

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

***Bradyrhizobium* sp. BTAi1**

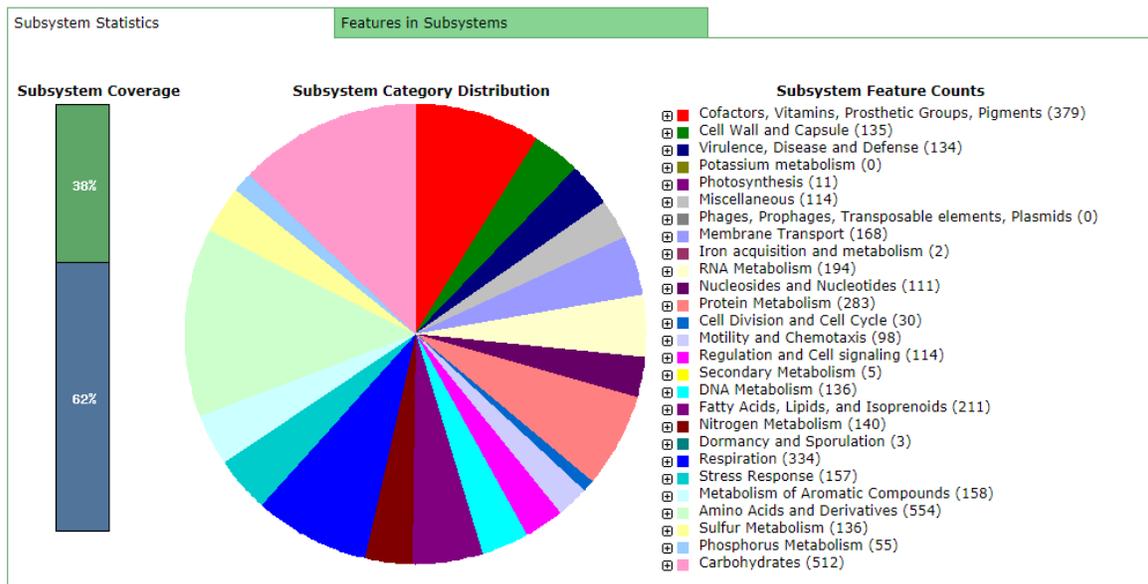


Figura 11. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de *Bradyrhizobium* sp. BTAi1

***Bradyrhizobium* sp. S23321**

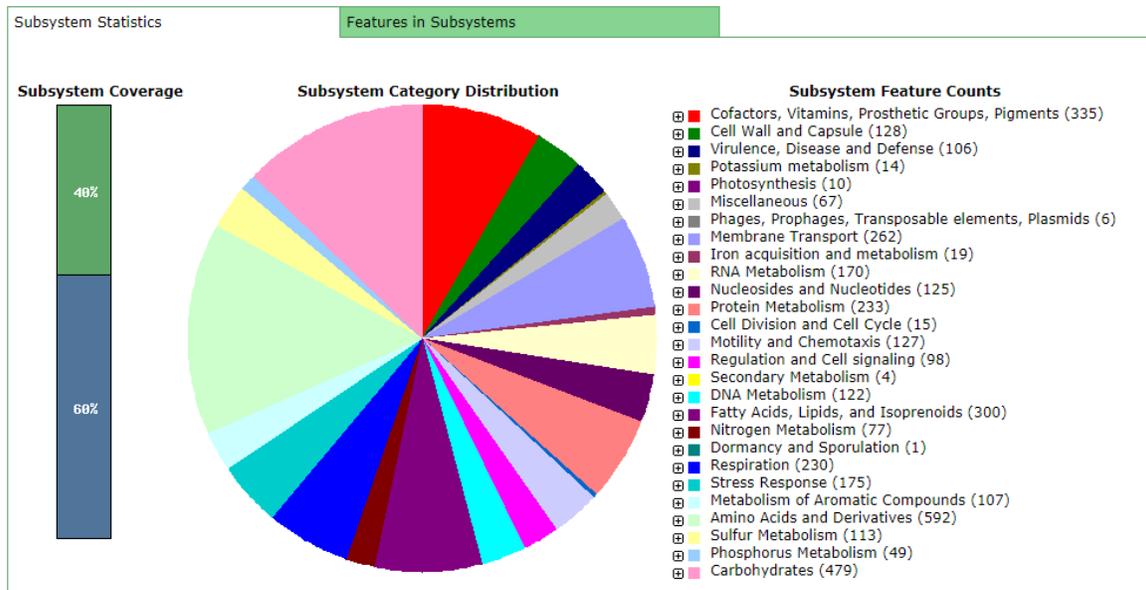


Figura 12. Clasificación en subsistemas según RAST del genoma de *Bradyrhizobium* sp. S23321

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

En la **Tabla 5** se observa la clasificación de los subsistemas por RAST de *B. japonicum* E109, USDA6, *B. diazoefficiens* USDA110, *B. elkanii* 587, *Bradyrhizobium* sp. ORS 278, BTAi1 y S23321.

Tabla 5. Clasificación de los Subsistemas de RAST de las cepas de *Bradyrhizobium*

| Clasificación de los Subsistemas | E109 | USDA6 | USDA110 | 587 | ORS278 | BTAi1 | S23321 |
|--|------|-------|---------|-----|--------|-------|--------|
| Cofactores, Vitaminas, Grupos prostéticos, Pigmentos | 347 | 407 | 380 | 383 | 254 | 379 | 335 |
| Pared celular y Capsula | 145 | 159 | 145 | 82 | 124 | 135 | 128 |
| Virulencia, Enfermedad y Defensa | 135 | 111 | 102 | 123 | 87 | 134 | 106 |
| Metabolismo de Potasio | 14 | 14 | 32 | 14 | 36 | 0 | 14 |
| Fotosíntesis | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 11 | 10 |
| Varios | 76 | 85 | 71 | 86 | 85 | 114 | 67 |
| Fagos, Profagos, Elementos transponibles, Plásmidos | 8 | 6 | 0 | 9 | 0 | 0 | 6 |
| Transporte de membrana | 384 | 323 | 246 | 346 | 119 | 168 | 262 |
| Adquisición de hierro y metabolismo | 51 | 18 | 22 | 10 | 16 | 2 | 19 |
| Metabolismo de ARN | 172 | 163 | 197 | 122 | 173 | 194 | 170 |
| Nucleósidos y Nucleótidos | 124 | 123 | 133 | 109 | 113 | 111 | 125 |
| Metabolismo de proteínas | 292 | 254 | 269 | 212 | 261 | 283 | 233 |
| División celular y Ciclo celular | 31 | 29 | 27 | 35 | 22 | 30 | 15 |
| Movilidad y Quimiotaxis | 204 | 123 | 106 | 64 | 76 | 98 | 127 |
| Regulación y Señalización celular | 148 | 119 | 95 | 143 | 80 | 114 | 98 |
| Metabolismo secundario | 9 | 7 | 17 | 9 | 5 | 5 | 4 |
| Metabolismo de ADN | 133 | 147 | 145 | 98 | 88 | 136 | 122 |
| Ácidos grasos, Lípidos e Isoprenoides | 306 | 320 | 234 | 325 | 177 | 211 | 300 |
| Metabolismo de Nitrógeno | 83 | 74 | 109 | 79 | 110 | 140 | 77 |
| Dormición y Esporulación | 4 | 4 | 4 | 3 | 2 | 3 | 1 |

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

| | | | | | | | |
|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Respiración | 270 | 254 | 280 | 244 | 249 | 334 | 230 |
| Respuesta a Estrés | 215 | 204 | 166 | 177 | 154 | 157 | 175 |
| Metabolismo de compuesto aromáticos | 168 | 140 | 139 | 138 | 104 | 158 | 107 |
| Aminoácidos y derivados | 610 | 668 | 609 | 706 | 482 | 554 | 592 |
| Metabolismo del sulfuro | 147 | 149 | 98 | 132 | 94 | 136 | 113 |
| Metabolismo del fosforo | 69 | 58 | 51 | 64 | 56 | 55 | 49 |
| Carbohidratos | 669 | 563 | 590 | 594 | 414 | 512 | 479 |

De la **Tabla 5**, podemos deducir que E109 comparte una mayor similitud en los conjuntos de proteínas con las cepas USDA6 y USDA110, tal como habíamos observado en el análisis genómico. A modo de ejemplo, podemos mencionar que en el metabolismo del nitrógeno las secuencias codificantes son diferentes para cada uno de los organismos ya que E109, USDA 6, USDA110, 587, ORS278, BTAi1 y S23321 tienen 83, 74, 109, 79, 110, 140 y 77 secuencias codificantes, respectivamente. Otro ejemplo de las secuencias codificantes clasificadas según RAST, es la respuesta a estrés que para el caso de *B. japonicum* E109 son 215, mientras que para USDA6, USDA110, 587, ORS278, BTAi1 y S23321 son 204, 166, 177, 154, 157 y 175 respectivamente. Para el subsistema de quimiotaxis y movilidad, las secuencias de E109 son también superiores en el número de secuencias codificantes que para el resto de los microorganismos comparados. Esto podría ser un indicativo de que E109 tendría mayor secuencias codificantes para enfrentar situaciones sub-óptimas de crecimiento. En conjunto, ambos factores, estarían relacionados con la supervivencia bacteriana en la rizósfera, lo que podría determinar parte de su éxito en la selección como microorganismo de interés para la agricultura.

Para profundizar el análisis funcional del genoma de E109, detallaremos algunas de las vías metabólicas más representativas del genoma utilizando KEGG (Kanehisa et al., 2004; Kanehisa et al., 2012), que nos permite visualizar el metabolismo en mapas.

II.3.4.2 Clasificación en vías metabólicas según KEGG

La base de datos KEGG PATHWAY es una colección de diagramas gráficos dibujados manualmente, llamados mapas de vías KEGG, que representan rutas moleculares para cada metabolismo. Cada ruta se identifica con un número de cinco dígitos precedido por uno de los siguientes: mapa, ko, ec, rn y código de organismo de tres o cuatro letras (para el caso de *B.*

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

japonicum E109 se identifica de la siguiente manera bjp00910: metabolismo del nitrógeno).

También se utiliza una notación, que es la siguiente:

- Indica producto de un gen
- Indica otro mapa
- Indica otra molécula, mayormente un compuesto químico

Los recuadros verdes están hipervinculados a GENES convirtiendo números K (identificadores KO) en identificadores de genes en la vía de referencia, lo que indica la presencia de genes en el genoma y también la integridad de la vía.

II.3.4.2.1 Metabolismo de Nitrógeno: reducción y fijación

La FBN es uno de los mecanismos de promoción de crecimiento vegetal más extensamente estudiados en las bacterias PGPR, y esto es debido a que hay numerosos reportes de las diferencias positivas en el crecimiento vegetal entre una leguminosa vegetal inoculada de una control. En la siguiente figura observaremos el metabolismo de nitrógeno.

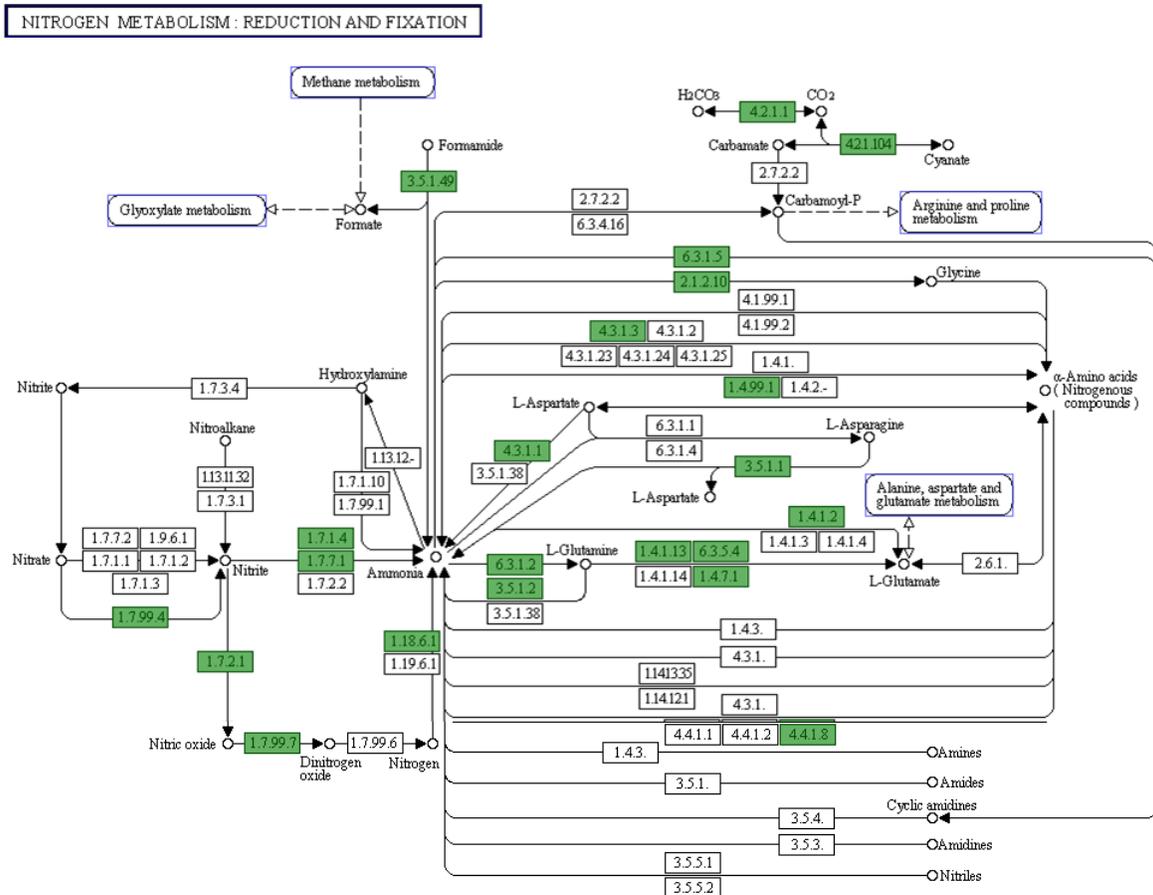


Figura 13. Vía metabólica relacionada al metabolismo del nitrógeno, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

Uno de los mecanismos directos de promoción de crecimiento vegetal que más ha sido estudiado es la FBN. *B. japonicum* E109 es capaz de llevar a cabo este proceso a través de las enzimas nitrogenasas cadena β (Mo-Fe) (EC: 1.18.6.1). La desnitrificación es incompleta, debido a que el nitrito es convertido a óxido nítrico por la enzima nitrito reductasa (conteniendo cobre) (EC: 1.7.2.1) y luego esto pasa a óxido dinitrógeno por la enzima óxido nítrico reductasa (EC: 1.7.99.7). La amonificación, es la conversión de nitrito de amonio, y es llevada a cabo por la enzima nitrito reductasa subunidad larga (EC: 1.7.1.4) y nitrito reductasa (ferredoxina) (EC: 1.7.7.1). Por último queda mencionar la asimilación de amonio, donde el amonio es convertido a L-glutamina por la glutamina sintetasa tipo 1 (EC: 6.3.1.2). Luego la glutamina pasa a glutamato por acción de la enzima glutamato sintetasa (EC: 1.4.1.13), asparagina sintetasa (hidrolizante de glutamina) (EC: 6.3.5.4) y la glutamato sintetasa dependiente de ferredoxina (EC: 1.4.7.1).

II.3.4.2.2 Quimiotaxis y Movilidad

La quimiotaxis es la capacidad que tienen ciertos microorganismos para percibir gradientes de concentración de sustancias y a su vez dirigir su movimiento a favor o en contra de ese gradiente. Esto les permite encontrar condiciones óptimas para su crecimiento y supervivencia. La movilidad bacteriana tiene como ventaja el desplazamiento orientado en respuesta a estímulos externos. En la **Tabla 6** están clasificados los subsistemas quimiotaxis y movilidad según RAST para E109 y las cepas utilizadas para comparar.

Tabla 6. Subsistemas de movilidad y quimiotaxis de diferentes *Bradyrhizobium* de acuerdo a la clasificación en subsistemas y funciones de RAST.

| Movilidad y Quimiotaxis | E109 | USDA6 | USDA110 | 587 | S23321 |
|--|-------------|--------------|----------------|------------|---------------|
| Movilidad y Quimiotaxis | 62 | 41 | 0 | 32 | 39 |
| Quimiotaxis bacterial | 62 | 41 | 0 | 32 | 39 |
| Movilidad flagelar en Procariota | 142 | 82 | 106 | 32 | 88 |
| Flagelo en <i>Campylobacter</i> | 10 | 11 | 10 | 5 | 12 |
| Flagelo | 78 | 71 | 67 | 27 | 76 |
| Movilidad social y swimming no flagelar en bacterias | 54 | 0 | 29 | 0 | 0 |
| Total de ORFs deducidos | 204 | 123 | 106 | 64 | 127 |

De esta comparación, podemos deducir que E109 es la cepa con mayor cantidad de secuencias codificantes. Las cepas USDA6 y S23321 poseen similar cantidad de secuencias codificantes para la quimiotaxis, mientras que la cepa USDA110 posee igual número de secuencias de movilidad flagelar.

Quimiotaxis bacterial

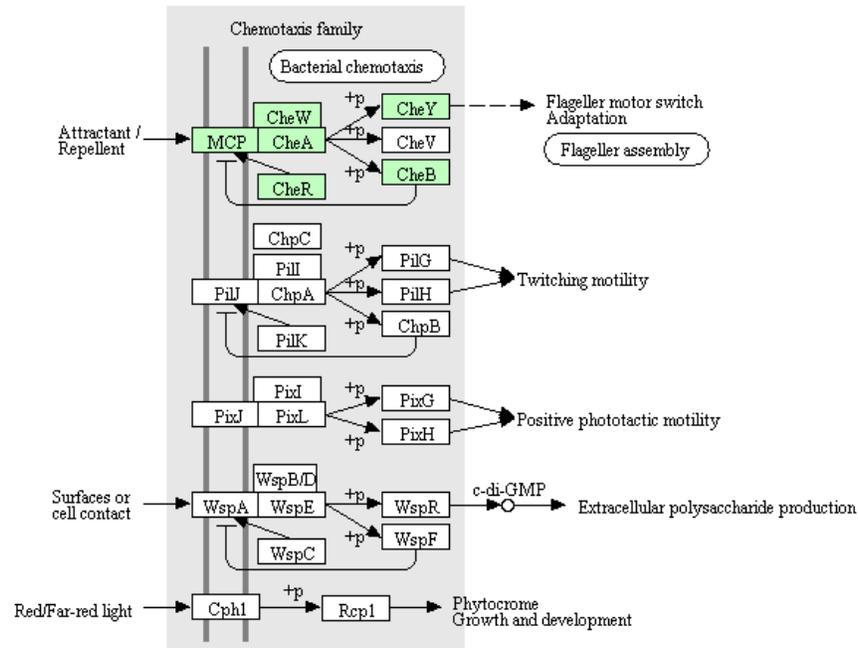


Figura 14. Vía metabólica relacionada al sistema de quimiotaxis bacteriana, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

En cuanto a la quimiotaxis bacteriana, en el genoma de E109 se han detectado varias secuencias que codifican para MPC, CheA, CheR, CheW, CheY y CheB. Las MCP o proteínas quimiotácticas que aceptan grupos metilo son capaces de detectar diferentes gradientes químicos e interactúan con proteínas del espacio periplasmático. Luego, la señal detectada es transmitida desde la membrana al citosol, activando de esta manera a las proteínas denominadas Che. Las proteínas Che, según si el receptor ha detectado un repelente o atrayente, se dispara una cascada entre las proteínas que determina si la bacteria debe detener el movimiento o no.

Ensamble flagelar

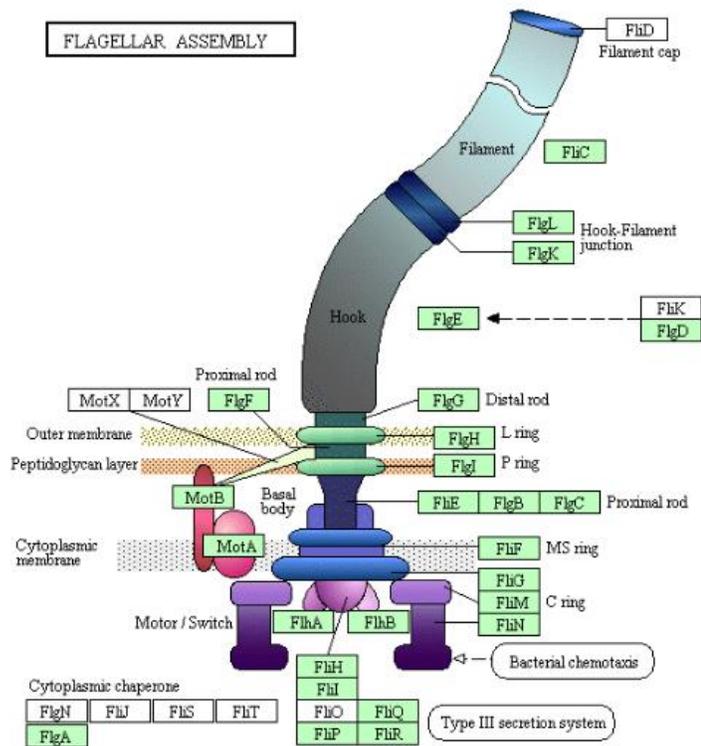


Figura 15. Vía metabólica relacionada al sistema de movilidad, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

El flagelo es una estructura compleja compuesta de varios elementos y que rota como una hélice. Los flagelos están compuestos aproximadamente de 20 proteínas, con otras 30 proteínas para su regulación y coordinación. En el genoma de E109 se detectaron secuencias que codifican para proteínas de biosíntesis flagelar (FlhAB), flagelinas (FliCEFGMNHIQPR), proteínas de la biosíntesis del anillo P del cuerpo basal flagelar (FlgLKEDGFHIBCA), y proteínas de quimiotaxis (MotAB). Estas proteínas en su conjunto permiten el movimiento, como así también la regulación del movimiento de la bacteria.

II.3.4.2.3 Biosíntesis de Poliaminas

Las poliaminas son moléculas que se encuentran presentes en plantas y microorganismos. En las primeras actúan como fitohormonas. Las poliaminas son moléculas policatiónicas constituidas por varios grupos amino a lo largo de la cadena. Las aminos se pueden clasificar en alifáticas (putrescina, espermidina, espermina, cadaverina), aromáticas (tiramina, feniletilamina) o heterocíclicas (histamina, triptamina). La L-arginina es un aminoácido precursor de las poliaminas.

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

La cadaverina se produce a partir de lisina. *B. japonicum* produce varias poliaminas, como putrescina, espermidina, espermina y cadaverina (Hamana et al., 1990).

Biosíntesis de poliaminas

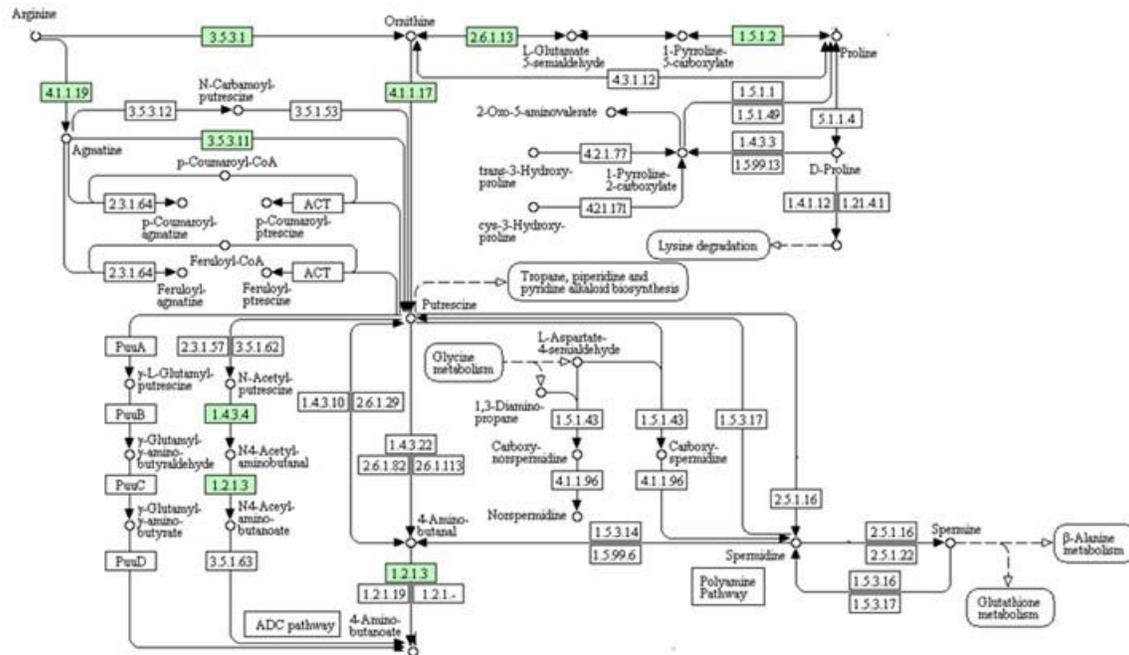


Figura 16. Vía metabólica relacionada al metabolismo de arginina y prolina, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

La **Figura 16** muestra que *B. japonicum* E109 posee las secuencias codificantes para la ornitina descarboxilasa (EC: 4.1.1.17) que cataliza la conversión de ornitina en putrescina. También posee la secuencia de la agmatinasa (EC: 3.5.3.11), cataliza la conversión de agmatina en putrescina.

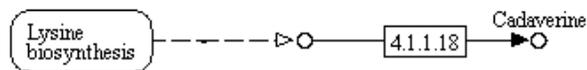


Figura 17. Vía metabólica relacionada a degradación de lisina, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

En esta figura, observamos que en E109 no se encuentra la secuencia codificante para la enzima lisina descarboxilasa (EC: 4.1.1.18) que convierte la lisina en cadaverina.

II.3.4.2.4 Transporte y Sistema de Secreción

Las bacterias secretan un gran número de proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen toxinas, adhesinas y diversas enzimas hidrolíticas que se requieren en diferentes aspectos del ciclo de vida bacteriano, como por ejemplo, en la biogénesis de organelas, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. Los transportadores (con un énfasis en la transportadores ABC) son fundamentales para la adaptación bacteriana, con roles en la fisiología celular, incluyendo la absorción de nutrientes, la exclusión de los residuos celulares, la generación de energía y la señalización celular, entre otros (Davidson et al., 2008). Los sistemas de secreción sirven para excretar sustancias al exterior, y lo llevan a cabo mediante los transportadores.

Tabla 7. Los subsistemas de Movilidad y Quimiotaxis obtenidos de la secuencia del genoma de *Bradyrhizobium* sp. de acuerdo a la clasificación en subsistemas y funciones de RAST.

| Transporte y sistema de Secreción | E109 | USDA6 | USDA110 | 579 | S23321 |
|--|-------------|--------------|----------------|------------|---------------|
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo II | 34 | 33 | 37 | 29 | 22 |
| Vía de secreción general | 11 | 11 | 11 | 0 | 0 |
| Isla de colonización generalizada | 23 | 22 | 26 | 29 | 22 |
| Transportadores ABC | 171 | 147 | 40 | 166 | 135 |
| Transportador ABC Alkilfosfonato (TC 3.A.1.9.1) | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| Transportador ABC Tungstato (TC 3.A.1.6.2) | 2 | 3 | 10 | 2 | 3 |
| Transportador ABC Oligopéptido (TC 3.A.1.5.1.) | 36 | 32 | 0 | 28 | 28 |
| Transportador ABC Sistema AttEFGH | 4 | 4 | 4 | 0 | 4 |
| Transportador ABC Aminoácido cadena ramificada (TC 3.A.1.4.1) | 98 | 88 | 22 | 110 | 77 |
| Transportador ABC dipéptido (TC 3.A.1.5.2) | 27 | 16 | 0 | 22 | 19 |
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo VII | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Sigma-Fimbrias | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Proteínas de translocación a través de la membrana citoplasmática | 7 | 6 | 5 | 8 | 6 |
| Partícula de reconocimiento de señal bacteriana (SRP) | 2 | 3 | 2 | 4 | 3 |
| Sistema de translocación de argininas gemelas | 5 | 3 | 3 | 4 | 3 |
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo V | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo I | 0 | 0 | 4 | 7 | 0 |
| Sistema de secreción tipo I para agregación | 0 | 0 | 4 | 7 | 0 |
| Transportadores Catión | 21 | 10 | 35 | 22 | 9 |
| Sistema de absorción de cobre CopCD | 0 | 0 | 5 | 0 | 0 |
| Transportador magnesio | 9 | 5 | 9 | 7 | 5 |
| Transportador Níquel y cobalto | 4 | 5 | 5 | 4 | 4 |
| Sistema de transporte de cobre | 4 | 0 | 8 | 8 | 0 |
| Transporte de cobre y proteínas azules de cobre | 4 | 0 | 8 | 3 | 0 |

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

| | | | | | |
|---|------------|------------|------------|------------|------------|
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo III | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| Sistema de secreción tipo III | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 |
| Uniporte-Simporte-Antiporte | 5 | 6 | 2 | 3 | 3 |
| Transportadores fosfatos dependiente de Na, NhaD y NhaA | 5 | 6 | 2 | 3 | 3 |
| Transportadores de Membrana-no subcategoría | 69 | 53 | 42 | 46 | 47 |
| Sistema transportador Tricarboxilato | 34 | 20 | 20 | 19 | 17 |
| Sistema de transportador Tol y Ton | 35 | 33 | 22 | 27 | 30 |
| Transportadores TRAP | 46 | 43 | 42 | 21 | 40 |
| Transportador TRAP sustrato desconocido 9 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Transportador TRAP sustrato desconocido 4 | 3 | 2 | 3 | 3 | 2 |
| Transportador TRAP sustrato desconocido 3 | 6 | 6 | 6 | 3 | 6 |
| Transportador TRAP sustrato desconocido 6 | 6 | 6 | 6 | 5 | 6 |
| Colección de Transportador TRAP | 22 | 21 | 19 | 7 | 15 |
| Transportador TRAP sustrato desconocido 5 | 3 | 3 | 3 | 0 | 6 |
| Transportador TRAP sustrato desconocido 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Transportador TRAP hipotéticos | 3 | 3 | 3 | 0 | 3 |
| Sistema azúcar Fosfotransferasa, PTS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo VI | 18 | 16 | 16 | 15 | 0 |
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo VI | 18 | 16 | 16 | 15 | 0 |
| Sistema de secreción de proteínas, Tipo VIII | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Sistema de secreción de nucleoproteínas y proteínas, Tipo IV | 13 | 9 | 13 | 15 | 0 |
| Transferencia por conjugación | 13 | 9 | 13 | 15 | 0 |
| Total de ORFs deducidos | 384 | 323 | 246 | 346 | 262 |

En las bacterias Gram negativas, las proteínas a translocarse tienen que atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplasmático y la capa de peptidoglicano: la membrana citosólica o membrana interna y la membrana externa que es una bicapa asimétrica cuya cara exterior está compuesta principalmente por lipopolisacáridos (Lee y Schneewind, 2001). A pesar del número, la diversidad y la amplia variedad de funciones que desempeñan las proteínas secretadas, estas son translocadas utilizando un número limitado de mecanismos. Las vías de secreción en las bacterias Gram negativas han sido clasificadas en seis grupos o sistemas principales: sistemas de secreción tipo I, II, III, IV y VI. Dicha clasificación se basa en la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que estas catalizan (Lee y Schneewind, 2001).

II.3.4.2.4.1 Tipo I (T1SS)

Las bacterias Gram negativas, además del transportador ABC poseen proteínas adicionales que, junto con la proteína ABC, forma un canal contiguo que cruza las membranas interiores y

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

exteriores. Consiste de sólo tres subunidades de proteína: la proteína ABC, proteína de fusión a la membrana y proteína de la membrana externa. Este sistema de secreción transporta diversas moléculas, como iones, medicamentos y proteínas de varios tamaños (de 20 a 100 kDa).

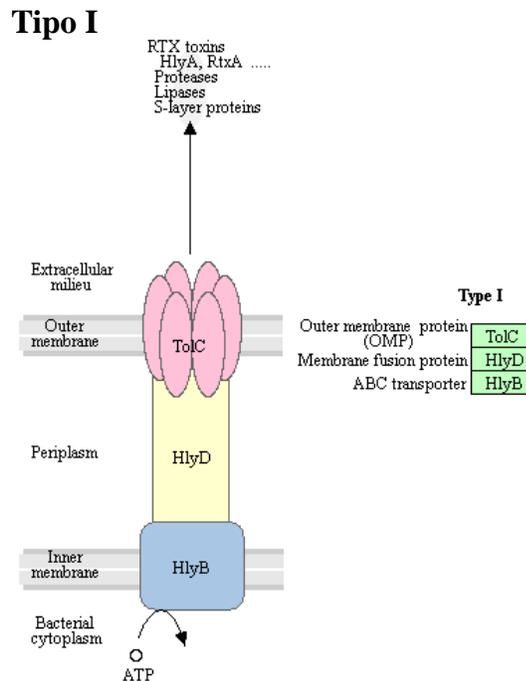


Figura 18. Sistema de secreción tipo I, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

Para *B. japonicum* E109, se han detectado los tres tipos de proteínas relacionadas del sistema de secreción tipo I: proteína de la membrana externa (OMP) denominada proteína canal TolC; proteína de fusión a la membrana denominada proteína de secreción de hemolisina D (HlyD); y el transportador ABC denominada peptidasa C39 (HlyB).

II.3.4.2.4.2 Tipo II (T2SS)

El sistema de secreción tipo II es el responsable de secretar enzimas. Contribuyen a la evolución y diversificación de la vida microbiana. Las proteínas secretadas dependen del sistema Sec para el transporte inicial en el periplasma. Una vez allí, pasan por la membrana externa a través de un complejo multimérico de proteínas secretinas. Otras 10-15 proteínas de la membrana interior y exterior forman el aparato de secreción completo, muchas con función desconocida.

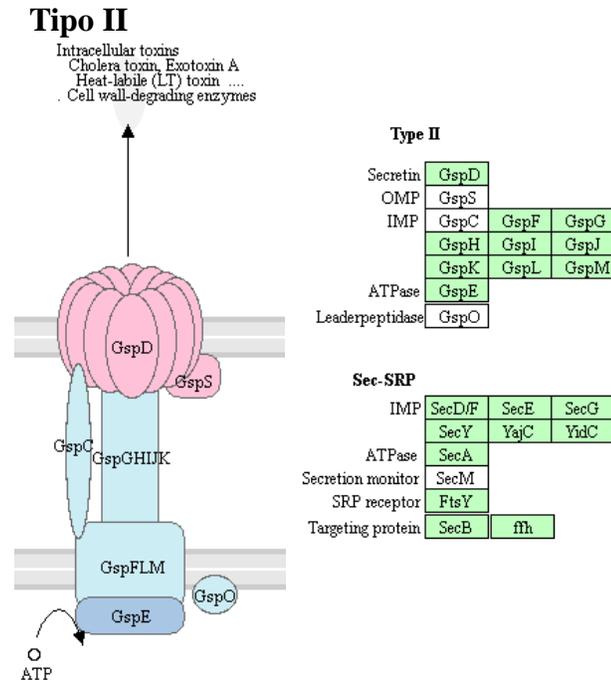


Figura 19. Sistema de secreción tipo II, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

En *B. japonicum* E109 se detectaron las siguientes secuencias que codifican para genes del T2SS: secretina o proteína de la vía de secreción general (GspD); proteínas de membranas internas (IMP), denominadas GspFGHIJKLM; y ATPasa denominadas GspE. Del sistema Sec: IMP o subunidad translocasa de preproteína (SecD/FEGY-YajC-YidC); ATPasa denominadas SecA; receptores Rcp o proteína de división celular (FtsY); y proteínas target o subunidad translocasa de preproteína (SecB) y proteína de unión al ARN (ffh).

II.3.4.2.4.3 Tipo III (T3SS)

Este sistema de secreción es homólogo al cuerpo basal bacteriano. Se asemeja a una jeringa molecular mediante la cual la bacteria (por ejemplo, ciertos tipos de *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia*) inyecta proteínas en las células eucariotas. La puerta que regula el T3SS se abre con una baja concentración de Ca^{2+} en el citosol. Uno de los mecanismos de detección es el antígeno IcrV (respuesta al nivel bajo de calcio) de *Y. pestis*. El T3SS se descubrió por primera vez en *Y. pestis* y demostró que las toxinas pueden ser inyectadas directamente desde el citoplasma de la bacteria en el citoplasma de las células huésped (Salyers y Whitt, 2002).

Tipo III

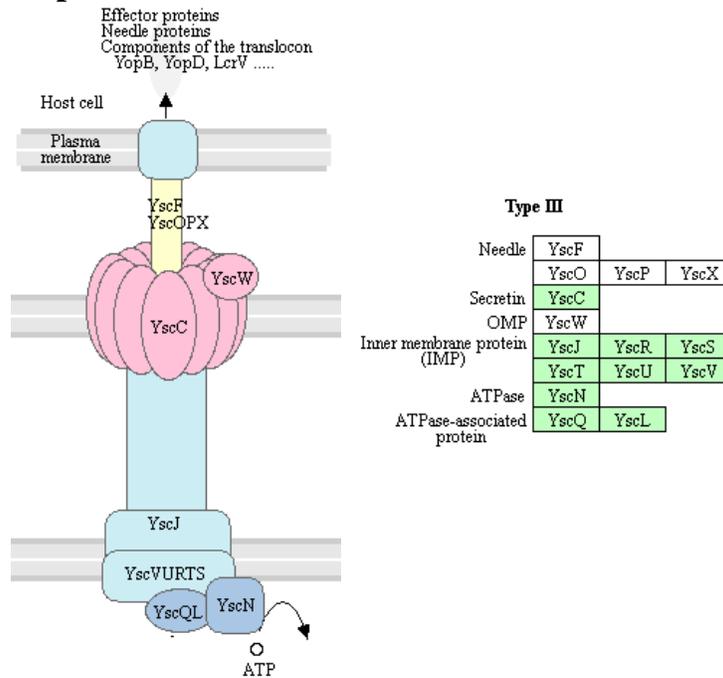


Figura 20. Sistema de secreción tipo III, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

Del T3SS en E109, no se detectaron los genes relacionados a la jeringa ni OMP. Sin embargo, hay genes para secretina (YscC), IMP (YscJRSTUV); ATPasa (YscN); y ATPasa asociadas a proteínas (YscQL).

II.3.4.2.4.4 Tipo IV (T4SS)

Los T4SS constituyen una familia de transportadores macromoleculares capaces de transportar distintas moléculas (proteínas y ADN) de la bacteria al exterior a través de la membrana. Es homólogo a la maquinaria de conjugación bacteriana. Fue descubierto en *Agrobacterium tumefaciens*, que utiliza este sistema para introducir el plásmido Ti y proteínas en el huésped que parasita.

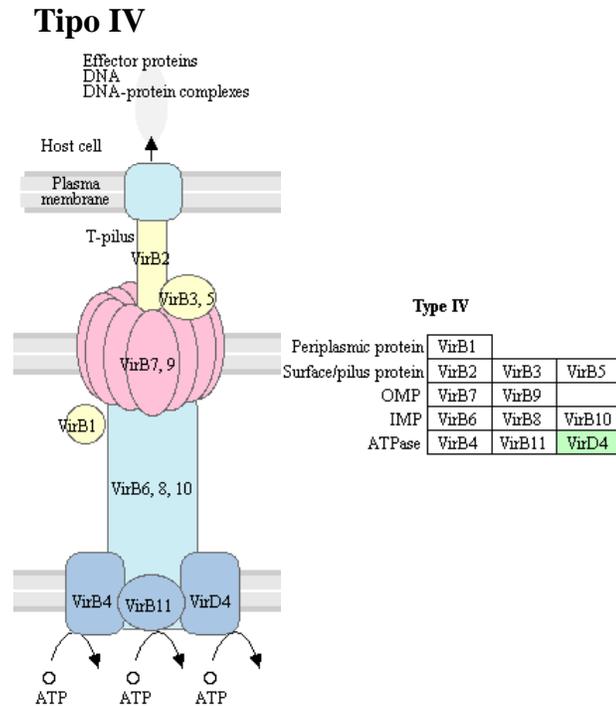


Figura 21. Sistema de secreción tipo IV, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

En este sistema de secreción tipo IV solo se detectó la proteína VirD4, para E109.

II.3.4.2.4.5 Tipo V (T5SS)

A través de este sistema se exportan proteínas con diferentes funciones incluyendo proteasas, toxinas, adhesinas e invasinas. Este sistema implica el uso del sistema Sec para traspasar la membrana interna. Las proteínas que utilizan esta vía tienen la capacidad de formar un barril- β con su terminal C, que se inserta en la membrana externa, permitiendo que el resto del péptido alcance el exterior de la célula. A menudo, los autotransportadores se separan, dejando el dominio beta-barril en la membrana externa y liberando el dominio transportado. Se cree que los remanentes de la autotransportadores dan lugar a las porinas.

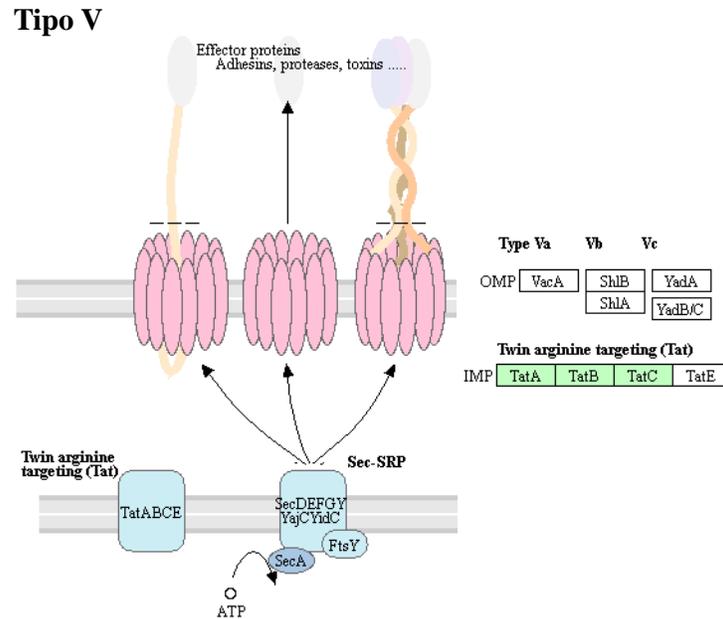


Figura 22. Sistema de secreción tipo V, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

Para E109 solo se detectaron proteínas para el sistema de translocación de argininas gemelas, TatABC.

II.3.4.2.5.6 Tipo VI (T6SS)

El T6SS se encuentra en bacterias Gram negativas simbióticas y patógenas que interactúan con eucariotas. Contiene de 15 a 20 genes, dos de los cuales, Hcp y VgrG, han mostrados ser casi substratos secretados universalmente del sistema. Análisis estructurales de esta y otras proteínas en este sistema tiene una semejanza sorprendente con el pico de la cola del fago T4.

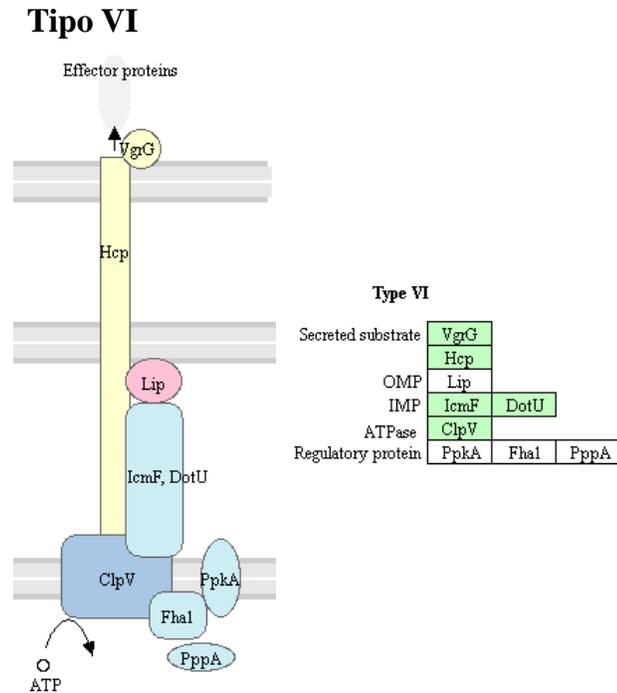


Figura 23. Sistema de secreción tipo VI, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

En E109 se detectaron las secuencias de las proteínas relacionadas al sustrato secretado (VgrG-Hcp), IMP (IcmF-DotU) y ATPasa (ClpV) del T6SS.

II.3.4.2.5 Producción de Fitohormonas

II.3.4.2.5.1 Ácido Jasmónico (JA)

El ácido jasmónico (JA) y sus derivados son hormonas que regulan una amplia gama de procesos en las plantas, desde el crecimiento y la fotosíntesis hasta el desarrollo reproductivo. Se biosintetiza a partir de ácido linolénico por la vía octadecanoide. Poco se sabe sobre la producción y la función de jasmonatos endógenos en nódulos de las raíces de las plantas de soja inoculadas con *B. japonicum*. Se ha propuesto que el JA estaría involucrado en la interacción soja-*Bradyrhizobium* actuando como un inductor natural de la producción de los factores Nod (Rosas et al., 1998; Hause y Schaarschmidt, 2009; Ferguson et al., 2010). Estudios recientes sugieren que el aumento de los niveles de JA y ácido 12-oxofitodienoico (OPDA) en las plantas de control están relacionados con la senescencia inducida por el estrés nutricional. La acumulación de OPDA en las raíces noduladas sugiere su implicación en la "autorregulación de la nodulación" (Costanzo et al., 2012).

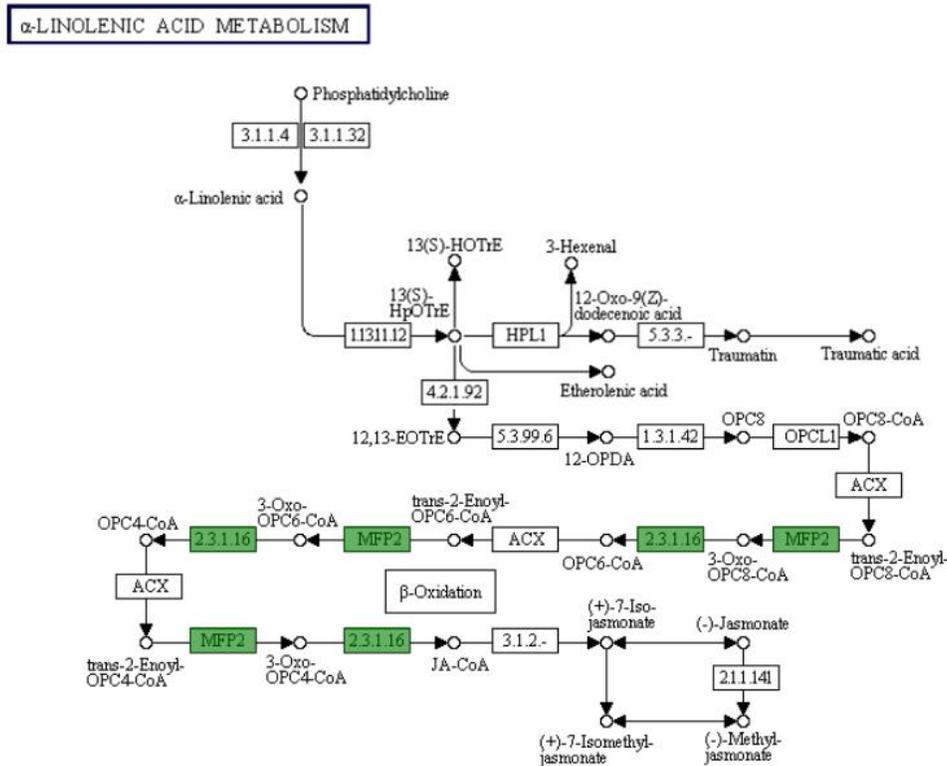


Figura 24. Vía metabólica relacionada con el metabolismo del ácido α -linolénico, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

No se encontró una fuerte evidencia de la biosíntesis de JA en *B. japonicum* E109, sin embargo, algunas secuencias codificantes relacionados con fines de β -oxidación de la ruta biosintética fueron identificados en el genoma de E109: enoil-CoA hidratasa o MFP2 (EC: 4.2.1.17) y 3-ketoacil-CoA tiasa (EC: 2.3.1.16).

II.3.4.2.5.2 Giberelinas

Las distintas vías de biosíntesis de giberelinas en las plantas y los hongos son conocidos, pero no en las bacterias. Las plantas típicamente usan dos diterpenos sintasa para formar ent-kaureno, mientras que los hongos utilizan una única diterpeno sintasa bifuncional. Morrone et al. (2009) demostraron que *B. japonicum* codifica difosfato ent-copalyl independiente y sintasa ent-kaureno.

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

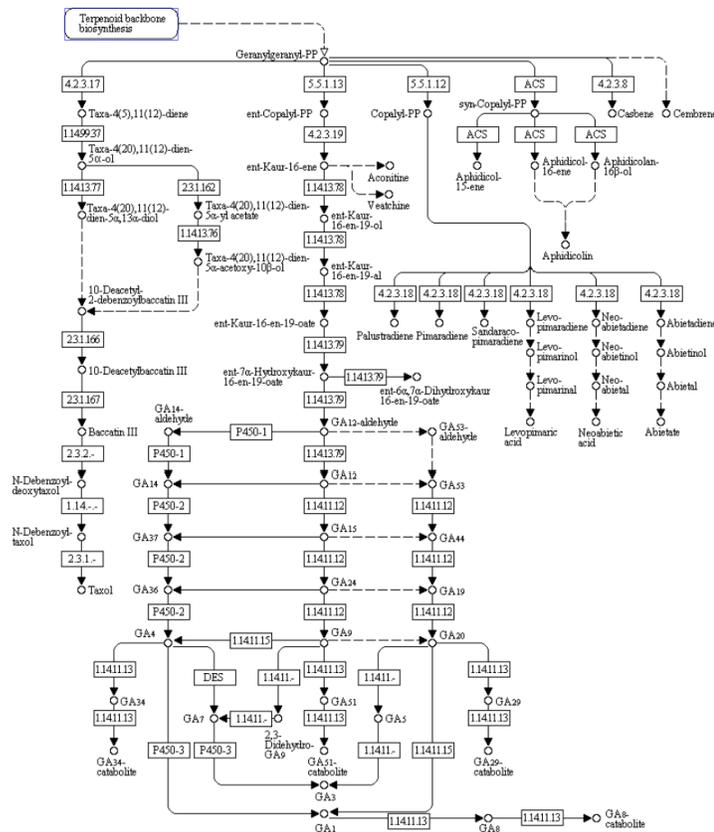


Figura 25. Vía metabólica relacionada con la biosíntesis de diterpenoides, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

Según el mapa de KEGG no hay secuencias relacionadas con la biosíntesis de giberelinas para *B. japonicum* E109. Sin embargo, buscamos en NCBI secuencias relacionadas con la biosíntesis de giberelinas en especies relacionadas con E109 y realizamos un blast con E109.

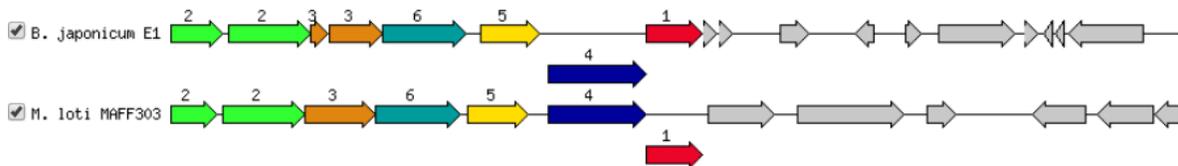


Figura 26. Imagen obtenida luego de hacer un blast de la secuencia de ent-kaureno sintasa (EC: 5.5.1.13) de USDA110 contra E109 y una cepa de referencia, *Mesorhizobium loti* MAFF303. Referencias (Genes): (1 y 4): proteínas hipotéticas (difosfato copalil sintasa y ent-kaureno sintasa); (2 y 6): Citocromo P450; (3) dehidrogenasa; (5) Octaprenil difosfato sintasa (EC 2.5.1.90)/ Dimetilaliltransferasa (EC 2.5.1.1)/(2E,6E)-farnesil difosfato sintasa (EC 2.5.1.10)/ Geranylgeranyl difosfato sintasa (EC 2.5.1.29).

En el genoma de *B. japonicum* E109, encontramos la secuencia codificante de una proteína hipotética con 100% de similitud con la ent-kaureno sintasa de USDA110 relacionado con la biosíntesis de giberelinas. La secuencia de la proteína está posicionada en el operón tentativo de la biosíntesis de las giberelinas en las bacterias. Esto podría ser una sugerencia de que E109 tendría alguna de las secuencias relacionadas con la síntesis de esta hormona.

II.3.4.2.5.3 Ácido Abscísico (ABA)

La producción de ABA no está muy extendida en las bacterias como las auxinas o citoquininas. En plantas. Participa en procesos del desarrollo y crecimiento así como en la respuesta adaptativa a estrés tanto de tipo biótico como abiótico. La presencia de esta molécula se evaluó previamente en *A. brasilense* por Kolb y Martin, (1985) y Cohen et al. (2008). Boiero et al. (2007) estableció la capacidad de USDA110 para producir ABA en medios químicamente definidos.

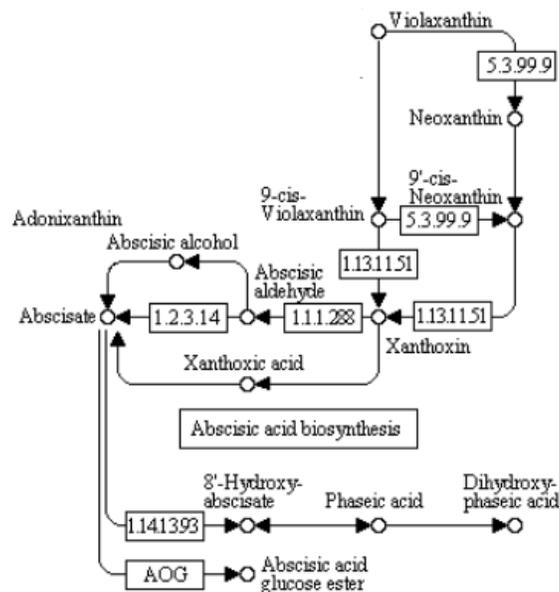


Figura 27. Vía metabólica relacionada con la biosíntesis de carotenoides, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

No hay evidencia de la capacidad de síntesis de ABA, en E109 debido a que no se identificaron secuencias relacionadas con la síntesis de esta hormona. Tampoco encontramos evidencia indirecta utilizando secuencias en organismos similares.

II.3.4.2.5.4 Zeatina (Z)

Las citocininas son un grupo de compuestos naturales que regulan la división y diferenciación celular en tejidos no meristemáticos de plantas superiores. Químicamente son purinas, en su mayoría derivadas de la adenina, sustituidas en el N⁶, que incluyen sus respectivos ribótidos, ribósidos y glucósidos. Estas fitohormonas se han asociado a un gran número de procesos fisiológicos y celulares entre los que se detallan el retardo de la senescencia por acumulación de la clorofila, la formación de órganos en una gran variedad de cultivos de tejidos, el desarrollo de la raíz, la formación de pelos radicales, la elongación de la raíz, la iniciación del tallo, la expansión de las hojas. Jaiswal et al. (1982) encontraron que la Z exógena aumentó la actividad nitrogenasa en los nódulos de *Vigna mungo*. Taller y Sturtevant (1989) caracterizó la zeatina y algunos compuestos derivados en medio definido de *B. japonicum* y recientemente por Boiero et al. (2007).

Hay dos grupos de citoquininas: el grupo de citoquininas tipo adenina representado por compuestos naturales y sintéticos, tales como cinetina (K), zeatina (Z) o 6-bencilaminopurina (6-BAP) y el grupo de las citoquininas de tipo fenilurea representado por las moléculas sintéticas difenilurea y tidiazuron (TDZ). Químicamente, las citocininas tipo adenina son purinas, en su mayoría derivados de la adenina y modificados por sustituciones en el N⁶, que también incluyen los respectivos ribótidos, ribosidos y glucósidos de IPT.

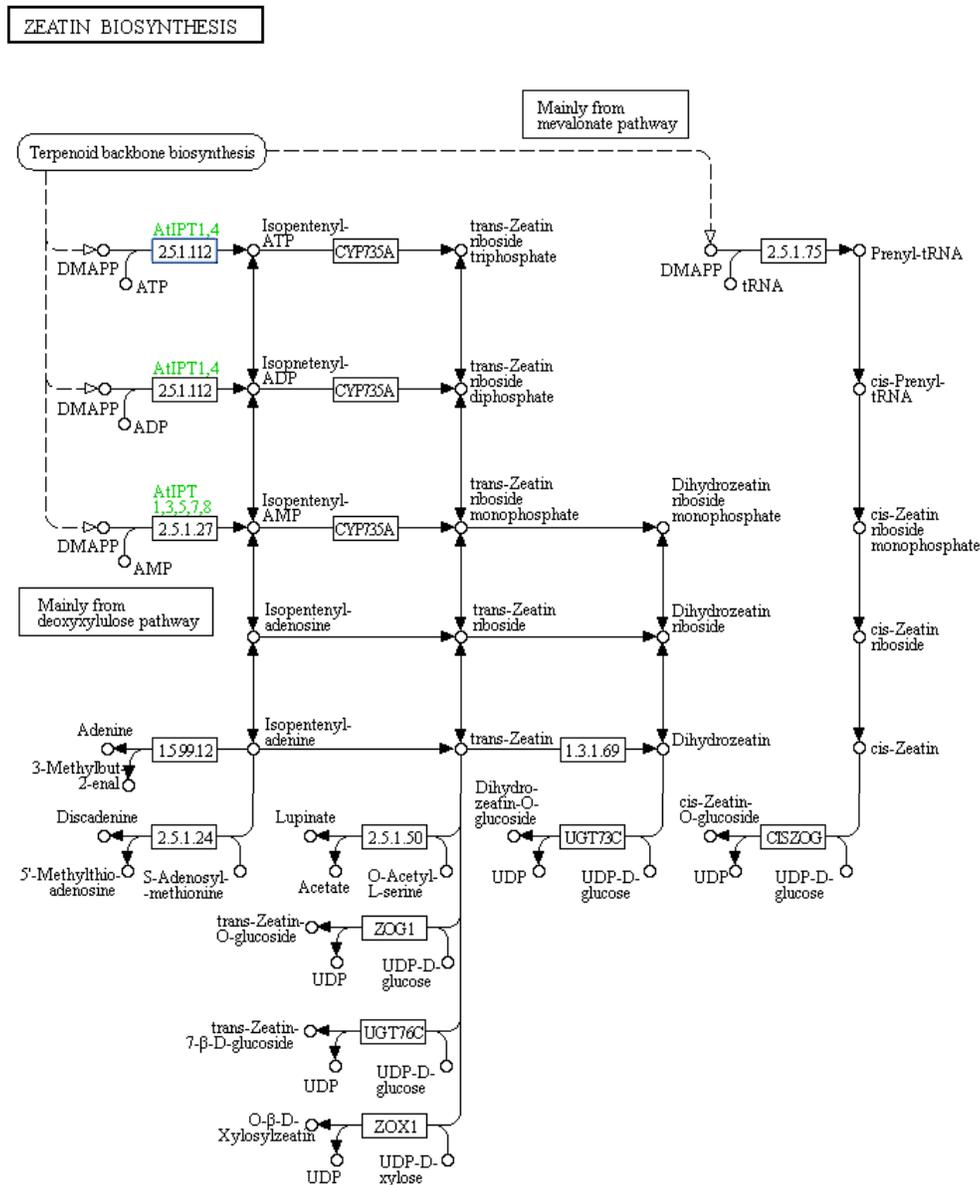


Figura 28. Vía metabólica relacionada con la biosíntesis de carotenoides, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

Según KEGG, no pudimos confirmar la presencia de secuencias relacionadas con la síntesis de zeatina en E109. Tampoco pudimos establecer evidencia indirecta.

II.3.4.2.5.5 Etileno

Junto con auxinas, giberelinas y citocininas, el etileno es una hormona muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Burg y Burg, 1966). Debido a su composición gaseosa en condiciones fisiológicas, por mucho tiempo, no se quiso aceptar como una fitohormona; sin

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

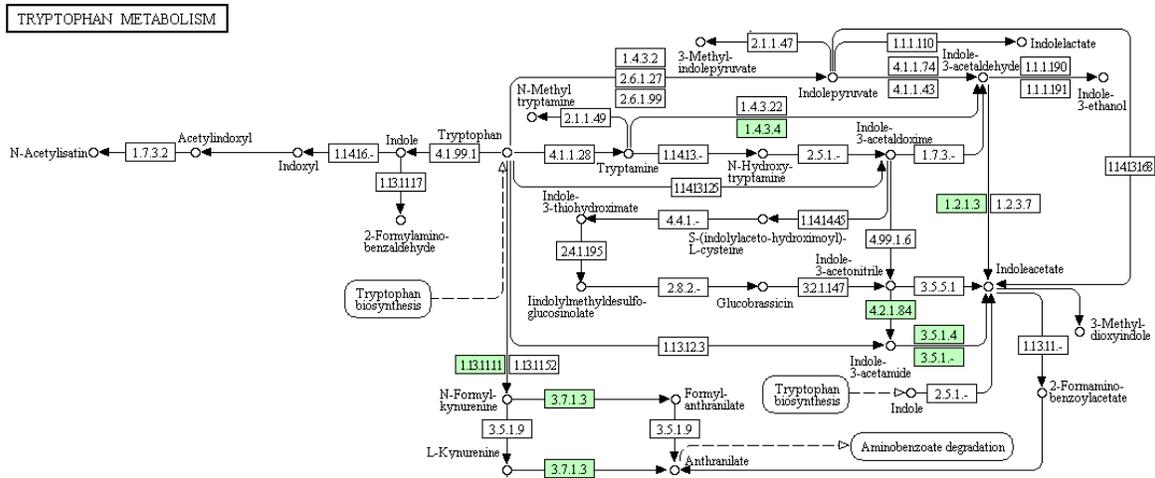


Figura 30. Vía metabólica relacionada con el metabolismo de triptófano, de acuerdo al diagrama de KEGG (Kanehisa et al., 2004), para *B. japonicum* E109.

A través de la vía metabólica de KEGG se identificaron las siguientes enzimas de la biosíntesis de AIA; aminoxidasa o monoamino oxidasa (EC: 1.4.3.4), aldehído deshidrogenasa (NAD⁺) (EC: 1.2.1.3), nitrilo hidratasa subunidad alfa (EC: 4.2.1.84), amidasa (EC: 3.5.1.4) e indolacetamida hidrolasa (EC: 3.5.1.-). Ninguna de las vías de síntesis está completa, por lo que hicimos un análisis en otras cepas de *Bradyrhizobium*.

Tabla 8. Enzimas principales de la vía de síntesis de AIA identificados en E109 y en otras cepas del género *Bradyrhizobium*.

| Vías de síntesis de AIA | E109 | USDA6 | USDA110 | 587 | S23321 |
|---|------|-------|---------|-----|--------|
| IAM | | | | | |
| Trp-2- monoxigenasa (EC: 1.13.12.3) | - | - | - | - | - |
| IAM hidrolasa (EC: 3.5.1.-) | + | + | + | + | + |
| Amidasa (EC: 3.5.1.4) | + | + | + | + | + |
| IAN | | | | | |
| Trp-2- monoxigenasa (EC: 1.13.12.3) | - | - | - | + | - |
| Nitrilo hidratasa (EC: 4.2.1.84) | + | + | + | + | + |
| Nitrilasa (EC: 3.5.5.1) | - | - | + | + | - |
| IPyA | | | | | |
| Trp aminotransferasa (EC: 2.6.1.27) | - | - | - | - | - |
| Indolepiruvato descarboxilasa (IPDC) (EC: 4.1.1.74) | - | - | - | - | - |
| Aldehído deshidrogenasa (EC: 1.2.1.3) | + | + | + | + | + |
| TAM | | | | | |
| Trp descarboxilasa (EC: 4.1.1.28) | - | - | - | - | - |
| Monoamina oxidasa (EC: 1.4.3.4) | + | + | + | - | + |
| Aldehído deshidrogenasa (EC: 1.2.1.3) | + | + | + | + | + |

En todas las cepas evaluadas, fueron identificados alguna o todas las secuencias codificantes involucrados en tres posibles vías de síntesis de AIA; sin embargo, la vía predominante en E109 sería la IAM debido a la ausencia de los genes claves para las enzimas de las vías IPyA e IAN.

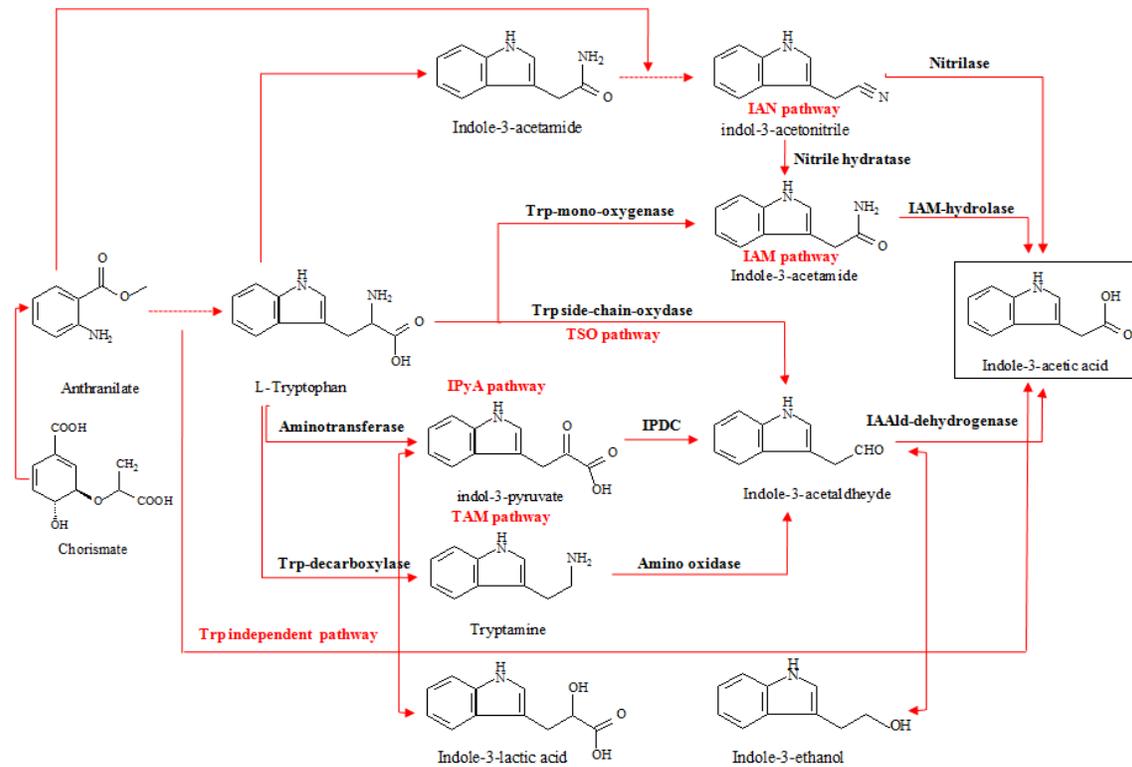


Figura 31. Vías hipotéticas y actuales de la síntesis de AIA en rizobacterias. Modificado por Spaepen et al. (2008).

De acuerdo con la **Figura 31** podemos resumir nuestros resultados en función de las vías de síntesis de AIA propuestas en rizobacterias, como se detalla a continuación:

✓ **Vía IPyA (Incompleta)**

Nuestro análisis identificó la secuencia codificante de la enzima aldehído deshidrogenasa (EC: 1.2.1.3) la cual convierte indol-3-acetaldehído a AIA. Esta enzima tiene 100%, 97%, 92% y 96% en USDA6, USDA110, 587 y S23321 respectivamente.

✓ **Vía IAM (Incompleta)**

Se identificó en E109 la secuencia codificante de la enzima amidasa (EC: 3.5.1.4) que convierte el IAM en AIA. Esta secuencia posee los siguientes porcentajes de similitud con USDA6, USDA110, 587 y S23321 respectivamente; 100%, 93%, 79% y 96%.

✓ **Vía IAN (Incompleta)**

II.4 DISCUSIÓN

B. japonicum E109 es una cepa de importancia agrícola que se utiliza desde 1980 como principio activo para la formulación de inoculantes para semillas de soja en nuestro país. Ha sido extensamente estudiada debido a su capacidad de asociarse de manera simbiótica con leguminosas y fijar nitrógeno atmosférico. A pesar de la información disponible en cuanto a los mecanismos por el cual promueven el crecimiento en soja, no existía información disponible de la base molecular que determina esta capacidad en la cepa.

La secuenciación genómica de E109 y el posterior cierre del genoma reveló que *B. japonicum* E109 posee un longitud de 9.224.208 pb, no posee plásmidos y el contenido de GC es 63.6%. La secuencia completa del genoma de *B. japonicum* E109 está disponible en NCBI GenBank bajo el número de acceso: CP010313 (Torres et al., 2015). El posterior análisis genómico nos permitió ampliar el conocimiento de los mecanismos de promoción de una de las bacterias con más importancia para Argentina. Este análisis del genoma completo, mostró que esta bacteria posee mecanismos PGPR diferentes de la FBN. El análisis preliminar de los potenciales mecanismos de promoción del crecimiento de plantas y adaptación al ambiente presentes en *B. japonicum* E109, se comparó con los genomas de *B. japonicum* USDA6, *B. diazoefficiens* USDA110, *Bradyrhizobium* sp. S23321, ORS 278 y BTAi. E109 posee mayor similitud con la cepa USDA6 y que muchas de las secuencias codificantes identificados en el genoma E109 se comparten las otras bacterias comparadas. Sin embargo, existen genes que son únicos para esta cepa y que no comparte con ninguno de los genomas comparados.

El análisis funcional del genoma que se realizó a través de KEEG y RAST, clasificó las secuencias codificantes en subsistemas garantizando alta confianza, y también dio el apoyo comparativo con genomas cercanos previamente secuenciados. En *B. japonicum* E109 el 38% de sus secuencias codificantes son pertenecientes a la clasificación de los subsistemas, mientras que para USDA6 es un 35%, USDA110 es un 32%, 578 es un 35%, ORS278 un 32%, BTAi1 es un 38% y para S23321 un 40% (**Figuras 6-12**). La clasificación en los subsistemas según RAST muestra que E109 tiene mayor similitud con las cepas USDA6 y USDA110.

Uno de los mecanismos de promoción del crecimiento más estudiado, es la FBN. *B. japonicum* E109 promueve este mecanismo haciendo simbiosis con la leguminosa, soja. Durante el proceso se forman estructuras especializadas, denominadas nódulos donde el N se convierte en amonio. Los simbioses intercambian moléculas de señalización, isoflavonoides derivados de plantas y los factores Nod derivados de bacteria (Loh y Stacey, 2001; van Rhijn, 1998). Así el intercambio de señales activa una serie de eventos en el proceso de nodulación, incluyendo que la raíz se curva, se produce la infección de los rizobios, y se forma el hilo de infección. A través del hilo de infección,

los rizobios migran hacia la corteza. Como los rizobios alcanzan la corteza y proliferan, se inicia la división celular cortical, llevando eventualmente a la formación de nódulos de la raíz donde en los bacteroides, las bacterias en el estado simbiótico, fijan el nitrógeno atmosférico en amoníaco (Dixon y Kahn, 2004; Garg y Geetanjali, 2007; Mylona et al., 1995; Pawlowski y Bisseling, 1996). A través de este análisis, confirmamos que E109 es capaz de llevar a cabo este proceso a través de las enzimas nitrogenasas cadena β (Mo-Fe) (**Figura 13**). La desnitrificación (nitrito a óxido nítrico) es incompleta, y es llevada a cabo por la enzima nitrito reductasa. *B. japonicum* E109 es capaz de transformar nitrato a nitrito por la enzima Nap, nitrato reductasa periplasmica y la conversión de nitrito a óxido nítrico es través de la nitrito reductasa.

Los rizobios en *vida libre* o saprofiticos pueden permanecer durante largos períodos de tiempo en el suelo, aún en ausencia de su huésped natural. Cuando ocurre la germinación y las raíces de las plantas penetran en el suelo y se producen cambios importantes en la composición química de la solución edáfica debido a que estos órganos en formación exudan una gran variedad de aminoácidos, proteínas, azúcares, carbohidratos complejos, flavonoides, alcoholes, vitaminas, hormonas y ácidos orgánicos que determinan el desarrollo de ciertos grupos microbianos y su movilización hacia las raíces, merced a un proceso de quimiotaxis positiva sobre muchos de los compuestos, en forma inespecífica (Gaworzewska y Carlile, 1982) o específica cuando está mediada por un grupo de compuestos químico atractivos denominados flavonoides (Caetano-Anollés et al., 1989). En el análisis realizado (**Tabla 6** y **Figura 14-15**) se encontraron 62 secuencias codificantes para la quimiotaxis y 142 secuencias codificantes de movilidad flagelar. *B. diazoefficiens* USDA110 produce dos tipos de flagelos, uno llamado "thin" (delgado) y una "thick" (grosso). (Kanbe et al., 2007). Recientemente, Siqueira et al. (2014) comparando los genomas de *B. japonicum* CPAC 15 (=SEMIA 5079) y *B. diazoefficiens* CPAC 7 (=SEMIA 5080) observó que los grupos de genes necesarios para la biosíntesis de ambos tipos de flagelos en USDA110 se conservan en CPAC 7, CPAC 15 y USDA6.

Las poliaminas se encuentran ampliamente distribuidas en todos los organismos, siendo la putrescina, espermidina, espermina y cadaverina las de mayor ocurrencia. Adicionalmente, en bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Bradyrhizobium* se ha probado la ocurrencia natural y mayoritaria de homo-espermidina (HSPD) (Hamana et al., 1990). Estos compuestos, intervienen en un gran número de procesos celulares de extrema importancia, tales como la modulación de la actividad de canales iónicos, el empaquetamiento, replicación y transcripción del ADN, la traducción del ácido ribonucleico mensajero y en el mantenimiento de la estabilidad de membranas celulares. La cadaverina ha sido correlacionada con la promoción del crecimiento vegetal a nivel de la producción de raíces adventicias (Niemi et al., 2002) y con la respuesta vegetal al estrés osmótico

(Aziz et al., 1997). Cassán et al. (2005) proponen que la capacidad de las bacterias promotoras del crecimiento de *vida libre* del género *Azospirillum* dependería, en parte, de la habilidad de la bacteria para producir y exportar cadaverina a los tejidos de las plantas inoculadas o a su rizósfera. En la **Figura 16**, se puede observar que *B. japonicum* E109 posee las secuencias codificantes para la síntesis de putrescina a través de las enzimas agmatinasa y ornitina descarboxilasa.

Siqueira et al. (2014) encontró que ocho genes en CPAC 15, USDA6 y USDA110, y siete en CPAC 7 son de productos metabólicos codificados con glicina-aspartato y repeticiones ricas que son características de proteínas secretadas por la T1SS (Linhartová et al., 2010). La mayoría de las exoproteínas del T1SS caracterizadas hasta la fecha pertenecen a patógenos animales y actúan como toxinas, proteasas, lipasas o adhesinas que promueven la virulencia (Linhartová et al., 2010). En *Rhizobium*, las exoproteínas del T1SS se han caracterizado como bacteriocinas promoviendo la competitividad para la nodulación (Oresnik et al., 1999), o como factores Nod, que juegan un papel todavía desconocido en la nodulación de algunos hospedadores (Linhartová et al., 2010). En E109 se identificaron las secuencias TolC, HlyD y B perteneciente al T1SS (**Figura 18**). Los genes de la maquinaria molecular del T2SS se encontraron sólo en USDA110 y USDA 6 (Siqueira et al. 2014) y en nuestro análisis también encontramos que E109 posee secuencias relacionadas a este sistema de secreción, sin embargo, GspC, que codifica un componente central de la membrana interna del T2SS (Douzi et al., 2012) se encuentra ausente en las tres cepas indicando que las cepas serían incapaces del sistema de secreción de tipo II (**Figura 19**). Varios rizobios, incluyendo USDA110 y USDA6 poseen genes necesarios para la biosíntesis del T3SS en sus compartimentos simbióticos (Kaneko et al., 2011, 2002). El T3SS actúa como una jeringa molecular para inyectar proteínas efectoras en células huésped de leguminosas, que afecta a los sistemas de defensa de las plantas para promover la colonización. Las actividades de T3SS efectores pueden tener efectos perjudiciales en algunas leguminosas huéspedes, incluso a nivel de cultivar (Deakin y Broughton, 2009). Siqueira et al. (2014) observó que los genomas de CPAC 15, CPAC 7, así como el USDA6 y el USDA110 comparten un clúster del T3SS altamente conservado dentro de su isla simbiótica. En E109 no se detectaron los genes relacionados a la jeringa ni OMP, sin embargo, se identificaron otras secuencias para las proteínas YscC, YscJRSTUV, YscN y YscQL (**Figura 20**). Los genomas CPAC 15 y CPAC 7 codificaron genes para el T4SS; algunos genes (isla simbiótica 9) se encuentran en CPAC 7, USDA6 y USDA110 pero existe cierta variabilidad entre las cepas ya que otros genes del T4SS estaban presentes en USDA110 pero estaban ausentes en CPAC7 y USDA6. En E109 solo se encontró un gen relacionado al T4SS, lo cual no es indicativo de que este sistema de secreción sea funcional (**Figura 21**). Las proteínas secretadas por el T5SS generalmente se consideran factores de virulencia que promueven la colonización del huésped por bacterias

patógenas (Thanassi et al., 2005), pero su papel, si lo hay, en las relaciones simbióticas, aún no se ha establecido. Los genes que codifican para el T5SS se encontraron en todos los genomas de 5079, USDA6 y USDA110 (Siqueira et al. 2014), sin embargo en E109 solo se encontraron tres genes Tat (**Figura 22**). La maquinaria molecular del T6SS está presente en las bacterias patógenas y simbióticas que viven libres, y que puedan participar en interacciones procariota-eucariota y procariota-procariota (Records, 2011). La función de estos sistemas de secreción no se comprende bien en el contexto de interacciones rizobios-leguminosas. Se ha sugerido que los genes que codifican para las proteínas ImpG/SciC/VasA actúen como componentes estructurales necesarios para el funcionamiento del T6SS (Schell et al., 2007; Zheng y Leung, 2007). En E109 se detectaron secuencias relacionadas a la secreción de sustrato OMP, IMP y ATPasa (**Figura 23**).

El primer mecanismo propuesto para explicar el efecto en la promoción del crecimiento de las bacterias de la orden *Rhizobiales* en plantas superiores fue la FBN; sin embargo, en la actualidad, se consideran otros mecanismos de promoción y uno de los más importantes sería la capacidad de producir y metabolizar hormonas vegetales o fitohormonas (Okon y Labandera-Gonzalez, 1994). Tien et al. (1979) fueron los primeros en sugerir que bacterias rizosférica, podrían mejorar el crecimiento vegetal por excreción de fitohormonas como AIA, AGs, citocininas y etileno (Bottini et al., 1989; Iosipenko y Ignatov, 1995; Patten y Glick, 1996; Rademacher, 1994; Strzelczyk et al., 2004).

Costanzo et al. (2012) observaron que el OPDA y JA exógeno en nódulos de soja aumentaría el número y tamaño de las células a diversos grados, dependiendo de la concentración. Los niveles de JAs durante las primeras etapas de desarrollo de nódulos parecen afectar a los procesos de crecimiento celular. El aumento de los niveles de JA y OPDA en las plantas control están relacionados con la senescencia inducida por estrés nutricional. La acumulación de OPDA en raíces noduladas sugiere su participación en la "autorregulación de la nodulación". Hause y Schaarschmidt (2009) propusieron que JAs afecta el crecimiento de células de nódulos, y el proceso de envejecimiento, al influir en el metabolismo antioxidante. No se encontró una fuerte evidencia de la biosíntesis de JA en *B. japonicum* E109 (**Figura 24**).

Las giberelinas constituyen un amplio grupo de compuestos naturales (ácidos diterpenos tetracíclicos), algunos de los cuales poseen actividad hormonal y regulan diversos procesos en el crecimiento y desarrollo de las plantas, como la germinación, el alargamiento caulinar, la floración y la fructificación (Davies, 2010). Sobre las 126 giberelinas conocidas en la actualidad (Crozier et al. 1991), 13 son específicas de hongos, 100 son exclusivas de plantas y 13 son ubicuas. A pesar de la amplia distribución entre reinos y de la cantidad de formas conocidas, cabe destacar, que solo algunas pocas tienen actividad biológica *per se* (Hedden y Phillips, 2000). Las plantas típicamente

usan dos diterpenos sintasa para formar ent-kaureno, mientras que los hongos utilizan una única diterpeno sintasa bifuncional. Morrone et al. (2009) demostraron que *B. japonicum* codifica difosfato ent-copalyl independiente y sintasa ent-kaureno. En el genoma de *B. japonicum* E109, encontramos una proteína hipotética con 99% de homología con el ent-kaureno sintasa de USDA110 relacionado con la biosíntesis de giberelina. El gen de la proteína está posicionado en el operón tentativo de la biosíntesis de las giberelinas en las bacterias. (**Figura 26**).

El ABA es una hormona vegetal, involucrada diferentes procesos fisiológicos del crecimiento y desarrollo de la planta, como la dormición de yemas y semillas, la maduración de frutos y en situaciones de estrés ambiental desfavorables como déficit hídricos o estrés salinos. El ABA está relacionado con la capacidad de plantas superiores para adaptarse a condiciones de estrés, a través de distintos procesos fisiológicos y moleculares que incluyen: alteraciones en la expresión de genes relacionados con estrés hídrico y cierre de estomas. Es muy escasa la información documentada sobre la identificación de ABA en cultivos químicamente definidos de rizobacterias promotoras del crecimiento y su correlación con el estado fisiológico de la planta. La mayor parte de los ensayos han sido realizados en sistemas de cultivos e inoculaciones de hongos y bacterias fitopatógenicas o en asociaciones simbióticas por bacterias nodulantes. En tal sentido, Suzuki et al. (2004) probaron que la aplicación exógena de ABA a plantas disminuye la cantidad de nódulos establecidos en plantas de *Trifolium repense* y *Lotus japonicus* inoculadas. Boiero et al. (2007) estableció la capacidad de *B. diazoefficiens* USDA110 para producir ABA en medios químicamente definidos. En E109 no encontramos evidencia de la capacidad de síntesis de ABA (**Figura 27**).

Por definición las citocininas, son compuestos que en presencia de concentraciones óptimas de auxinas, inducen la división celular en cultivos de vegetales. Letham en 1963, identificó una forma natural que denominó zeatina y desde entonces más de 40 citocininas y sus metabolitos han sido clasificados. Las formas con mayor actividad biológica son la Z, isopentenil-adenina, K y benziladenina. Pan et al. (1999) vieron que la PGPR *Serratia liquefaciens* cepa 2-68 con el agregado de 1 μM de cinetina fue el mejor tratamiento para promover el crecimiento de la planta. La altura de la planta y el peso seco de maíz dulce se vieron menos afectados que los de maíz en grano. Taller y Sturtevant (1989) observaron que *B. japonicum*, se caracteriza por la producción de compuestos de tipo zeatina. Boiero et al. (2007) también hizo la caracterización en E109. Hay evidencia de que las citoquininas intervienen en el desarrollo de nódulos y se sugiere que podrían ser responsables de la estimulación de la división celular cortical en raíces de leguminosas. Podría tener funciones inesperadas como la susceptibilidad de la raíz a la infección de rizobios y la organogénesis del nódulo. A pesar de que las citoquininas no se han comprobado ser esenciales para la simbiosis dependiente de factores Nod, las citoquininas bacterianas y/o compuestos como

citoquininas parecen ser importante para la nodulación independiente de los factores Nod en algunas legumbres. Esto sugiere que las citoquinas podrían de hecho ser un agente secreto de las interacciones simbióticas planta-microorganismo en las legumbres y potencialmente en todo el reino vegetal (Frugier et al., 2008). En el análisis funcional del genoma de E109 no pudimos identificar secuencias codificantes para la síntesis de zeatina (**Figura 28**).

El etileno es una hormona muy importante en el crecimiento y desarrollo de las plantas (Burg y Burg, 1966). Debido a su composición gaseosa en condiciones fisiológicas, por mucho tiempo, no se quiso aceptar como una fitohormona; sin embargo diferentes trabajos, demostraron que su síntesis y acción sobre la planta, era crítica para determinados procesos fisiológicos. Existe muy poca información disponible, relacionada a la producción de etileno en bacterias y la promoción del crecimiento vegetal. Ribaudou et al. (2006), evaluaron la respuesta de crecimiento de plántulas de arroz inoculadas con bacterias de vida libre del género *Azospirillum* y correlacionaron el aumento en el número y longitud de raíces adventicias con la biosíntesis bacteriana de auxinas y el aumento de los niveles de etileno por parte de las plantas inoculadas. En tal sentido, no existe referencia alguna que correlacione este modelo para *Bradyrhizobium*; sin embargo si existe información relacionada a la capacidad de ciertas cepas de este género de producir compuestos del tipo AIA (Boiero et al. 2005), por lo que podría existir una regulación similar en el modelo no leguminosas-*Bradyrhizobium*. En *B. japonicum*, resultados anteriores de Boiero et al. (2007), demostró la capacidad de E109, USDA110 y otras cepas relacionadas para producir este gas bajo condiciones de cultivo controladas. Sin embargo, en nuestro análisis, no fueron identificadas las secuencias codificantes de la enzima ACC deaminasa (**Figura 29**).

Dentro de las vías metabólicas buscadas en este análisis funcional, nos interesó particularmente el AIA. Existe reportes de que *Bradyrhizobium* tiene la capacidad de producir AIA en medios de cultivos (Hunter, 1987; Hutzinger y Kosuge, 1968), y esto ha sido demostrado ya que los nódulos inducido por una cepa de *B. japonicum* híper productoras de AIA contienen mucho más cantidades de AIA que aquellos nódulos inducidos por una cepa salvaje (Hunter, 1987; 1989). Esto indicaría que la bacteria puede afectar los niveles de AIA en el nódulo. Minamisawa y Fukai (1991), demostraron que las cepas productoras de rhizobitoxina en *B. japonicum* excretaban otro compuesto fitotóxico en los cultivos. Este compuesto se purificó e identificó como AIA. Han sido propuestas al menos seis rutas metabólicas para la biosíntesis de AIA y la mayor parte de ellas utiliza el aminoácido L-Trp como precursor (**Figura 31**). Estas vías se conocen como: IPyA, IAM, TAM, TSO, IAN y una vía independiente del L-Trp. A pesar de la cantidad de vías propuestas para la biosíntesis de AIA en rizobacterias, solo predominan dos sobre las demás: la vía IAM y la vía IPyA (Lambrecht et al., 2000). Luego del análisis del genoma, identificamos que en E109 la síntesis de

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

AIA sería por la vía IAM debido a la ausencia de los genes claves que codifican para las enzimas de la vías de síntesis IAN e IPyA (**Figura 30 y Tabla 8**).

II.5 CONCLUSIONES

1. Se obtuvo la secuencia completa del genoma de *B. japonicum* E109, la que presentó un solo replicón de 9.22 Mb de tamaño y no presentó evidencia de otros replicones, como plásmidos o crómidos.
2. Se determinó la existencia de numerosas secuencias codificantes relacionadas con mecanismos de promoción del crecimiento y otros de la vida rizosférica en el genoma de *B. japonicum* E109. Se destacan la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético y el metabolismo del nitrógeno por la FBN o la producción de NO. Sobre la biosíntesis de AIA, fueron identificados algunas de las secuencias codificantes involucrados en las tres posibles vías de síntesis de AIA. A pesar de estos hallazgos, la vía predominante en E109 sería indol acetamida.
3. La mayor parte de los mecanismos descritos en este análisis fueron propuestos y descritos en reportes previos desde el punto de vista bioquímico y fisiológico, por lo que nuestro aporte confirmaría de manera molecular tales presunciones.

CAPÍTULO III: Metabolismo de Auxinas y Catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

III.1 INTRODUCCIÓN

III.1.1 Auxinas

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

III.1.1.1 Auxinas en *B. japonicum*

La respuesta de la planta al AIA producido por microorganismos puede variar de benéfica a perjudicial, dependiendo de la concentración incorporada en los tejidos. En este sentido, algunos autores consideran que el aumento del *contenido endógeno* de la hormona por la actividad microbiana del suelo o sobre la planta, podría suplementar transitoriamente los niveles sub-óptimos del hospedador, modificar parcialmente el metabolismo celular, y por ello, promover el crecimiento. La infección de las raíces de plantas de soja (*Glycine max* L.) por *B. japonicum* da como resultado la formación de nódulos en los que se reduce el nitrógeno atmosférico en amoníaco. La formación de nódulos es el resultado de una compleja interacción entre la bacteria y la planta, donde las hormonas vegetales juegan un papel clave en el desarrollo y/o mantenimiento de los nódulos. Se ha demostrado que los nódulos contienen mayores niveles de auxinas que las raíces (Thimann, 1936), y la auxina principal en nódulos de las raíces es el AIA (Dullaart, 1970), y en la actualidad algunos trabajos indican que los cambios en el balance de esta hormona son un pre-requisito para la organogénesis del nódulo (Mathesius et al., 1998).

III.1.2 Metabolismo de Auxinas

El equilibrio entre la biosíntesis y el metabolismo de auxinas, que abarca el transporte, interconversión, conjugación, hidrólisis y catabolismo, determina los niveles reales de estas moléculas en una célula determinada y en un momento determinado del desarrollo. Muchos de los

avances recientes en el conocimiento del metabolismo de auxinas han surgido a través del estudio de la auxina más abundante en la naturaleza, el AIA.

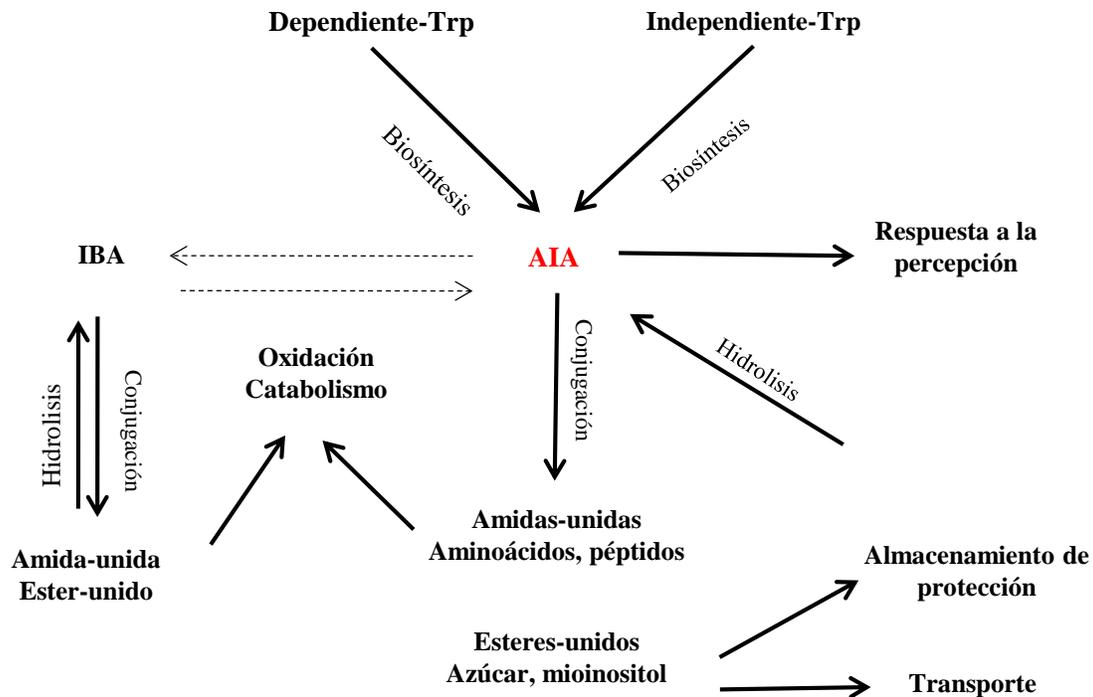


Figura 33. Procesos biológicos y bioquímicos que integran el metabolismo del AIA en la naturaleza. IBA: ácido indol butírico.

III.1.2.1 Biosíntesis *de novo*

Existen varias vías responsables de la biosíntesis de AIA en microorganismos asociados a plantas (Costacurta y Vanderleyden, 1995; Morris, 1995; Patten y Glick, 1996) y se ha sugerido que estas mismas vías existen en plantas superiores. Las vías descritas para la biosíntesis de AIA en bacterias se conocen como: IPyA, IAM, TAM, TSO, IAN y la vía independiente del L-Trp. A pesar de la cantidad de vías propuestas en rizobacterias, solo predominan dos sobre las demás: IAM y la vía del IPyA (Lambrecht et al, 2000). La evidencia de la importancia de estas vías incluye la presencia de los compuestos intermedios, interconversión de diferentes compuestos, y purificación parcial de las enzimas (Cooney y Simpsona, 1993).

III.1.2.1.1 Biosíntesis de AIA en *B. japonicum*

Esta capacidad ha sido descrita como parte de la capacidad promotora del crecimiento vegetal, a nivel de la formación de nódulos durante la simbiosis con leguminosas o a nivel del desarrollo del

sistema radical en especies de no leguminosas. *Bradyrhizobium* sp. tienen la capacidad genética y fisiológica de producir AIA en medio de cultivo (Hutzinger y Kosuge, 1968; Kaneshiro y Kwolek, 1985), y esto ha sido demostrado en numerosos experimentos tanto *in vitro* como *in vivo*. En el caso de los experimentos *in vivo* se ha comprobado que los nódulos producidos por una cepa de *B. japonicum* hiperproductora de AIA contienen mayor cantidad de AIA que aquellos nódulos inducidos por una cepa salvaje (Hunter, 1987; Hunter, 1989) lo que indicaría que la bacteria es capaz de sintetizar su propia hormona en el estado de bacteroide. Minamisawa y Fukai (1991) observaron que las cepas de *B. japonicum* productoras de rhizobitoxina excretaban otro compuesto en el medio de cultivo. Ese compuesto fue purificado e identificado como AIA. Los autores observaron que las cepas de genotipo II (USDA94 y USDA31) que producían rhizobitoxina, además excretaban mayor concentración de AIA en el medio de cultivo. Sin embargo, en las cepas de genotipo I (*B. diazoefficiens* USDA110, antes *B. japonicum*) no se detectó la presencia de esta molécula en el sobrenadante, incluso cuando se añadió L-Trp en el medio de cultivo. Estos resultados sugieren que en *B. japonicum*, la biosíntesis completa de AIA solo se limitaría a las cepas del genotipo II. El análisis genómico y funcional de *B. japonicum* E109, mostró que la cepa posee la información genética suficiente para la biosíntesis de AIA y que las vías predominantes en E109 sería IAM debido a la ausencia de los genes para las enzimas claves de la vía del IPyA e IAN (Torres et al., 2013).

III.1.2.2 Hidrólisis de conjugados de AIA

Además de las síntesis de *novoo*, las plantas producen AIA por la hidrólisis de conjugados de esta hormona con otras moléculas. La estructura de numerosos conjugados de AIA ha sido dilucidada y los mismos incluyen conjugados con azúcares, glicanos de alto peso molecular, aminoácidos o péptidos (Bandurski et al., 1995; Cohen y Bandurski, 1982). La creciente evidencia sugiere que los diferentes conjugados llevan a cabo diferentes funciones en la planta. Ciertos conjugados de AIA con ácido aspártico (AIA-Asp) puede ser intermediario de la vía catabólica del AIA (Monteiro et al., 1988; Tsurumi y Wada, 1986; Tuominen et al., 1994). En determinadas ocasiones, los conjugados de AIA pueden servir como reservorio debido a que pueden ser hidrolizados para proveer a la planta de la hormona en su forma activa rápidamente, jugando un papel clave en el control homeostático de los niveles de esta hormona en los tejidos vegetales (Bandurski, 1980). Otras de las funciones de los conjugados de AIA se vincularía con el desarrollo de órganos en la planta (embrión, vasculatura y raíces), la tolerancia a estrés abiótico y en la resistencia de la planta al ataque de patógenos (Ludwig-Müller, 2011) sin embargo, se desconoce cual es su rol en microorganismos. A nivel microbiológico, ciertas cepas de *Pseudomonas syringae* subsp.

savastanoi transforman el AIA en su forma de amida conjugada, AIA-lisina (Hutzinger y Kosuge, 1968) y el gen responsable de la síntesis de AIA-lisina es el *iaaL* que codifica para una enzima ATP dependiente que cataliza la formación de un enlace amida entre el grupo carboxilo del AIA y el grupo amino ϵ de la lisina (Hutzinger y Kosuge, 1968; Comai y Kosuge, 1983). Anteriormente, se demostró que las variaciones en el tamaño del “pool” de AIA en *P. syringae* subsp. *savastanoi* están afectadas por la síntesis de AIA y la conversión de AIA en la forma conjugada. La función del gen *iaaL* puede estar relacionado con la patogénesis, pero actualmente el mecanismo de expresión y en qué condiciones ambientales ocurre, no está claro (Spena et al., 1991).

III.1.2.2.1 Hidrólisis de conjugados de AIA en *B. japonicum*

Los conjugados de auxinas desempeñan un papel importante como formas de almacenamiento de AIA en plantas superiores. La mayoría de las plantas mantienen el AIA conjugado (Cohen y Bandurski, 1982) y los conjugados de AIA no sólo sirven como reservorios de AIA inactivos, sino que también puede funcionar como intermediarios en el catabolismo de AIA (Cohen y Slovin, 2000). En la evolución de las plantas terrestres los conjugados de AIA parecerían estar involucrados en el desarrollo del embrión, la raíz y la vascularización de tales estructuras. Todavía se desconoce cual sería la función y la regulación de la expresión de la actividad de hidrólisis en diferentes especies de bacterias. A modo de ejemplo, podemos mencionar que Chou et al. (1996) identificó una enzima con actividad del tipo hidrolasa sobre conjugados de AIA con aminoácidos (AIA-amidas) de una cepa de *Enterobacter agglomerans* con aparente especificidad hacia el N-acil-aspartato, pero la síntesis de esta enzima podría ser inducida además por otros compuestos con estructura amida. Cassán et al. (2011) y Pierantonelli et al. (2013) observaron que *B. japonicum* E109 tiene capacidad para hidrolizar algunos conjugados de AIA del tipo AIA-amidas, liberar y catabolizar AIA, e inducir cambios fisiológicos sobre la producción de biomasa bacteriana. Este efecto particular de *B. japonicum* parecería ser específico para el AIA ya que otras hormonas adicionadas al medio de cultivo, como ácido giberélico (AG₃) o kinetina (K) no fueron degradadas o modificadas en similares condiciones experimentales.

III.1.2.3 Catabolismo de AIA en bacterias

El catabolismo se define como un proceso catalítico irreversible que implica la pérdida de la actividad biológica de la hormona como consecuencia de su conversión bioquímica (oxidación) o utilización como fuente de carbono o N por parte de un organismo (asimilación). Cuando consideramos el catabolismo oxidativo o asimilativo de AIA, debemos tener en cuenta las siguientes reacciones químicas:

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

Las reacciones 1, 2 y 4 han sido caracterizadas en bacterias (Ernstsen et al., 1987; Hutzinger y Kosuge, 1968; Mino, 1970) y plantas (Suzuki et al., 1976; Nonhebel y Bandurski, 1984; Nonhebel et al., 1985; Reinecke y Bandurski, 1983; Sandberg et al., 1987); mientras que las reacciones de tipo 3, solo se han descrito para bacterias como en caso de *Arthobacter* sp. (Mino, 1970) o *Pseudomonas* sp. donde la vía de catabolismo implica la formación de compuestos intermediarios del tipo escatol (3-metil indol); indoxilo (3-hidroxi indol); ácido salicílico y catecol (Proctor, 1958) o como en el caso de ciertos ‘aislamientos obtenidos de muestras de aire’ para los que la degradación ocurre con la formación del ácido o-formaminobenzoylacético; o-aminobenzoylacético o antranílico (Tsubokura et al., 1961).

En el caso del catabolismo asimilativo, se puede mencionar el caso de *Pseudomonas putida* cepa 1290, donde el AIA degradado sirve como fuente de C y N para su crecimiento debido al alto valor nutritivo y su fácil digestibilidad, permitiendo la presencia y la expansión de las poblaciones de este microorganismo en lugares donde el AIA está disponible. *P. putida* 1290 degrada el AIA hasta catecol debido a la existencia de un clúster compuesto de 10 genes (genes *iac*) que codifican un conjunto de enzimas necesarias para la asimilación metabólica de AIA, vía degradación del grupo indol.

III.1.2.3.1 Catabolismo de AIA en *B. japonicum*

A comienzos de la década del 90, se evaluó la capacidad de sintetizar AIA en un gran número de cepas de *B. japonicum* incluyendo la cepa tipo USDA110 (hoy *B. diazoefficiens* USDA110) (Delamuta et al., 2013) y se comprobó que algunas de ellas eran incapaces de producir esta hormona y sobre la base de esta diferenciación, junto a la capacidad de producir rhizobiotoxina y EPS dividieron a la especie en dos genotipos, denominados I y II (Minamisawa y Fukai, 1991). Los autores propusieron que la diferencia de acumulación de AIA podría tener dos posibles explicaciones. La primera en el que las cepas del Genotipo I no solo producen AIA, sino que también pueden degradarlo y por ello que no se acumula en el sobrenadante del medio de cultivo; mientras que las cepas de Genotipo II producen la hormona y no pueden catabolizarla por lo que la molécula se acumula en el medio. La segunda explicación se basa en que las cepas del Genotipo II solo sintetizan AIA, mientras que las de Genotipo I no pueden hacerlo por no poseer la maquinaria genética y enzimática para hacerlo.

Otra vía propuesta para el catabolismo de AIA, es aquella descrita para los bradyrhizobios por Olesen y Jochimsen (1996) que supone el catabolismo a través de ácido dioxindol-3-acético, que luego se convierte a 2-dioxindol y por acción de una isatina reductasa a isatina, compuesto que por la acción de la isatina amidohidrolasa finalmente se convierte a ácido aminofenil glioxílico (ácido isatínico) y ácido antranílico.

Otros autores evaluaron la capacidad catabólica de *B. diazoefficiens* USDA110 y observaron que esta cepa es capaz de catabolizar la hormona y que la reacción sería dependiente de oxígeno. Según datos espectrométricos el anillo indol se rompería y la enzima encargada de dicha reacción sería análoga a la triptófano 2,3-dioxigenasa. También hipotetizaron que el ácido antranílico sería un producto de degradación de esta vía catabólica (Egebo et al., 1991). Jensen et al. (1995) aislaron los metabolitos de la degradación de AIA de *B. diazoefficiens* USDA110 y los analizaron a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), y espectrometría de masas (MS) y los productos identificados indicarían una nueva vía metabólica en la que el AIA se oxida a ácido dioxindol-3-acético, luego a dioxindol, una nueva oxidación ocurre dando como producto isatina, luego este se hidroliza a ácido glioxílico α -aminofenil (ácido isatínico) para dar como producto final de la reacción ácido antranílico. Estos autores proponen que el ácido antranílico sigue metabolizándose a productos no identificados, sin embargo no pudieron determinarlo como tampoco las enzimas encargadas de la degradación de la hormona. Otros autores observaron que al adicionar AIA a una mutante de *B. diazoefficiens* USDA110 hiperproductora de AIA, se acumulaba en el medio de cultivo, un compuesto que se correlacionaba con el ácido isatínico y dioxindol, pero al evaluar otra cepa de *Bradyrhizobium* sp. con las mismas características que la anterior, no se observó la acumulación de dichos compuestos. Esto hecho, más la ausencia de la actividad de las enzimas isatina amidohidrolasa e isatina reductasa, hacen suponer que una vía catabólica diferente podría estar operando en bacterias de este género (Jarabo-Lorenzo et al. 1998).

Donati et al. (2013) evaluaron la actividad transcripcional de *B. diazoefficiens* USDA110 posterior a la adición de AIA al medio de cultivo. Observaron un incremento en la expresión de genes relacionados con el estrés (proteínas de shock térmico, frío y proteínas asociadas al mantenimiento de la integridad de la proteína), como también un incremento en la expresión de los genes de biosíntesis de EPS. No pudieron determinar las enzimas responsables de la degradación de AIA, pero proponen dos enzimas como las supuestas responsables del catabolismo de la hormona, la indol piruvato ferredoxina oxidorreductasa y triptófano 2,3-dioxigenasa, ya que fueron inducidas y tendrían un rol en el metabolismo de AIA (van Puyvelde et al., 2011; Egebo et al., 1991); sin embargo, no existen reportes posteriores que confirmen esta hipótesis.

III. 2 METODOLOGÍA

III.2.1 Material Biológico

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

III.2.2 Cuantificación de AIA por espectrofotometría

Se tomaron 1000 μ l del cultivo bacteriano y se colocaron en un tubo plástico de tipo eppendorf de 1,5 ml de capacidad. Se centrifugaron a 10.000 rpm por 10 min y se filtraron (0.2 μ m). Se tomaron 500 μ l del sobrenadante y se mezclaron con 500 μ l del reactivo de Salkowski, el cual consta de 7.9 M de ácido sulfúrico (H_2SO_4) y 12,5 $g.L^{-1}$ de cloruro de hierro ($FeCl_3$), agitando varias veces en forma de inversión y suavemente. Se incubaron por 30 min en completa oscuridad y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 530 nm. Con los datos de absorbancia se obtuvo un promedio de 3 réplicas de la muestra (réplica experimental) y 3 réplicas del tratamiento (réplica biológica) y se realizó el cálculo de concentración por el uso de la ecuación obtenida de una curva patrón adquirido con soluciones entre 0.1-50 mM de AIA puro. La concentración de AIA se expresa en $\mu g.ml^{-1}$.

III.2.3 Identificación y cuantificación de AIA y otras auxinas por HPLC

Para validar las determinaciones por el método colorimétrico se desarrolló el método de HPLC. Para la obtención del sobrenadante se procedió como se explicó anteriormente. El sobrenadante filtrado se inyectó con un volumen final de 20 μ l en una equipo de HPLC Waters 600-MS (Waters Inc.) equipado con inyector U6K con 20 μ l de capacidad, columna C_{18} en fase reversa (Purospher STAR RP C-18 3 μ m, Lichrocart 55-4) y acoplado a un sistema de espectrofotometría con detector UV-VIS Waters 486 (Waters Inc.) ajustado a 265 nm. Las condiciones de la corrida fueron establecidas con una mezcla de etanol: acético: agua (Et-OH/H-Ac/ H_2O) (12:1:87) como solvente de corrida y un flujo de 1 $ml.min^{-1}$ a una temperatura de 30°C. El tiempo de retención para cada compuesto de interés fue previamente identificado mediante el uso de la droga en estado puro (Sigma-Aldrich, Olchemin). Para el caso particular del AIA y en las condiciones establecidas, el tiempo de retención se estableció entre 10.1-10.3 min y la cuantificación se realizó por la integración del pico de área correspondiente al tiempo de retención (RT) con un software integrado (Waters Inc.).

III.2.4 Biosíntesis de AIA por *B. japonicum* E109

Se inoculó un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo EMA (Vincent, 1970) con un pre-cultivo de *B. japonicum* E109. El cultivo se incubó en estufa a 30°C y con una agitación de 180 rpm. Una vez que el cultivo llegó a una DO₅₉₅ aproximadamente de 0.6 se tomaron alícuotas de 5 ml y se colocaron en tubos de ensayo de 10 ml. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental, que se detallan a continuación:

1. Cultivo de E109 (control)
2. Cultivo de E109, con la adición de 10 mg.l⁻¹ de L-Trp

El L-Trp se adicionó al medio de cultivo como precursor para la síntesis de AIA.

Se tomaron muestras a las 24 y 48 h del crecimiento para la determinación de la DO₅₉₅, el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc.ml⁻¹) por el método de microgota, donde las placas se incubaron en posición invertida a 30°C durante 7 días. Como controles de calidad relacionados con la pureza de los cultivos se sembraron placa de Petri conteniendo agar EMA (Vincent, 1970) para observar el desarrollo típico del microorganismo y agar TSA (Tripteína de soja) que inhibe el desarrollo de bradyrhizobios y permite el desarrollo de contaminantes.

III.2.5 Hidrólisis de conjugados de AIA-amidas por *B. japonicum* E109

Se obtuvo un cultivo de E109 como se mencionó antes y se dividió en los siguientes tratamientos para este experimento en particular:

1. Cultivo de E109 (control)
2. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA-fenilalanina
3. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA-leucina
4. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA-alanina

Los tubos se incubaron en agitación, y como parámetros de mayor interés fueron evaluados la DO₅₉₅, ufc.ml⁻¹, producción de exopolisacáridos (EPS). A las 24 y 48 horas se determinó la concentración de AIA (µg.ml⁻¹) por los métodos descritos anteriormente. Para la cuantificación de EPS, a partir de los se tomaron muestras de cada uno de los tubos a las 24 y 48 horas, luego se centrifugaron a 16.000 x g durante 30 min a 4°C. Se filtró el sobrenadante (tamaño de poro, 0.45 µm) y se trató con DNasa I y proteínasa K como se ha descrito previamente (Bergmaier et al., 2001; Read y Costerton, 1987). El EPS precipitó durante la noche con 3 volúmenes de etanol a -20°C. Una segunda precipitación con etanol se llevó a cabo para asegurar la adecuada recuperación de EPS (Chang et al., 2007; Donati et al., 2013). El EPS se secó a temperatura ambiente antes de ser re

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

suspendido en agua des ionizada. El contenido total de hidratos de carbono se midió mediante el método de fenol-ácido sulfúrico (DuBois et al., 1956) con glucosa como estándar.

III.2.6 Conjugación de AIA con aminoácidos por *B. japonicum* E109

A partir de un cultivo de E109 en fase exponencial temprana, se dividieron los tratamientos:

1. Cultivo de E109 (control)
2. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA y L-fenilalanina (L-phe)
3. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA y L-leucina (L-leu)
4. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA y L-alanina (L-ala)

Los tubos se incubaron en agitación, y como parámetros de mayor interés fueron evaluados la DO_{595} , $ufc.ml^{-1}$, EPS. A las 24 y 48 horas se determinó la concentración de AIA ($\mu g.ml^{-1}$) por los métodos descritos anteriormente.

III.2.7 Hidrólisis y catabolismo en diferentes fases de crecimiento por *B. japonicum* E109

Se obtuvo un cultivo de E109, de la manera descrita previamente, y en las diferentes fases de la curva de crecimiento sigmoide (lag, exponencial temprana, exponencial y estacionaria) se tomaron alícuotas en condiciones de esterilidad y se establecieron los siguientes tratamientos:

1. Cultivo de E109 (control)
2. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA
3. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA-phe
4. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA-leu
5. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA-ala

Todos los tratamientos fueron incubados a una temperatura de 30°C, en agitación durante 48 horas y los parámetros evaluados fueron mencionados anteriormente. También se calculó el tiempo de generación en función de la biomasa y se midió la concentración de AIA ($\mu g.ml^{-1}$), a diferentes tiempos de desarrollo de la curva sigmoide (0, 6, 24 y 48 h) por las técnicas descritas.

III.2.8 Catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

III.2.8.1 Catabolismo de AIA y otras auxinas sintéticas y naturales por *B. japonicum* E109

E109 se cultivó como se describió anteriormente. Los cultivos se mantuvieron en agitación hasta llegar a una DO_{595} aproximadamente de 0.5-0.6 correspondiente con la fase exponencial temprana de crecimiento. Con una pipeta estéril se tomaron alícuotas de 5 ml de cultivo y se colocaron de manera individual en tubos de borosilicato previamente esterilizados. Este modelo experimental se

realizó por triplicado y para cada tratamiento. Luego de un período de adaptación de 15 min, se establecieron las siguientes condiciones experimentales:

1. Cultivo de E109
2. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM de AIA
3. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM IBA
4. Cultivo de E109 con la adición de 0.1 mM ANA (ácido acético-1-naftaleno)

Nota: 0.1 mM de equivalen a 17.51 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA.

Los tubos se incubaron en agitación a 180 rpm. Como parámetros de mayor interés fueron evaluados la DO_{595} , $\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$ y la producción de EPS.

III.2.8.2 Catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

Para la evaluación de catabolismo de AIA se trabajó con otra bacteria, además de E109, *B. elkanii* SEMIA 5019. Esta cepa fue seleccionada para este experimento, porque es una bacteria capaz de sintetizar AIA sin presentar un catabolismo activo por ello se utilizó como control positivo del catabolismo. E109 y SEMIA 5019 se cultivaron como se describió. Los cultivos se mantuvieron en agitación hasta llegar a una $\text{DO}_{595}=0.5-0.6$ correspondiente con una fase exponencial temprana de crecimiento. Con una pipeta estéril se tomaron alícuotas de 5 ml de cultivo y se colocaron de manera individual en tubos de borosilicato previamente esterilizados. Este modelo experimental se realizó por triplicado para cada cepa y para cada condición experimental. Luego de un período de adaptación de 15 min, se establecieron dos condiciones para cada cepa:

1. E109/5019 (Control)
2. E109/5019 con la adición de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (p/v) de AIA
3. Medio EMA (control)

En el tratamiento control se adicionó un volumen de agua destilada estéril equivalente, como un control de la dilución. Además, se consideró un control adicional por la adición de la hormona al medio EMA sin inocular (Vincent, 1970) para verificar si los componentes del medio podían intervenir en el catabolismo del AIA. Como parámetros de mayor interés fueron evaluados el crecimiento bacteriano como DO_{595} (antes de la inducción y al final de la incubación) y la concentración de AIA en función del tiempo. Para ello, se tomaron muestras del medio de cultivo cada 2 horas hasta el final del experimento.

III.2.8.3 Catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109

Se obtuvo un cultivo de E109, y luego se procedió a obtener el sobrenadante. Para ello, se colocaron 50 ml del cultivo en un tubo plástico cónico de igual capacidad que se centrifugó a 8000 rpm por 15

min. Se repitió el ciclo de centrifugación para lograr la máxima separación del sobrenadante. De cada tubo plástico, se tomaron en varias oportunidades 5 ml de sobrenadante que fueron transferidos a tubos de vidrio estériles de 10 ml de capacidad por triplicado. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. Sobrenadante de E109 (Control)
2. Sobrenadante de E109 con la adición de 15 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA
3. Sobrenadante desnaturalizado de E109 (Control)
4. Sobrenadante desnaturalizado con la adición de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA

La desnaturalización del sobrenadante se llevó a cabo por la exposición de los tubos a una temperatura de 90°C durante 10 min. Los tubos se incubaron a una temperatura de 30°C y 180 rpm de agitación, y se tomaron muestras periódicas de sobrenadante, cada 2 horas y hasta la finalización del experimento.

III.2.8.4 Cinética de degradación de AIA en *B. japonicum* E109

III.2.8.4.1 Doble inducción con AIA y saturación

B. japonicum E109 se cultivó como se mencionó previamente hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Adicionalmente, se utilizó la cepa de SEMIA 5019. Se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos, como se describió previamente. En este punto, se tomaron alícuotas de 10 ml en tubos estériles de acuerdo a los siguientes tratamientos:

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

*La desnaturalización del sobrenadante se realizó en un baño a 90°C durante 10 min.

Este modelo experimental se realizó por triplicado para cada condición experimental. Luego de la inducción con AIA, los tubos se incubaron como se describió durante 10 horas. Luego de la incubación, para cada tratamiento y de cada tubo se tomó una alícuota de aproximadamente 1.5 ml para medir el crecimiento bacteriano (DO_{595}) y para cuantificar la concentración de AIA, como también se hicieron controles de pureza y recuento de microorganismos. En el caso de los tratamientos con cultivos (1, 2, 5 y 6), los mismos se centrifugaron, se tomaron alícuotas de 5 ml y se colocaron en tubos de ensayo estériles. En este punto, se procedió a realizar la segunda inducción

por adición de una concentración similar de AIA. Los tratamientos se incubaron, en las mismas condiciones experimentales, tomando muestras cada 2 h hasta el final del ensayo para la cuantificación de la concentración de AIA.

III.2.8.4.2 Catabolismo de AIA en diferentes fases de crecimiento

Se evaluó la degradación de la fitohormona en diferentes fases del crecimiento de E109 con el objetivo de ver si existían diferencias en la velocidad de degradación de la hormona como una posible acumulación de enzimas en el medio extracelular de E109.

Para ello, *B. japonicum* E109 se cultivó como se mencionó previamente hasta alcanzar la fase exponencial ($DO_{595}=0,8$) donde se tomaron las muestras para la evaluación. Luego, se llevó el cultivo a agitación en las condiciones descriptas y se dejó crecer hasta llegar a la fase estacionaria ($DO_{595}=1.1$). Una vez obtenidos los cultivos en la fase de crecimiento apropiada, se obtuvieron los sobrenadantes y se realizaron los siguientes tratamientos, considerando dos concentraciones de AIA y tres réplicas por tratamiento:

1. Sobrenadante en fase exponencial con el agregado de $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA
2. Sobrenadante en fase estacionaria con el agregado de $15 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA
3. Sobrenadante en fase exponencial con el agregado de $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA
4. Sobrenadante en fase estacionaria con el agregado de $30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA

Los tubos conteniendo los sobrenadantes inducidos con ambas concentraciones de la hormona y en diferentes estadios de crecimiento se incubaron con una agitación de 180 rpm a 30°C . Se tomaron muestras cada 2 h hasta final del ensayo, donde se evaluó para cada punto la concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) como se describió previamente.

III.2.8.4.3 Catabolismo de AIA en concentraciones crecientes de AIA

Para conocer aún más la degradación de la hormona por parte de E109, probamos el catabolismo con concentraciones crecientes de AIA para establecer si la bacteria posee una saturación.

Para ello, se obtuvo un cultivo de E109 en fase estacionaria ($DO_{595}=1.2$) y se fracciono 5 ml de cultivo en tubos de boro silicato estériles 10 ml de capacidad (por triplicado), según los siguientes tratamientos:

1. E109 (Control)
2. E109 con la adición de 0.25 mM de AIA
3. E109 con la adición de 0.5 mM de AIA
4. E109 con la adición de 1 mM de AIA
5. E109 con la adición de 2 mM de AIA

6. E109 con la adición de 5 mM de AIA

Inmediatamente luego de la inducción se tomó una muestra a la cual se cuantificó la concentración de AIA considerada como muestra a tiempo cero (T_0) del experimento y luego se tomaron muestras a las 8, 12 horas y luego cada 24 h hasta el final del experimento. Los tubos incubaron en estufa a 30°C en agitación, como se describió.

III.2.8.5 Efecto de AIA exógeno sobre la fisiología de *B. japonicum* E109 y su efecto sobre su capacidad de establecer simbiosis con semillas de soja

III.2.8.5.1 Efecto del AIA exógeno sobre la fisiología de *B. japonicum* E109

Para este experimento, se obtuvieron un cultivo de E109 en fase exponencial ($DO_{595}=0.8$), como se indicó. Luego se dividió el cultivo en los siguientes tratamientos:

1. E109 (Control)
2. E109 con la adición de 0.1 mM de AIA (aproximadamente 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)

Para comprender el efecto de la presencia de AIA exógeno en cultivos puros de *B. japonicum* E109 a nivel de su comportamiento fisiológico y su interacción simbiótica con soja, fueron evaluados como parámetros de interés: (1) crecimiento bacteriano ($\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$); (2) producción de biomasa (DO_{595}); (3) producción de EPS.

III.2.8.5.2 Recuperación de *B. japonicum* E109 en semillas de soja

A partir de las semillas inoculadas con los cultivos de E109 control y E109 con la adición de AIA que se describió en el ítem anterior, se llevó a cabo una recuperación de microorganismos en las semillas. Brevemente las semillas de soja se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 h; 1, 2, 3, 4, 5 y 6 días hasta la evaluación. En cada tiempo seleccionado, se realizó un recuento de bacterias usando un sub-muestra de 100 semillas que se colocaron en un matraz de 250 ml con 100 ml de solución salina estéril y se colocó en un agitador magnético a 450 a 500 rpm durante 15 minutos. Inmediatamente, se hicieron diluciones decimales en tubos de 20 ml con 9 ml de solución salina hasta 10^{-4} . Finalmente, se inoculó 0.1 ml de cada dilución por triplicado en placas de EMA con 0.2 $\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ PCNB (Pentacloronitrobenzeno) y 1.0 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ vancomicina, de acuerdo a (Penna et al., 2011). Las placas se incubaron en posición invertida a 30°C durante 7 días. Se realizaron tratamientos de control para descartar el posible recuento de población de rizobios pre-existentes en las semillas de soja. Los resultados se expresaron como $\text{ufc}\cdot\text{semilla}^{-1}$.

III.2.8.5.3 Evaluación del establecimiento de la simbiosis *B. japonicum* E109-soja

De acuerdo al procedimiento anterior, 1000 gramos de semilla de soja (cv. Don Mario) fueron inoculadas y se sembraron en macetas plásticas de 1 litro de capacidad que contenían vermiculita como sustrato. Diez plántulas de soja crecieron y se regaron con solución de Hoagland estéril deficiente en N (25% v/v) (Hoagland y Broyer, 1936) proporcionada por riego capilar. Las plántulas se mantuvieron durante 21 días en cámara de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h de luz (30°C)/8 h de oscuridad (20°C) con 80% de humedad relativa. Luego se midieron los siguientes parámetros como indicadores de la promoción del crecimiento vegetal (Albanesi et al., 2013): (a) nódulos de la raíz principal (b) nódulos de la raíz secundaria (c) número de nódulos totales (d) peso seco de la raíz y parte aérea, (d) porcentaje de plantas noduladas con tres o más nódulos en la raíz principal (Burton et al., 1972).

III.2.8.6 Perfil de metabolitos y catabolitos en *B. japonicum* E109

III.2.8.6.1 Perfil de metabolitos de AIA en cultivos de *B. japonicum* E109

Este ensayo se realizó con el objetivo de conocer algunos de los metabolitos generados durante el crecimiento de E109 en medio de cultivo. Esta evaluación fue posible gracias a la colaboración de con el grupo del Prof. Dr. Miroslav Strnd del Laboratorio de Reguladores del Crecimiento en República Checa.

Para la obtención del perfil metabolómico de E109 se utilizó una metodología que permite la detección de precursores de AIA conocidos y productos de degradación en simultáneo con cantidades pequeñas de cultivos. El método combina un método de purificación de una etapa de extracción en fase sólida (SPE) con el análisis sensible y selectivo de cromatografía líquida-monitoreo de múltiples reacciones-espectrometría de masas (LC-MRM-MS) (Novák et al., 2012). Brevemente, se obtuvo un cultivo de E109 y SEMIA 5019 en la fase exponencial ($DO_{595}= 0,8-1,0$, respectivamente). Se tomaron 750 μ l de cada cultivo y se inoculó en un frasco de vidrio (250 ml) con 150 ml de medio EMA (Vincent, 1970) o medio EMA más la adición de L-Trp, de acuerdo con los siguientes tratamientos:

1. *B. japonicum* E109 (EMA)
2. *B. japonicum* E109 (EMA con L-Trp)
3. *B. elkanii* SEMIA 5019 (EMA)
4. *B. elkanii* SEMIA 5019 (EMA con L-Trp)

Las bacterias crecieron hasta alcanzar la fase estacionaria tardía de cultivo ($DO_{595}=1.4$ hasta 1.6, para E109 y 5019 respectivamente). Por último, se tomaron muestras de cada uno de los tratamientos, se centrifugaron y se filtró el sobrenadante para obtener muestras limpias con el fin de

identificar y cuantificar todos los metabolitos del grupo de las auxinas. La muestra original se dividió en 3 sub-muestras con un volumen equivalente. Para la cuantificación de AIA y sus metabolitos, se tomaron 20 μl de cada sobrenadante. Para validar la cuantificación de metabolitos endógenos de auxinas, se añadieron los siguientes estándares internos marcados con isótopos estables como trazas: [$^{13}\text{C}_6$]-AIAsp, [$^{13}\text{C}_6$]-IAGlu (5 pmol por muestra), [$^{13}\text{C}_6$]-ANT, [$^{13}\text{C}_6$]-AIA, [$^{13}\text{C}_6$]-IAM, [$^2\text{H}_4$]-IPyA, [$^{13}\text{C}_6$]-oxAIA (10 pmol por muestra), [$^{13}\text{C}_6$]-IAN y [$^2\text{H}_5$]-Trp (100 pmol por muestra). Los sobrenadantes se incubaron a 4°C con agitación continua (15 min), se centrifugaron (15 min, 23 000 g a 4°C), y luego fueron divididos en dos muestras. En una muestra, el pH se ajustó a 2,7 con HCl 1 M, y la muestra se purificó por extracción en fase sólida utilizando columnas OasisTM de HLB (1/30 ml.mg⁻¹, Waters, <http://www.waters.com>) condicionado con 1 ml de metanol puro y 1 ml de agua destilada, y se equilibró con 0.5 ml de buffer fosfato de sodio (se acidificó con HCl 1 M a pH 2.7). Después de la inyección de la muestra, la columna se lavó con 2 ml al 5% (v/v) de metanol y se eluyó con 2 ml al 80% de metanol (v/v). El eluido se evaporó hasta sequedad a vacío y se almacenó a -20°C hasta el análisis LC/MS. La segunda mitad del sobrenadante (aproximadamente 0.5 ml) se derivó usando cisteamina para convertir los metabolitos lábiles, AIAld y IPyA a los derivados de tiazolidina AIAld-TAZ y IPyA-TAZ. Tres mililitros de una solución 0,25 M de cisteamina (ajustado con NH₃ a pH 8,0) se añadió a cada extracto. Las muestras se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente y se purificó como se describió anteriormente.

III.2.8.6.2 Perfil del catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109

Este ensayo se realizó con el objetivo de conocer algunos de los metabolitos generados durante el catabolismo de AIA en E109 en medio de cultivo. Esta evaluación también fue posible gracias a la colaboración del Prof. Dr. Miroslav Strnd del laboratorio de reguladores de crecimiento de la Facultad de Ciencias, perteneciente a la Universidad de Palacký y el Instituto de Botánica Experimental de la Academia de Ciencias de la República Checa.

Para ello, se obtuvieron cultivos puros de E109 y 5019 en fase exponencial ($\text{DO}_{595}=0.5-0.6$). Los cultivos se dividieron en dos muestras de 50 ml usando frascos de vidrio estériles. A una de las muestras, luego de un periodo de adaptación de 30 minutos, se le adicionó 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. A la otra muestra se adicionó el mismo volumen de agua destilada estéril como control. Los tratamientos se incubaron en las condiciones mencionadas previamente. Posteriormente, se tomaron muestras de 25 ml luego de 4 y 8 h de incubación. Las mismas se centrifugaron y se filtraron para obtener sobrenadantes clarificados con el fin de identificar y cuantificar los metabolitos de AIA y auxinas

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina (incluyendo catabolitos) por el análisis LC-MRM-MS análisis (Novák et al., 2012), como se mencionó en el ítem anterior.

III.2.9 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se realizaron a través del software *InfoStat*, versión 2008, Grupo InfoStat. (Di Rienzo et al. 2008). Los análisis estadísticos realizados fue análisis de varianza (ANOVA), el test de comparación Tukey con un $p \leq 0,05$.

III.3 RESULTADOS

III.3.1 Biosíntesis de AIA por *B. japonicum* E109

El análisis funcional del genoma realizado de la vía metabólica para la síntesis de AIA a través de KEGG (**Figura 30** del capítulo II) muestra que posee secuencias codificantes de al menos una de las vías de síntesis de AIA, la vía IAM. Evaluamos el crecimiento de E109 y medimos la producción de AIA en medio EMA con la adición de L-Trp.

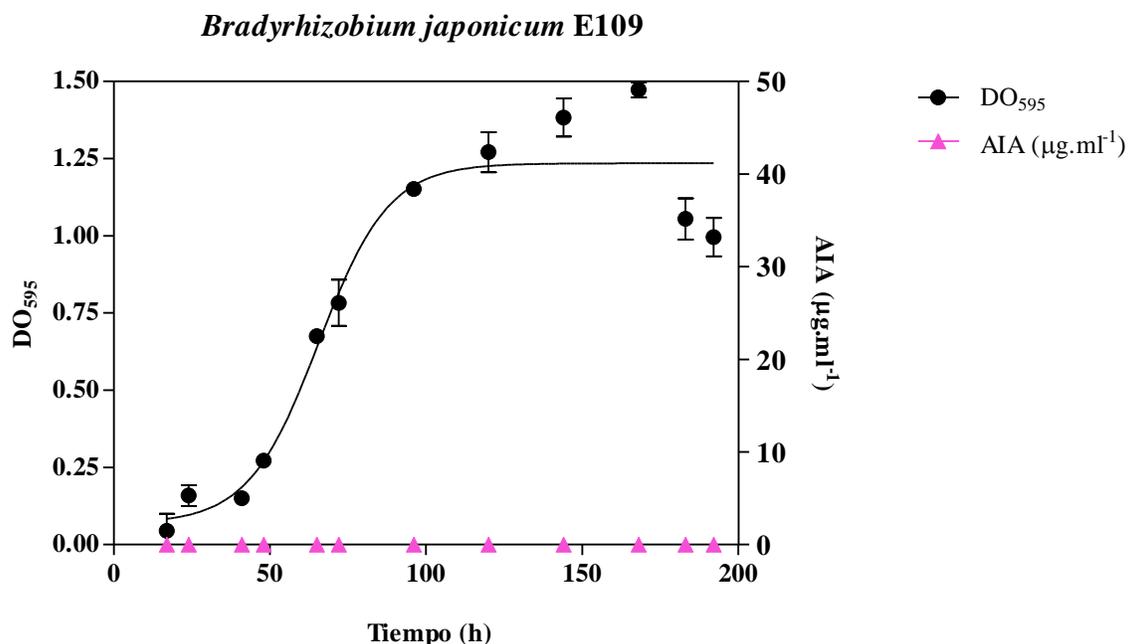


Figura 34. Crecimiento (DO₅₉₅) de *B. japonicum* E109 y síntesis de AIA, expresada como µg.ml⁻¹ en función del tiempo.

En la **Figura 34** se observa el crecimiento de E109 y la síntesis de AIA. Podemos ver que en ninguno de los tiempos evaluados se observa concentraciones significativas de la fitohormona. Estos resultados han sido contradictorios, lo que inicialmente podría atribuirse a que E109 no posee la capacidad de sintetizar AIA.

La **Tabla 10** detalla los resultados del mismo ensayo para E109 para el tratamiento control y el tratamiento con la variante de la adición del precursor L-Trp al medio de cultivo.

Tabla 9. Valores de la producción de biomasa (DO_{595}), número de células ($ufc.ml^{-1}$) y la concentración de AIA ($\mu g.ml^{-1}$) por E109 en medios EMA o EMA modificados por la adición de L-Trp. Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

| Cultivo de E109 | Medio EMA sin L-Trp | | Medio EMA con L-Trp | | |
|---|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | Tiempo 0 | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| Producción de Biomasa. DO_{595} | 0.613±0.01 | 1.445±0.010 ^a | 1.873±0.016 ^b | 1.453±0.018 ^a | 1.854±0.036 ^b |
| Número de células. $ufc.ml^{-1}$ | 8.34x10 ⁷ | 5.21x10 ⁸ | 1.31x10 ⁹ | 5.42x10 ⁸ | 1.23x10 ⁹ |
| Concentración de AIA. $\mu g.ml^{-1}$ | S/D | S/D | S/D | S/D | S/D |

Los tratamientos muestran que no hay diferencias significativas entre la utilización de ambos medios de cultivo con o sin la adición del precursor L-triptófano, tanto a nivel de los parámetros de crecimiento, como en el número de células. En ningún caso se pudo detectar la hormona en el medio de cultivo, aun cuando se adicionó el precursor para su síntesis. Según la literatura, *Bradyrhizobium* tiene la capacidad de producir AIA en medio de cultivo (Hunter, 1989; Hutzinger y Kosuge, 1968), Además de que algunas cepas pueden sintetizar esta auxina, también son capaces de catabolizar AIA. Jensen et al. (1995) observó el catabolismo de AIA en cepas de *B. japonicum*, es decir a pesar de que la bacteria posea genéticamente la capacidad de producir este compuesto, cuando lo hace, inmediatamente es catabolizado en el medio de cultivo.

III.3.2 Hidrólisis de conjugados de AIA-amidas por *B. japonicum* E109

Además de la síntesis de AIA en medio de cultivo por E109, evaluamos si esta bacteria es capaz de conjugar AIA con amidas, tales como fenilalanina, leucina y alanina.

Tabla 10. Producción de biomasa (DO_{595}), viabilidad ($ufc.ml^{-1}$) y producción de EPS ($\mu g.ml^{-1}$) por E109 en los medios de EMA o EMA modificados por la adición de amidas de AIA (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial de crecimiento (DO_{595} aprox. 0,6). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

| E109 | Medio EMA | | Medio EMA AIA-Phe | | Medio EMA AIA-leu | | Medio EMA AIA-ala | |
|---------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| DO_{595} | 1.44±0.01 ^a | 1.85±0.06 ^c | 1.56±0.01 ^b | 2.07±0.01 ^d | 1.57±0.03 ^b | 2.09±0.00 ^d | 1.58±0.03 ^b | 2.08±0.01 ^d |
| $ufc.ml^{-1}$ | 5.21x10 ⁸ | 1.23x10 ⁹ | 5.44 x10 ⁸ | 1.12 x10 ⁹ | 5.19 x10 ⁸ | 1.17 x10 ⁹ | 5.27 x10 ⁸ | 1.19 x10 ⁹ |
| $EPS \mu g.ml^{-1}$ | 2.38±0.13 ^a | 4.17±0.39 ^b | 7.13±0.76 ^c | 12.13±0.96 ^d | 6.47 ± 0.26 ^c | 10.47± 0.96 ^d | 7.47±0.84 ^c | 11.47±0.47 ^d |

*Se utilizó el mismo tratamiento de medio EMA como control de los experimentos de catabolismo, hidrólisis y conjugación.

La producción de biomasa en los cultivos de E109 modificados por la adición de amidas de AIA, mostraron un aumento significativo respecto del control a las 24 y 48 horas. Para el caso de recuento de microorganismos, no hubo diferencias significativas con respecto al control sin la adición exógena de conjugados. La producción de EPS se vio modificada en los tres tratamientos, a las 24 h hubo mayor cantidad cuantificada en el caso del tratamiento con AIA-ala, mientras que a las 48 h la adición de AIA-phe produjo cuatro veces más que el tratamiento control.

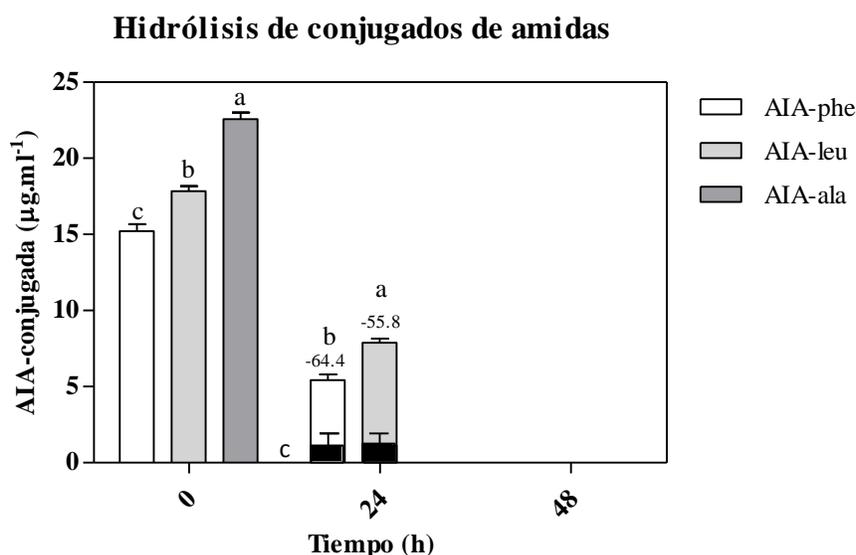


Figura 35. Concentración de conjugados AIA-amida ($\mu g.ml^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en medio EMA modificados por la adición de 0.1 mM AIA-phe, AIA-leu o AIA-ala durante la fase de crecimiento exponencial ($DO_{595}=0,613$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las

barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T₀) Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05. Barras negras representan la concentración de AIA (µg.ml⁻¹) en los sobrenadantes.

Como se observa en la **Figura 35** el tratamiento más exitoso fue aquel con adición de AIA-ala porque a las 24 horas se hidrolizó por completo el conjugado, pero no se detectaron cantidades significativas de AIA libre, indicando que cuando se hidroliza el conjugado y el AIA queda libre rápidamente se cataboliza y no se puede cuantificar. Para el caso de la adición de AIA-leu existió una hidrólisis de un 60% a las 24 horas y a las 48 horas ya no se detectó el compuesto en el medio de cultivo, pero en este caso y al igual que por la adición de AIA-leu, la molécula de AIA fue detectada a las 24 horas desde la inducción. En resumen, en las condiciones evaluadas, E109 puede hidrolizar los conjugados de AIA (AIA-amidas) y degradar el AIA libre.

III.3.3 Conjugación de AIA con aminoácidos por *B. japonicum* E109

La **Tabla 11**, resume los tratamientos y parámetros considerados para la evaluación de la capacidad de *B. japonicum* E109 para conjugar AIA con los aminoácidos L-phe, L-leu y L-ala.

Tabla 11. Producción de biomasa (DO₅₉₅), viabilidad (ufc.ml⁻¹) y producción de EPS (µg.ml⁻¹) por E109 en medio EMA y EMA modificado por la adición de AIA y aminoácidos (L-phe, L-leu y L-ala) durante la fase de crecimiento exponencial (DO₅₉₅ aprox. 0,6) después de 24 y 48 horas de incubación. Diferentes letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p <0,05.

| E109 | Medio EMA | | EMA con AIA y L-phe | | EMA con AIA y L-leu | | AIA y L-ala | |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| DO ₅₉₅ | 1.45±0.01 ^a | 1.84±0.06 ^c | 1.52±0.02 ^b | 1.99±0.01 ^d | 1.53±0.01 ^b | 1.98±0.01 ^d | 1.52±0.04 ^d | 1.98±0.02 ^d |
| ufc.ml ⁻¹ | 5.21x10 ⁸ | 1.23x10 ⁹ | 5.66 x10 ⁸ | 1.30 x10 ⁹ | 5.37 x10 ⁸ | 1.27 x10 ⁹ | 5.20 x10 ⁸ | 1.19 x10 ⁹ |
| EPS. µg.ml ⁻¹ | 2.38±0.13 ^a | 4.17±0.39 ^b | 5.88±0.41 ^c | 10.04±0.37 ^d | 5.71±0.24 ^c | 9.99±0.78 ^d | 6.01±0.51 ^c | 9.78±0.51 ^d |
| AIA. µg.ml ⁻¹ | S/D | | S/D | | S/D | | S/D | |

S/D: no se identificó AIA ni conjugados de AIA con aminoácidos.

*Se utilizó el mismo tratamiento de medio EMA como control de los experimentos de catabolismo, hidrólisis y conjugación.

En cuanto a la biomasa y la producción de EPS, en los tres tratamientos hubo un aumento con diferencias significativas sobre este parámetro asociado a la adición de AIA exógeno al medio de cultivo, y en el recuento de microorganismos se identificó que el tratamiento AIA con L-ala

disminuyó con respecto a los demás tratamientos. En cuanto a la concentración de AIA, no se pudo identificar ni el metabolito de manera libre ni conjugado con aminoácidos, percibiendo que E109 ha catabolizado este compuesto y que no posee capacidad de formar conjugados con los aminoácidos adicionados en el medio de cultivo.

III.3.4 Hidrólisis y catabolismo en diferentes fases de crecimiento por *B. japonicum* E109

III.3.4.1 Fase Lag de crecimiento de E109

A continuación, en la **Tabla 12** se resumen los valores obtenidos para el ensayo de catabolismo e hidrólisis de auxinas en fase lag de un cultivo de E109.

Tabla 12. Producción de biomasa (DO_{595}), viabilidad ($ufc.ml^{-1}$) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO_{595}) de E109 en medios de EMA o EMA modificados mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amidas (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase lag de crecimiento.

| Cultivo de E109 | EMA | EMA + AIA | EMA + AIA-phe | EMA + AIA-leu | EMA + AIA-ala |
|----------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| DO_{595} | 0.631±0.043 ^a | 0.642±0.021 ^a | 0.653±0.037 ^a | 0.655±0.023 ^a | 0.654±0.041 ^a |
| $ufc.ml^{-1}$ | 9.94×10 ⁷ | 1.05 ×10 ⁸ | 1.07 ×10 ⁸ | 9.98 ×10 ⁷ | 1.07 ×10 ⁸ |
| Tiempo de generación | 14.91 | 15.12 +0.21 h | 14.94 +0.03 h | 15.01 +0.10 h | 14.97 +0.06 h |

Distintas letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

Los parámetros evaluados para el catabolismo e hidrólisis de conjugados de AIA con aminoácidos (AIA-amidas) durante la fase lag crecimiento de E109, no fueron marcadamente diferentes del control sin adición de AIA. Luego de 48 horas de incubación, los cultivos con los conjugados no mostraron diferencias significativas en la producción de biomasa, y el tiempo de duplicación fue levemente mayor para los tres tratamientos, con respecto al control. En cuanto al recuento, hubo un pequeño aumento en el número de células viables, pero el tratamiento de AIA-leu fue el más similar con respecto al control.

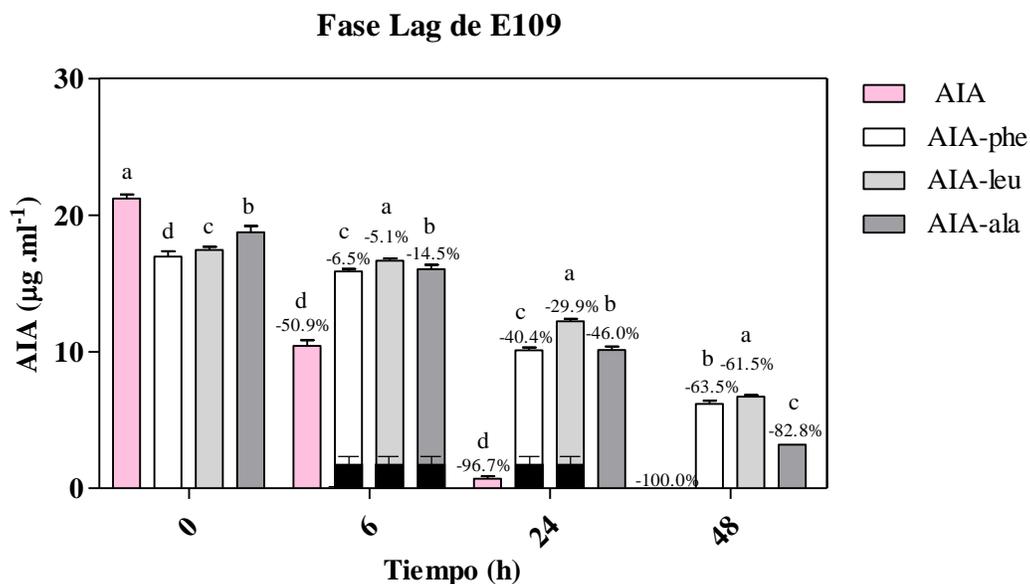


Figura 36. Concentración de auxinas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase de crecimiento lag ($\text{DO}_{595} = 0,075$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA libre ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en los sobrenadantes.

En referencia al catabolismo, el tratamiento con adición exógena de AIA, luego de 6 h de incubación degradó cerca de un 50% del contenido de AIA presente en el medio; mientras que a las 24 h desde la exposición quedaron vestigios de la hormona y luego de 48 h hubo una completa desaparición. En estos tratamientos, además, hay una hidrólisis lenta y variable. El tratamiento de AIA-ala es el que degrada a mayor velocidad, comparados con los otros tres tratamientos, y se pudo cuantificar AIA libre luego de 24 horas de incubación. Este comportamiento es acorde al experimento de hidrólisis de E109.

III.3.4.2 Fase Exponencial temprana de crecimiento de E109

A continuación, en la **Tabla 13** se resumen los valores obtenidos para en ensayo de catabolismo e hidrólisis de auxinas en fase exponencial temprana de un cultivo de E109, momento en el que las células se encuentran en plena división celular y con una progresión exponencial.

Tabla 13. Producción de biomasa (DO_{595}), viabilidad ($ufc.ml^{-1}$) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO_{595}) de E109 en medios de EMA o EMA modificado mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial temprana. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

| Cultivo de E109 | Medio EMA | EMA con AIA | EMA con AIA-phe | EMA con AIA-leu | EMA con AIA-ala |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| DO₅₉₅ | 1.641±0.030 ^a | 1.784±0.011 ^b + 8.71 % | 1.764±0.014 ^b + 7.49 % | 1.795±0.023 ^b + 9.38 % | 1.786±0.037 ^b + 8.83 % |
| ufc.ml⁻¹ | 9.98x10 ⁸ | 1.05 x10 ⁹ | 1.07 x10 ⁹ | 1.10 x10 ⁹ | 1.06 x10 ⁹ |
| Tiempo de generación | 30.42 | 28.74 -1.68 h | 28.63 -1.79 h | 28.09 -2.33 h | 28.73 -1,69 h |

Como se observa en la **Tabla 13**, la producción de biomasa y el recuento de células, aumentaron en los cuatro tratamientos con adición de auxinas comparados con el control. Esto es lógico, suponiendo que las células están comenzando a dividirse y a duplicar su número en esta fase de la curva de crecimiento. El tiempo de generación, en los cuatro tratamientos se vio disminuido entre 1-2 horas por la adición de AIA o AIA-amidas y esto hace suponer que el agregado de exógeno de cualquiera de estos componentes disminuye el tiempo de generación por lo que acelera la velocidad de crecimiento, aunque de manera complementaria, no se vio afectada la producción de biomasa ni el recuento de bacterias.

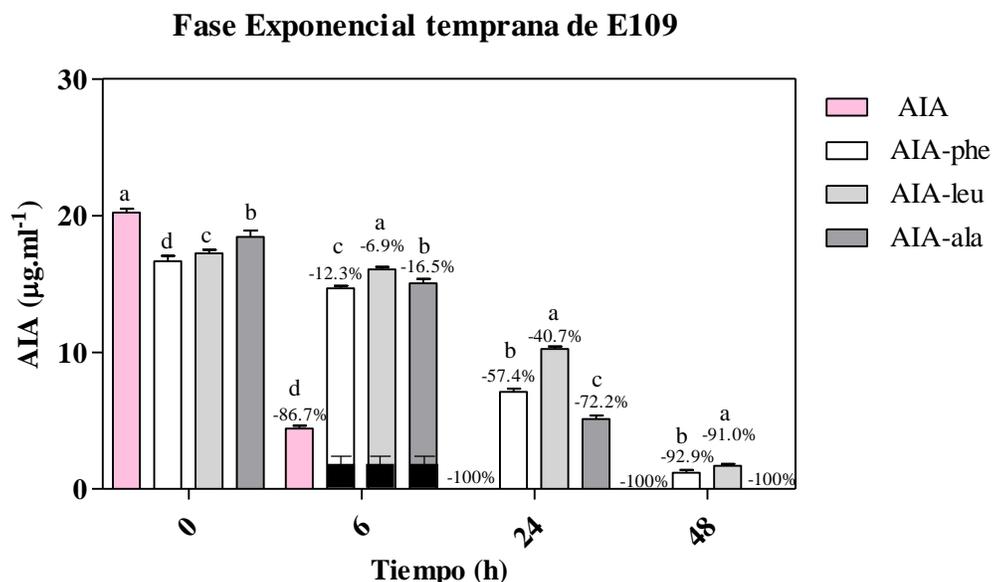


Figura 37. Concentración de auxinas ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en el medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial temprana ($\text{DO}_{595} = 0.475$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA libre ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en los sobrenadantes.

Como se observa en la **Figura 37**, durante la fase exponencial temprana de crecimiento, la bacteria degrada el 86% del AIA a las 6 h desde la inducción y a las 24 h ya no hay rastros del compuesto en el medio de cultivo. Para los tratamientos con adición de AIA-phe y AIA-leu, ocurrió un fenómeno similar, donde a las 6 h desde la inducción se hidrolizó solo una fracción de los conjugados pudiéndose cuantificar (barras negras) concentraciones similares de AIA libre, pero que luego de 24 h fue hidrolizado completamente. Al mismo tiempo, la cantidad de conjugados disminuyó significativamente entre un 40 y un 70 % y a las 48 h solo quedaban restos de tales compuestos. El tratamiento con AIA-ala, se diferenció de los demás tratamientos ya que a las 48 horas no se detectó ni AIA ni conjugados, con un comportamiento similar al AIA libre. Con estos resultados, podemos decir que en estas condiciones experimentales, la bacteria es capaz de hidrolizar los conjugados de AIA-amidas y catabolizar el AIA libre a menor velocidad, comparados con el ensayo de hidrólisis previo.

III.3.4.3 Fase Exponencial de crecimiento de E109

En la fase exponencial propiamente dicha, el tiempo de duplicación es mayor ya que ocurre la síntesis ADN y ARN para proteínas y enzimas. A continuación, en la **Tabla 14** se resumen los resultados de hidrólisis y catabolismo.

Tabla 14. Producción de biomasa (DO_{595}), viabilidad ($ufc.ml^{-1}$) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO_{595}) de E109 en medios de EMA o EMA modificado mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

| Cultivo de E109 | Medio EMA | EMA con AIA | EMA con AIA-phe | EMA con AIA-leu | EMA con AIA-ala |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| DO₅₉₅ | 1.981±0.028 ^a | 2.071±0.047 ^b + 4.49 | 2.094±0.047 ^b + 5.70 | 2.096±0.023 ^b + 5.80 | 2.081±0.044 ^b + 5.04 |
| ufc.ml⁻¹ | 4.91x10 ⁹ | 5.03 x10 ⁹ | 5.11 x10 ⁹ | 5.14 x10 ⁹ | 5.07 x10 ⁹ |
| Tiempo de generación | 58.21 | 55.39 -2.82 h | 53.62 -4.59 h | 52.62 -5.59 h | 54.92 -3.29 h |

Como se observa en la **Tabla 14**, cuando adicionamos AIA y AIA-amidas el comportamiento de la bacteria fue similar para los cuatro tratamientos en los que aumentó la biomasa y el recuento de microorganismo; mientras que el tiempo de generación disminuyó entre 3 y 5 horas con respecto al tiempo control sin inducción.

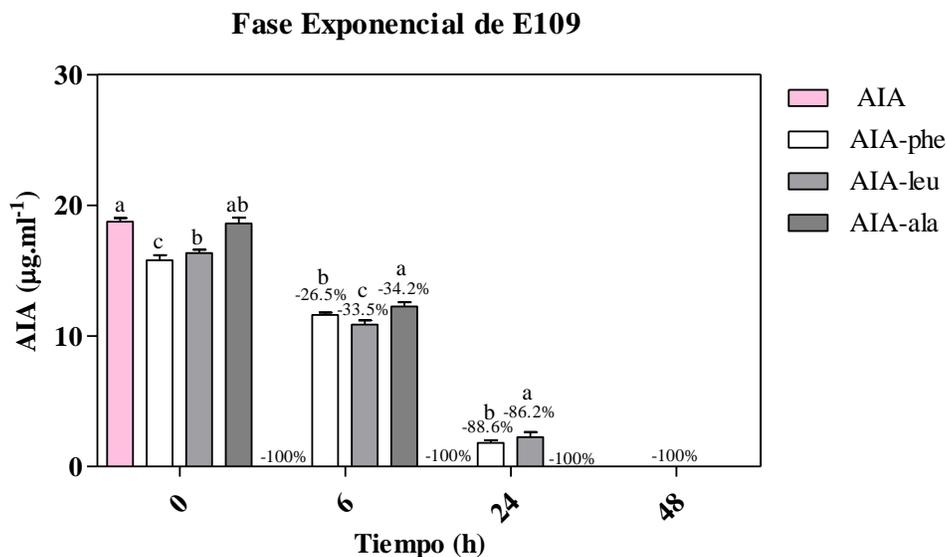


Figura 38. Concentración de auxinas ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en el medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase exponencial ($\text{DO}_{595}=1.025$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en los sobrenadantes.

Como se observa en la **Figura 38**, la bacteria degrada el AIA luego de 6 h desde la inducción en plena fase exponencial. En cuanto a AIA-phe y AIA-leu, la bacteria es capaz de hidrolizarlos por completo luego de 48 h de post-inducción, mientras que a medida se hidroliza el conjugado se va catabolizando el AIA por lo que no se detecta en ningún momento a lo largo de la curva. En el caso del AIA-ala se hidroliza en su totalidad a las 24 h y no se detecta AIA libre. Así, en fase exponencial podemos decir que la bacteria es capaz de hidrolizar los conjugados de AIA-amidas y catabolizar el AIA libre a mayor velocidad que en fases más tempranas del cultivo.

III.3.4.4 Fase Estacionaria de crecimiento de E109

Un cultivo no se puede prolongar de manera indefinida, los nutrientes comienzan a agotarse o se acumulan desechos tóxicos que hacen que cese el crecimiento exponencial de la bacteria y así, un cultivo llega a la fase estacionaria. A continuación, en la **Tabla 15**, se presentan los resultados del ensayo.

Tabla 15. Producción de biomasa (DO_{595}), viabilidad ($ufc.ml^{-1}$) y el tiempo de generación en función de la biomasa (DO_{595}) de E109 en medios de EMA o EMA modificado mediante la adición de AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu y AIA-ala) durante la fase estacionaria de crecimiento. Las distintas letras representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

| Cultivo de E109 | Medio EMA | EMA con AIA | EMA con AIA-phe | EMA con AIA-leu | EMA con AIA-ala |
|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| DO₅₉₅ | 2.084±0.031 ^a | 2.078±0.036 ^a | 2.074±0.054 ^a | 2.081±0.018 ^a | 2.093±0.047 ^a |
| ufc.ml⁻¹ | 5.21 x10 ⁹ | 5.18 x10 ⁹ | 5.21 x10 ⁹ | 5.19 x10 ⁹ | 5.20 x10 ⁹ |
| Tiempo de generación | 63.23 | 64.11 +0.88 h | 64.03 +0.80 h | 63.21 -0.02 | 62.99 -0.24 |

En la fase estacionaria, E109 no muestra diferencia significativa sobre la producción de biomasa y el número de viables ($ufc.ml^{-1}$) por la adición de AIA o AIA-amidas. El tiempo de generación disminuyó pero de manera no significativa por la adición de AIA-leu y AIA-ala e incrementó de la misma manera por adición de AIA y AIA-phe. Como comportamiento generalizado, los cultivos de E109 modificados por la adición de estos componentes no presentaron modificaciones significativas de los parámetros evaluados.

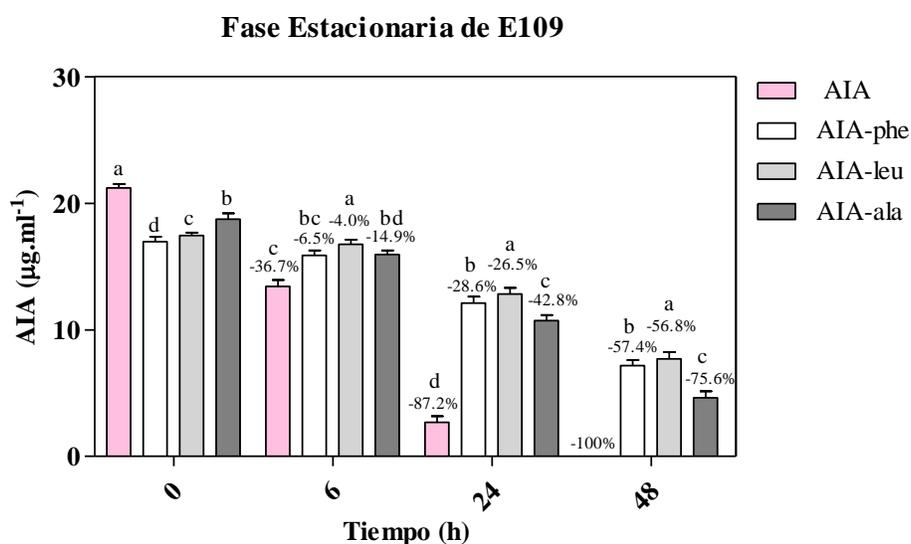


Figura 39. Concentración de auxinas ($\mu g.ml^{-1}$) en sobrenadantes de E109 obtenidos en el medio EMA modificado mediante la adición de 0.1 mM AIA o conjugados AIA-amida (AIA-phe, AIA-leu

y AIA-ala) durante la fase estacionaria ($DO_{595}=1.728$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Las barras negras representan la concentración de AIA libre ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes.

Así, como lo muestra la **Figura 39**, durante la fase estacionaria de crecimiento el único compuesto que se hidrolizó y catabolizó por completo fue el AIA, después de 48 horas de incubación. En el caso de los tratamientos con adición exógena de AIA-amidas, los mismos mostraron una hidrólisis lenta de tales compuestos, ya que al tiempo final del experimento todavía se identificaron conjugados de AIA en concentraciones mayores a las encontradas en las otras fases del crecimiento; sin embargo, el catabolismo de AIA derivado de la hidrólisis siempre se mantuvo activo degradando todo el AIA libre ya que no fue posible identificar a esta molécula en ninguno de los tratamientos evaluados.

III.3.5 Catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

III.3.5.1 Catabolismo de AIA y otras auxinas sintéticas y naturales por *B. japonicum* E109

Los experimentos presentados anteriormente nos daban idea de que la cepa E109 es capaz de catabolizar AIA en pocas horas luego de la inducción. En este ensayo evaluamos el comportamiento de la bacteria en el caso de la adición de diferentes tipos de auxinas, tanto naturales como sintéticas.

Tabla 16. Producción de biomasa (DO_{595}), número de células ($\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$) y producción de EPS ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de E109 en los medios de EMA o EMA modificado por adición de auxinas exógenas (AIA, IBA y ANA) durante la fase exponencial de crecimiento (DO_{595} aprox. 0, 6). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

| E109 | Medio EMA | | Medio EMA con AIA | | Medio EMA con IBA | | Medio EMA con ANA | |
|--|------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|------------------------|--------------------------|
| | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas | 24 horas | 48 horas |
| DO_{595} | 1.44±0.01 ^a | 1.85±0.006 ^c | 1.51±0.01 ^b | 1.98±0.02 ^d | 1.42±0.01 ^a | 1.84±0.02 ^c | 1.44±0.01 ^a | 1.84±0.03 ^c |
| $\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 5.21x10 ⁸ | 1.23x10 ⁹ | 5.78x10 ⁸ | 1.45x10 ⁹ | 5.39x10 ⁸ | 1.61x10 ⁹ | 5.09x10 ⁸ | 1.54x10 ⁹ |
| EPS. $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ | 2.38±0.13 ^a | 4.17±0.39 ^b | 6.54±0.24 ^c | 10.43±0.61 ^d | 2.47 ± 0.16 ^a | 5.02±0.95 ^b | 2.71±0.54 ^a | 4.81 ± 0.42 ^b |

*Se utilizó el mismo tratamiento de medio EMA como control de los experimentos de catabolismo, hidrólisis y conjugación.

En relación a los parámetros evaluados para el catabolismo de auxinas naturales y sintéticas por *B. japonicum* E109, podemos deducir que la producción de biomasa fue significativamente mayor en

el tratamiento con la adición de la auxina natural (AIA) a las 24 y 48 h desde la inducción; mientras que para los tratamientos con IBA y ANA no hubo diferencias significativas respecto al control sin inducir. Para el caso de número de viables (ufc.ml^{-1}) los tres tratamientos tuvieron recuentos similares respecto del control a las 24 h, mientras que a las 48 h se determinó un incremento el caso de los recuentos con adición de auxinas. El contenido de EPS, fue duplicado por la adición de AIA a las 24 y 48 h, respecto al control o a los tratamientos con adición de IBA o ANA que no se diferenciaron entre sí. Estos resultados indicarían que la adición de AIA a cultivos puros de E109, incrementa la producción de biomasa y contenido de EPS; mientras que por la adición de las auxinas sintéticas IBA y ANA los cultivos con esta cepa tienen con comportamiento similar al control.

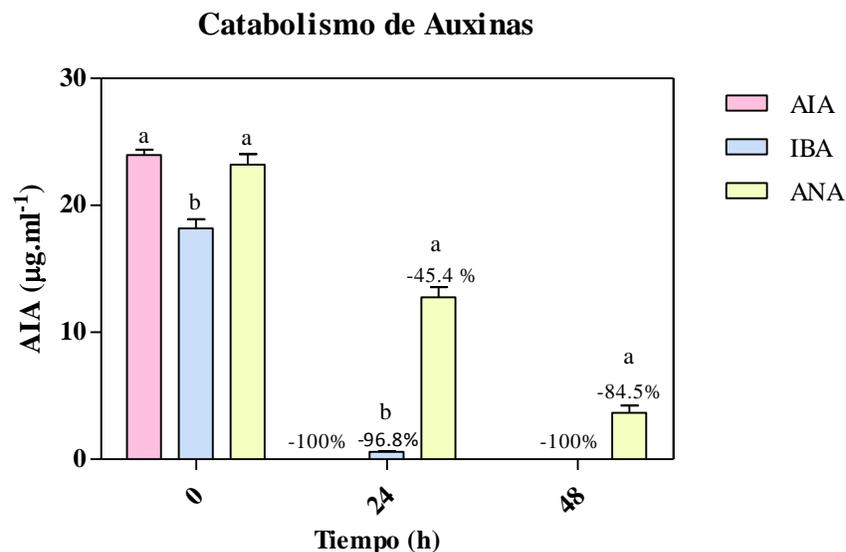


Figura 40. Concentración de auxinas en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 en medio EMA modificados por la adición de auxinas exógenas (AIA, IBA o ANA) en fase de crecimiento exponencial ($\text{DO}_{595}=0,613$). Los tratamientos con porcentajes por encima de las barras tienen diferencia significativa contra el tratamiento de control (T_0). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

En cuanto al contenido de auxinas, la **Figura 40** muestra que para el caso de la adición exógena de AIA, luego de 24 h de incubación la bacteria degrada por completo el compuesto, mientras que para el tratamiento con adición de IBA, al mismo momento, todavía identificamos una pequeña cantidad del regulador en el medio de cultivo. Finalmente, la bacteria tarda más para degradar ANA ya que a

las 48 h solo se ha degradado el 84.5% del compuesto. En resumen, podemos decir que *B. japonicum* E109 puede degradar con una mayor velocidad la auxina natural AIA en comparación con las auxinas sintéticas IBA o ANA. Por otro lado, la adición de AIA al medio de cultivo aumenta la producción de biomasa, y EPS por parte de la bacteria.

III.3.5.2 Catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

En experimentos anteriores no pudimos observar la síntesis de AIA, y dado los reportes de que algunas cepas de *B. japonicum* son capaces de catabolizar AIA (Jensen et al., 1995), se procedió a verificar si tal proceso ocurría en E109 con el agregado exógeno de AIA.

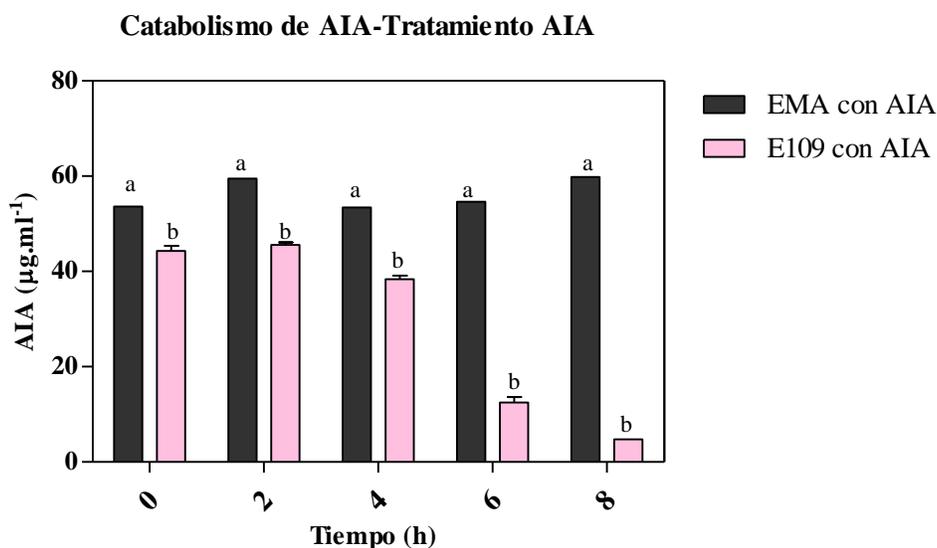


Figura 41. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109 modificados por la adición exógena de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

En la **Figura 41** observamos que en el cultivo de *B. japonicum* E109 con la adición exógena de AIA, hay una disminución de la concentración de la hormona en función del tiempo (h). A las 6 h luego de la adición se puede observar una disminución de un 50% aproximadamente de la concentración y luego de las 24 h no se detecta el compuesto en el medio de cultivo. Este fenómeno observado supone que el mecanismo catabólico es pre-existente a la adición de la hormona, y esto deja especular acerca de una nueva función para la hormona. También se puede observar que el

medio se mantiene constante a lo largo del experimento, demostrando así que no hay interferencia del medio EMA utilizado (Vincent, 1970).

Además evaluamos un tratamiento control, con el cultivo de E109 y el medio EMA, más la adición de agua destilada estéril para corroborar si había o no síntesis de AIA. No detectamos la síntesis de la hormona en el medio de cultivo mediada por la rizobacteria, manteniendo nulos los niveles de este compuesto en función del tiempo.

Además de E109, evaluamos la capacidad de catabolizar AIA en la cepa *B. elkanii* SEMIA 5019 ya que esta bacteria tiene la capacidad de sintetizar AIA.

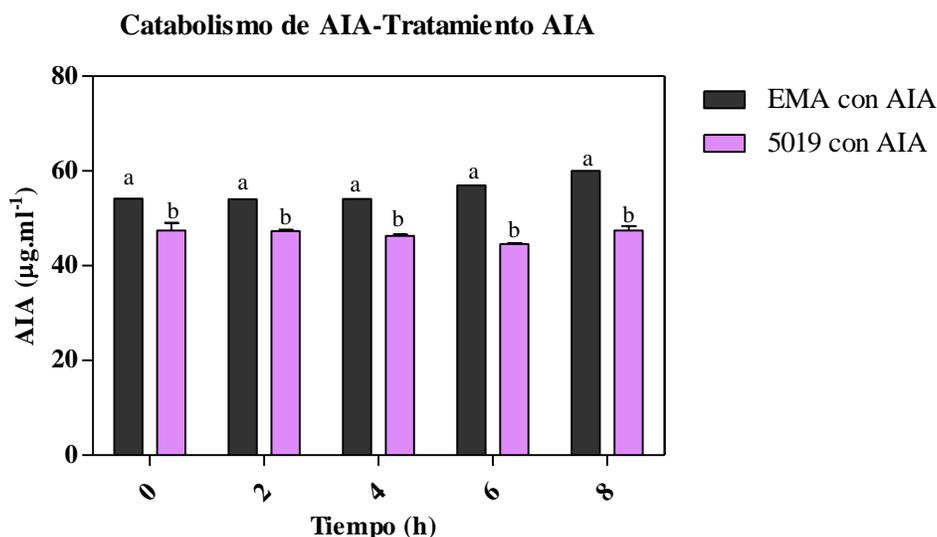


Figura 42. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. elkanii* SEMIA 5019 modificados por la adición exógena de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y la T el SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

Los resultados obtenidos muestran que la cepa SEMIA 5019 no es capaz de degradar el AIA manteniendo constantes los niveles de concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) a lo largo del experimento. Al igual que con *B. japonicum* E109 no hay interferencia del medio EMA utilizado.

III.3.5.3 Catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109

En el experimento anterior pudimos observar que E109 tiene la capacidad de catabolizar AIA, y como la desaparición de la hormona ocurrió en un tiempo considerablemente rápido podemos suponer que el mecanismo catabólico es pre-existente a la adición de la hormona en el medio de

cultivo y de carácter enzimático. Con esta idea de trabajo evaluamos el catabolismo de AIA con el sobrenadante del cultivo de E109.

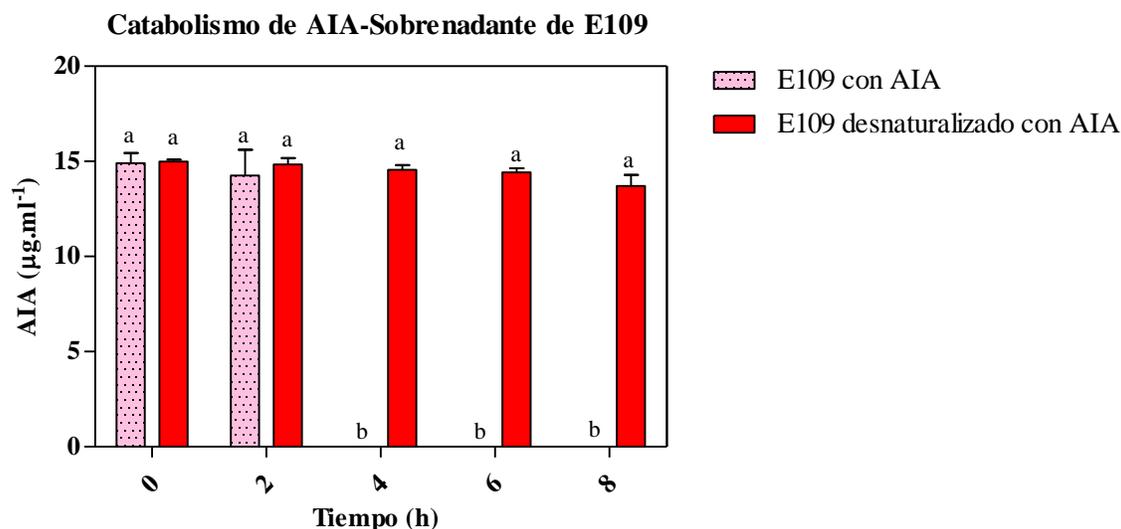


Figura 43. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y sobrenadantes desnaturalizados por calor, modificados por la adición de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y la T el SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

En esta figura podemos observar la concentración de AIA en el tratamiento del sobrenadante de E109 degrada la totalidad de la fitohormona a las 4 horas post-inducción. En el tratamiento sobrenadante desnaturalizado por la acción del calor, se puede observar que la concentración de AIA es la misma respecto de la concentración inicial a lo largo del tiempo. Esto estaría sugiriendo que bajo la acción de las altas temperaturas, los compuestos producidos y liberados en el medio de cultivo por *B. japonicum* E109 son desnaturalizados y no podrían catabolizar AIA. No se muestra la figura del tratamiento control, ya que la concentración de AIA fue cercana a cero, para ambos tratamientos. Como dijimos anteriormente, estos resultados hacen suponer que el mecanismo catabólico es pre-existente a la adición de la hormona y reviste carácter enzimático.

III.3.5.4 Cinética de degradación de AIA en *B. japonicum* E109

III.3.5.4.1 Doble inducción con AIA y saturación

La degradación de AIA por E109 está directamente relacionada a la cantidad de hormona en el medio, es decir, que a medida que aumenta la concentración de AIA disminuye la velocidad de degradación de la hormona y se genera una saturación de la actividad catabólica. En este

experimento llevamos a cabo una segunda inducción, para observar si las enzimas liberadas al medio son capaces de seguir degradando AIA ante una nueva inducción.

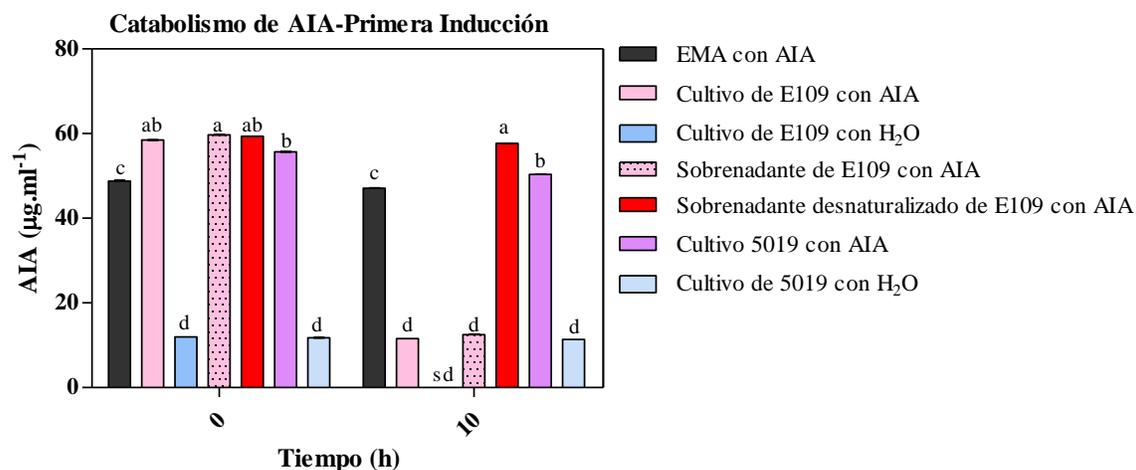


Figura 44. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos y sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y cultivos de *B. elkanii* SEMIA 5019, modificados por la adición exógena de $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un $p < 0,05$. SD significa que no se identificó AIA.

En la **Figura 44** podemos observar que tanto el cultivo como el sobrenadante de E109 se comportaron acorde a los resultados observados previamente, dado que degradaron aproximadamente el 90% del AIA exógeno luego de 10 horas de inducción. El sobrenadante desnaturalizado mantuvo constante el contenido de la fitohormona, mostrando una vez más que con calor se inactiva el agente responsable de la degradación de AIA, probablemente de origen enzimático. En cuanto al cultivo y sobrenadante de la cepa 5019, en los mismos se mantuvieron constantes los valores de la hormona luego de 10 horas desde la adición de la hormona. A posteriori de esta primera inducción se procedió a obtener los sobrenadantes de los tratamientos que eran cultivos y a realizar una segunda inducción la misma concentración de AIA en todos los tratamientos mencionados. Los resultados se resumen en la **Figura 45**.

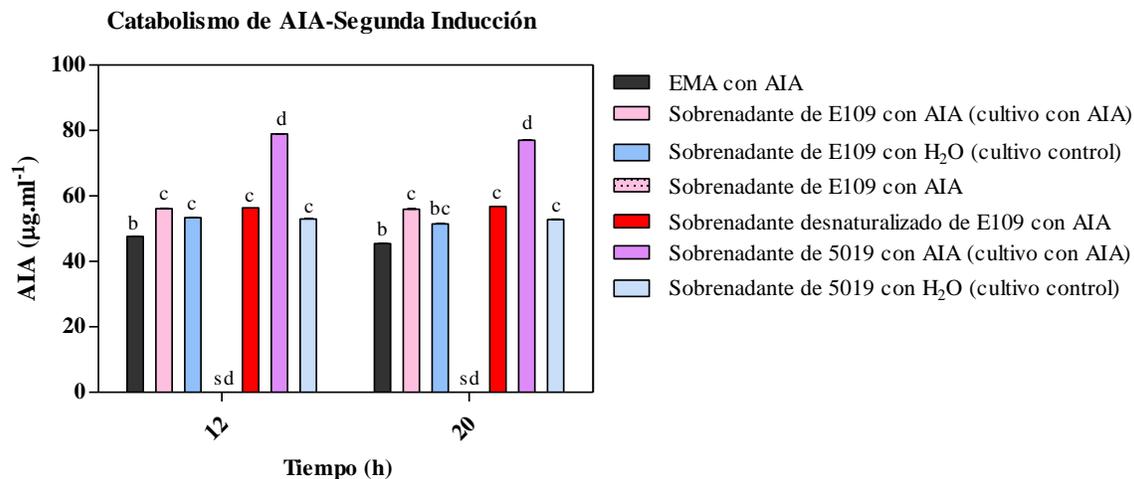


Figura 45. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y *B. elkanii* 5019, modificados por la adición exógena de $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un $p<0,05$. SD significa que no se identificó AIA.

En la **Figura 45** se puede observar que en una segunda inducción con AIA, los tratamientos de sobrenadantes que provenían de cultivos no fueron capaces de degradar el AIA exógeno. Para el caso de los demás tratamientos, se mantuvieron constantes a lo largo del tiempo. Una de las posibles explicación a este fenómeno, sería que durante la primera inducción con AIA la o las molécula/s responsables de la degradación de la hormona degradan la hormona en una relación equivalente (1:1) y ya no estarían disponibles para degradar mayores concentraciones del metabolito durante una segunda inducción, como consecuencia de un posible fenómeno de saturación. Esto despertó nuestro interés en seguir investigando el comportamiento del catabolismo de AIA en diferentes fases del crecimiento de E109 y su relación con una posible cinética de saturación.

III.3.5.4.2 Catabolismo de AIA en diferentes fases de crecimiento

Nuestros resultados indican que las moléculas responsables de la degradación del AIA en cultivos de *B. japonicum* E109 se secretan al medio de cultivo de manera constitutiva por lo que sufrirían un proceso de acumulación, razón por la cual nos interesó evaluar la degradación de AIA en dos fases diferentes de la curva de crecimiento bacteriano, con el fin de determinar si la concentración de tales moléculas en el medio de cultivo aumenta de manera relativa al crecimiento de la bacteria.

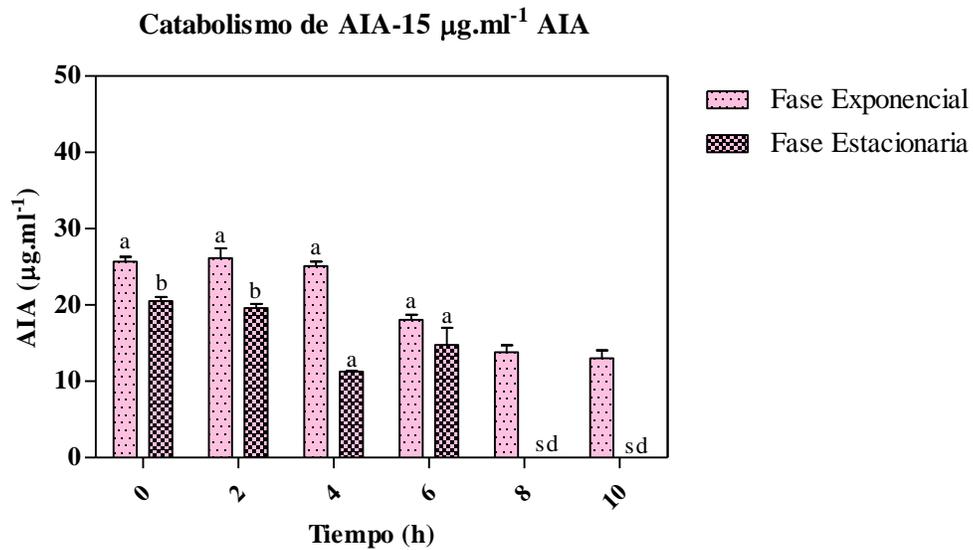


Figura 46. Concentración de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en sobrenadantes en fase exponencial y estacionaria de *B. japonicum* E109 con la adición exógena de $15 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$) y sd (sin datos). Letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un $p<0,05$.

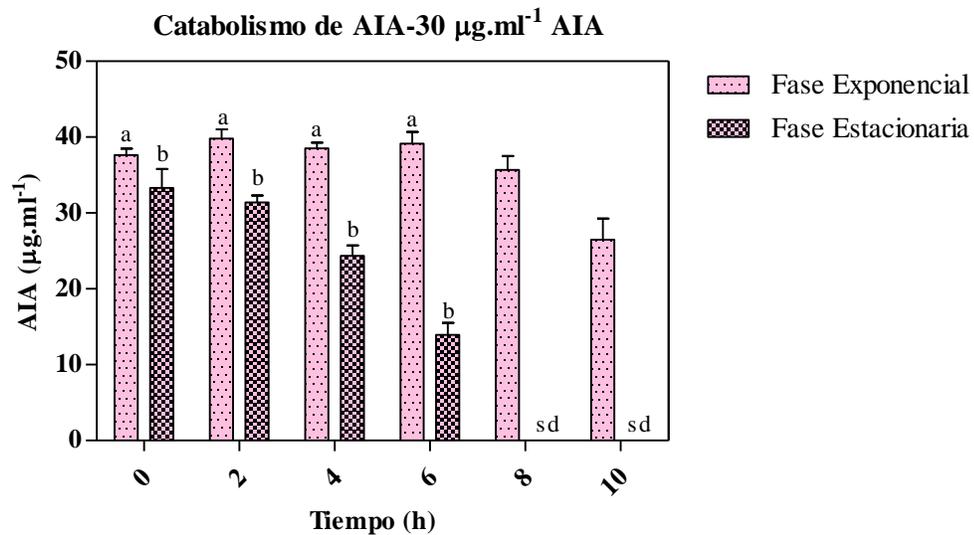


Figura 47. Concentración de AIA ($\mu\text{g.ml}^{-1}$) en sobrenadantes en fase exponencial y estacionaria de *B. japonicum* E109 con la adición exógena de $30 \mu\text{g.ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$) y sd (sin datos). Letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un $p<0,05$.

En la **Figura 46** se puede observar que la degradación de AIA hasta la 6 h después de la inducción no mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos. Luego de las 8 h desde la inducción, el sobrenadante obtenido de fase estacionaria degradó el 100% de la hormona, mientras que el sobrenadante de fase exponencial degradó solo el 50% del AIA luego de 10 horas de inducción. En la **Figura 47** se puede observar que en el sobrenadante de E109 obtenido de fase exponencial, la degradación de la hormona fue más lenta, ya que luego de las 10 horas desde la inducción solo se degradó el 20% de la hormona; mientras que en el caso del sobrenadante obtenido de fase estacionaria se degradó la totalidad de AIA adicionado luego de 8 horas desde la inducción. Según los datos expresados para este ensayo, podemos observar que el o los componentes responsables de la degradación de AIA acompañan el crecimiento de E109, se acumulan en el sistema de cultivo (aumentan de concentración) y pueden degradar mayor cantidad de AIA exógeno por unidad de tiempo, cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria.

III.3.5.4.3 Catabolismo de AIA en concentraciones crecientes de la AIA

En el experimento anterior establecimos que E109 degrada el AIA a una mayor velocidad en la fase estacionaria, con respecto a la fase exponencial por lo que en el siguiente ensayo evaluamos el modelo propuesto con la adición de diferentes concentraciones de la hormona.

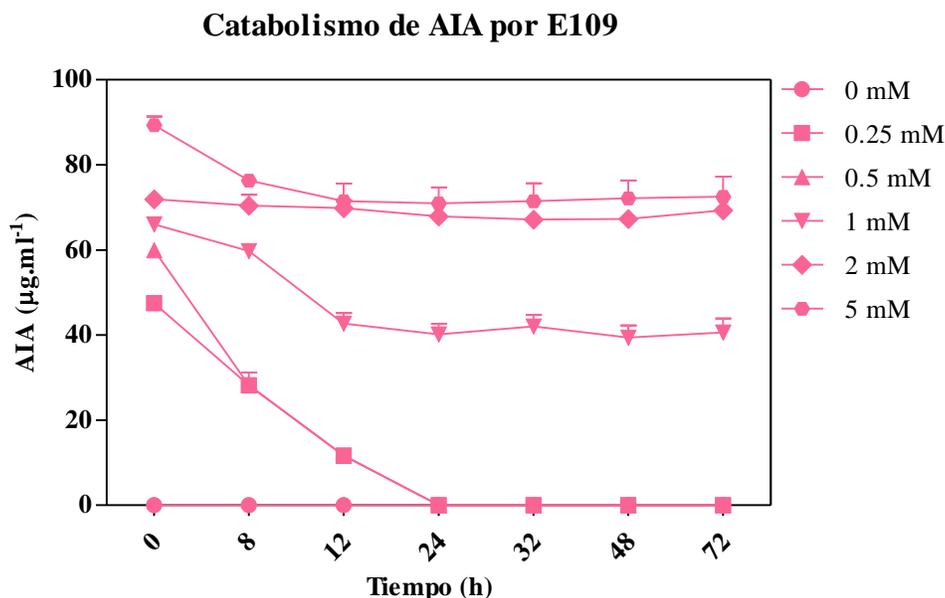


Figura 48. Concentración de AIA ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109 con la adición exógena 0-5 mM de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$).

Como podemos observar en la **Figura 48**, un cultivo de E109 es capaz de degradar totalmente AIA hasta una concentración final de 0.5 mM (aproximadamente 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la hormona) en 12 horas posteriores a la inducción. A concentraciones mayores de la hormona, hay una degradación parcial y se observa una clara cinética de saturación.

III.3.5.5 Efecto de AIA exógeno sobre la fisiología de *B. japonicum* E109 y su efecto sobre su capacidad de establecer simbiosis con soja

III.3.5.5.1 Efecto del AIA exógeno sobre la fisiología de *B. japonicum* E109

B. japonicum E109 fue capaz de degradar el AIA a pocas horas de ser adicionado en el medio de cultivo. Evaluamos el comportamiento de la bacteria en medio de cultivo y luego de ser inoculado sobre semillas de soja para determinar si el fenómeno de catabolismo representa un posible componente de mejora para la práctica de inoculación de semillas de soja con productos formulados con *B. japonicum* E109. Para ello, evaluamos como principales parámetros de interés: (1) crecimiento bacteriano ($\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$); (2) producción de biomasa (DO_{595}); (3) producción de EPS.

La **Tabla 17** resumen la respuesta fisiológica de *B. japonicum* E109 debida a la adición de AIA exógeno sobre el crecimiento bacteriano, así como la producción de biomasa y EPS en medio de cultivo.

Tabla 17. Producción de biomasa (DO_{595}), número de células ($\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$) y producción de EPS ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) de *B. japonicum* E109 crecieron en medios EMA y EMA modificados mediante la adición de AIA (0.1 mM) y se incubaron durante 48 horas en condiciones similares. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. (N = 3).

| | EMA | EMA con AIA |
|--|-------------------|--------------------|
| Producción de biomasa (DO_{595}) | 2.32 ± 0.04^a | 2.61 ± 0.09^b |
| Número de células ($\text{ufc}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 5.18 E+09 | 5.07 E+09 |
| Producción de EPS ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 4.17 ± 0.39^b | 10.43 ± 0.61^d |

Como se observa en la **Tabla 17**, cuando se indujo el cultivo de E109 con AIA en fase exponencial, se produjo un aumento significativo en la producción de biomasa y la producción de EPS con respecto al control. En cuanto al recuento de viables por unidad de volumen, no hubo diferencias significativas entre ambos tratamientos.

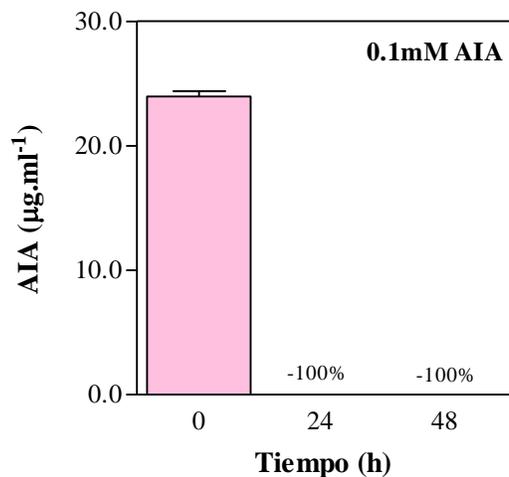


Figura 49. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109, modificados por la adición exógena de 0.1 mM de AIA. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Letras diferentes representan diferencias significativas mediante el test de Tukey con un $p < 0,05$.

En la **Figura 49** podemos observar que la concentración de AIA disminuyó de manera significativa luego de 24 horas desde su adición exógena.

III.3.5.5.2 Recuperación de *B. japonicum* E109 en semillas de soja

La supervivencia de *B. japonicum* E109 sobre semillas de soja, luego de la inoculación (recuperación de viables por semilla), tanto para el tratamiento de control como para el tratamiento inducido por la adición exógena de AIA se resume en la **Figura 50**.

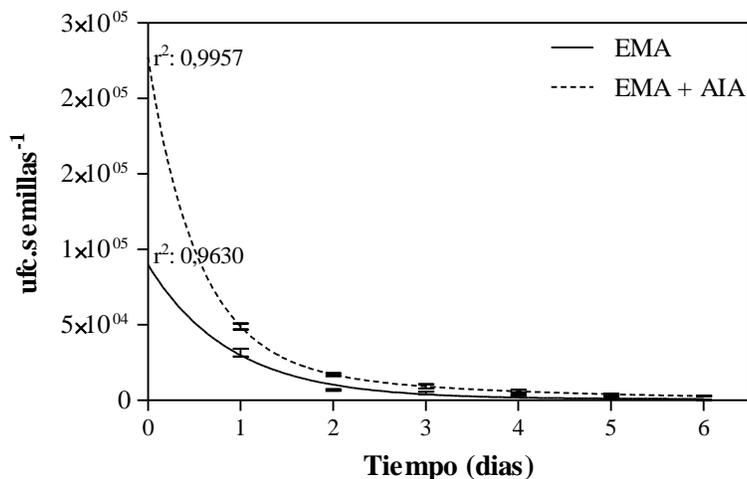


Figura 50. Recuperación de células viables de *B. japonicum* E109 (ufc.semillas⁻¹) a partir de semillas de soja a diferentes intervalos de tiempo después de la inoculación. La gráfica representa las típicas curvas bifásicas de muerte para dos cultivos de *B. japonicum* E109 en medio EMA con y sin la inducción con 0.1 mM de AIA. Los valores mostrados representan la media \pm SD.

En la **Figura 50** podemos observar que la recuperación de microorganismos viables fue mayor en el tratamiento con la adición de AIA exógeno, respecto a su control, a lo largo de la típica curva de muerte. Podemos decir que la cantidad de bradyrhizobios que sobrevivieron a la inoculación, fue mayor cuando el cultivo tenía un pre-tratamiento con AIA exógeno y esto se vio reflejado en el tiempo de sobrevida de la bacteria sobre la semilla.

III.3.5.5.3 Evaluación del establecimiento de la simbiosis *B. japonicum* E109-soja

La **Tabla 18** resume los resultados del efecto de la adición de AIA exógeno a cultivos puros de *B. japonicum* E109 a nivel del comportamiento simbiótico con plántulas de soja.

Tabla 18. Efectos sobre el crecimiento y nodulación de plántulas de soja después de 4 horas y 6 días de la inoculación con *B. japonicum* E109 en medios EMA y EMA con la adición de AIA durante la fase de crecimiento exponencial. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. (+) Representan el porcentaje de diferencias positivas contra el tratamiento EMA.

| | EMA | | EMA + AIA | |
|------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| | 4 h | 6 días | 4 h | 6 días |
| NRP | 11.88±0.31 ^c | 4.47±0.45 ^a | 13.58±0.46 ^d +14,3 | 5.94±0.26 ^b +32,8 |
| NRS | 9.70±0.49 ^a | 11.17±0.33 ^b | 10.55±0.59 ^{ab} +8,76 | 13.29±0.51 ^c +18,97 |
| NP | 21,58±0.8 ^c | 15,64±0.78 ^a | 24,43±1.05 ^d +13,2 | 19,23±0.87 ^b + 22,95 |
| PSA | 0.232±0.008 ^a | 0.232±0.008 ^a | 0.253±0.005 ^b +9,05 | 0.311±0.005 ^d + 7,61 |
| PSR | 0.084±0.001 ^a | 0.109±0.003 ^b | 0.107±0.010 ^b + 27,3 | 0.123±0.003 ^c + 12,84 |
| PPN | 94.0 % | 56.0 % | 100.0 % + 6,0 | 70% + 14,0 |

NRP: Nódulos en la raíz principal nodules.planta⁻¹; NRS: Nódulos en la raíz secundaria.planta⁻¹; NP: Nódulos en la raíz por planta; PSA: Peso seco parte aérea por planta; PSR: Peso seco de la raíz.planta⁻¹; PPN: Porcentaje de plantas noduladas (Burton, 1976).

En la **Tabla 18** podemos observar los parámetros que fueron medidos en las plántulas de soja cuando se inoculó con E109 (control) y E109 con AIA. De manera generalizada podemos mencionar que todos los parámetros aumentaron en el tratamiento de E109 con AIA. Los nódulos en la raíz principal aumentaron en 14% a las 4 h mientras que a los 6 días, 32%. Por otro lado, los nódulos en raíz secundaria incrementaron 8% y 19%, a las 4 h y 6 días respectivamente. Estos datos indican que el número de nódulos por planta fue mayor para el caso de E109 con AIA, representando 13% a las 4 h y 22% a los 6 días. Estos datos van acompañado del porcentaje total de plantas noduladas, porque en el tratamiento E109 con AIA hubo una nodulación del 100% a las 4 h y 70% a los 6 días, siendo inferior el porcentaje en el tratamiento control. En cuanto al peso seco de la parte aérea y radical, ambos aumentaron con el agregado de AIA. El peso seco aéreo se incrementó 9% y 34% en los tiempos evaluados, respectivamente. El peso seco radical incrementó en ambos tiempo evaluados, pero fue mayor a las 4 h con un porcentaje de 27% mientras que a los 6 días fue de 13%.

III.3.5.6 Perfil de metabolitos y catabolitos en *B. japonicum* E109

III.3.5.6.1 Perfil de metabolitos de AIA en cultivos de *B. japonicum* E109

Realizamos el análisis de metabolitos de auxinas por LC-MRM-MS de acuerdo a Novák et al. (2012). Este análisis permite la detección de metabolitos de auxinas en el orden de pico moles. A pesar de que la bacteria posee la información genética para producir AIA, *B. japonicum* E109 no es capaz de producir o acumular la fitohormona en el medio de cultivo en las condiciones evaluadas. Llevamos a cabo un análisis metabólico en cultivos puros de E109 para evaluar si los intermediarios o catabolitos de las rutas biosintéticas de AIA estaban presentes. Con este análisis pudimos construir un perfil de los metabolitos identificados en el medio de cultivo cuando la bacteria se encuentra en fase estacionaria y sobre ello estimar una posible ruta biosintética de la hormona en ausencia de la capacidad catabólica. También se hizo un perfil similar para la cepa 5019, que como hemos indicado, sintetiza AIA en el medio de cultivo y no lo degrada. A continuación, en la **Figura 51 y 52**, se observan, los metabolitos identificados en el sobrenadante de E109 y 5019 en medio EMA con y sin la adición de L-Trp como precursor.

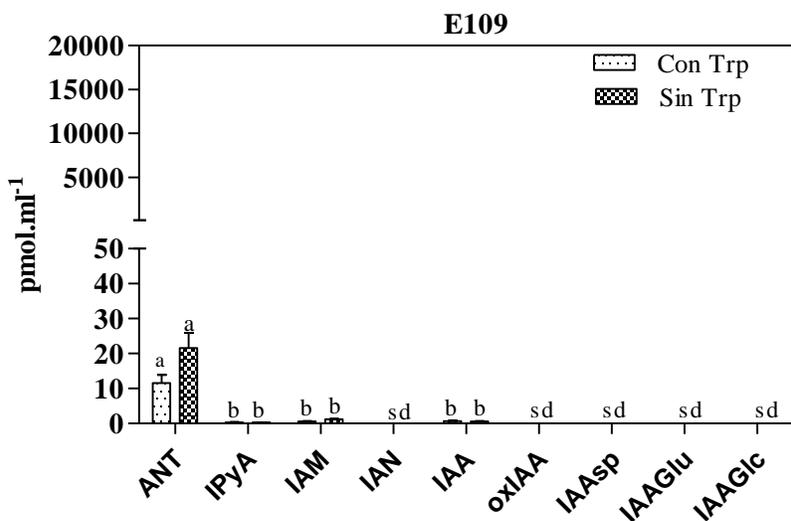


Figura 51. Concentración de metabolitos (pmol.ml⁻¹) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 obtenidos en medio de cultivo EMA o EMA modificado por la adición de L-Trp. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD. Sd significa sin datos.

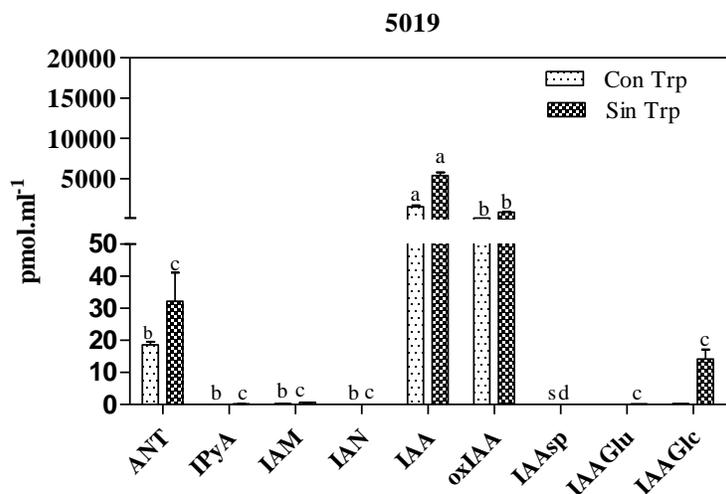


Figura 52. Concentración de metabolitos (pmol.ml⁻¹) en sobrenadantes de *B. elkanii* 5019 obtenidos en medio de cultivo EMA o EMA modificado por la adición de L-Trp. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD. Sd significa sin datos

A partir del análisis de los metabolitos en sobrenadantes de cultivos de E109, se observa (aunque en concentraciones muy bajas) los compuestos intermediarios de las vías de síntesis de AIA, del IPyA y de IAM confirmando que E109 posee los intermediarios de estas vías de síntesis, como se había mencionado previamente. También se detectó AIA en presencia y ausencia de L-Trp y no se observaron conjugados con glucosa o aminoácidos de la hormona. El compuesto detectado en mayor cantidad en el cultivo de E109 fue el ácido antranílico, el cual es un compuesto intermediario de muchas vías de síntesis, incluso del catabolismo de AIA, como se propuso para el caso de *B. diazoefficiens* USDA110.

En el perfil metabólico de la cepa 5019, se detectaron compuestos intermediarios relacionados con las tres vías de síntesis de AIA, a saber IPyA, IAM e IAN y también se encontraron conjugados de la hormona. AIA fue el compuesto más detectado. Aunque son especies diferentes, los compuestos se detectaron en concentraciones más altas que en E109 mostrando diferencias en los metabolitos liberados en el sobrenadante de una cepa productora y no productores de AIA.

III.3.5.6.2 Perfil metabólico del catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109

Obtuvimos un perfil de los metabolitos liberados al medio cuando se adiciona exógenamente AIA al medio de cultivo en un cultivo de E109.

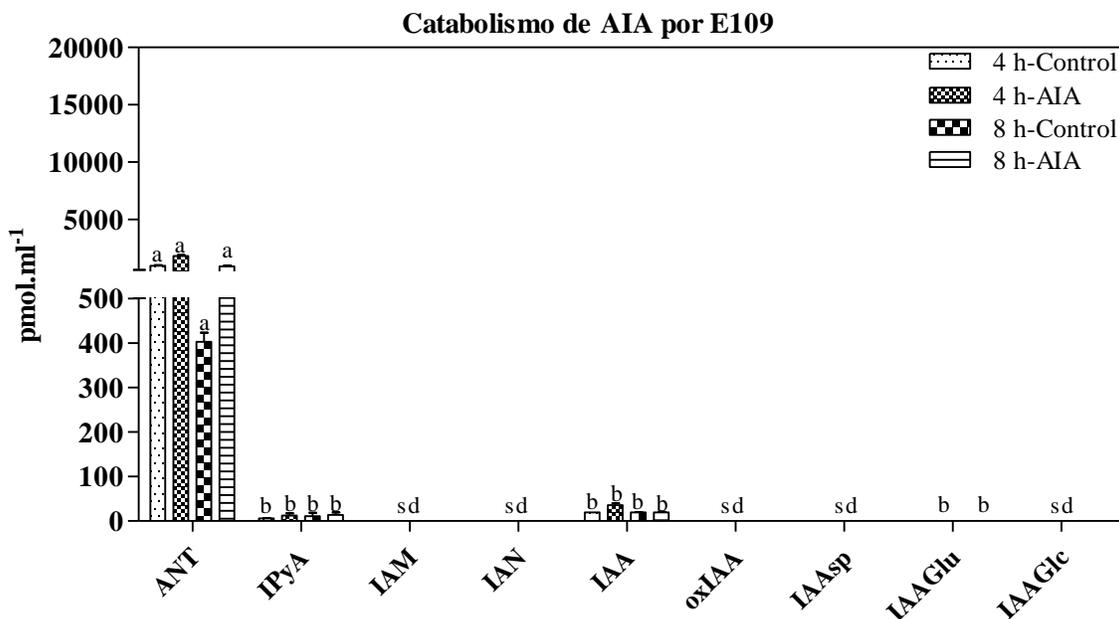


Figura 53. Concentración de metabolitos (pmol.ml^{-1}) en cultivos de *B. japonicum* E109 obtenidos luego de la adición exógena de AIA en el medio de cultivo. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD.

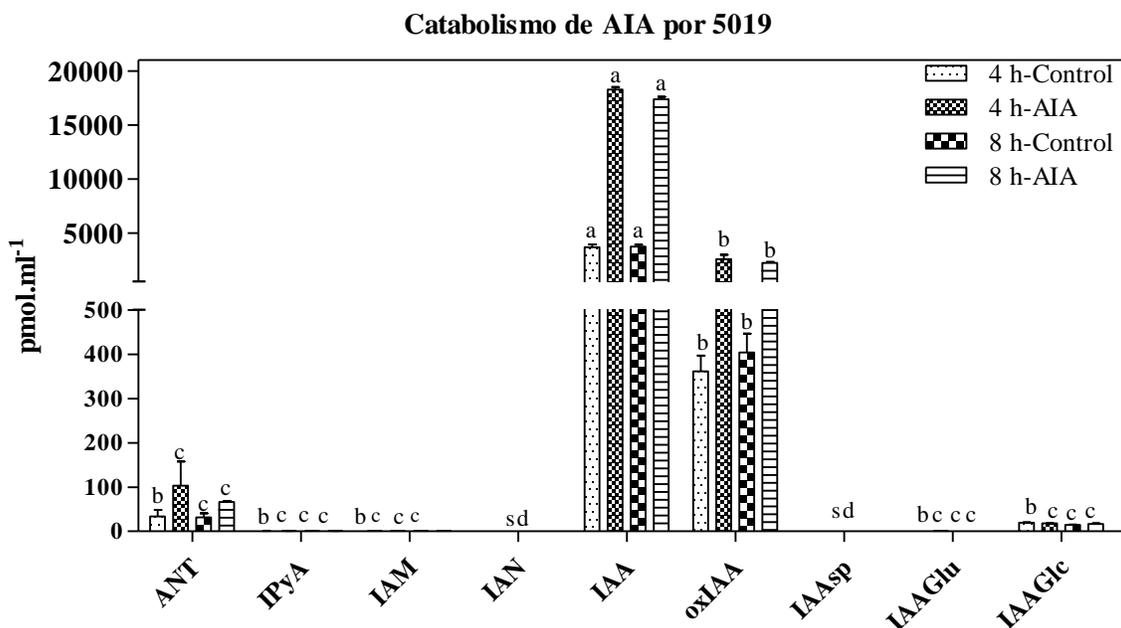


Figura 54. Concentración de metabolitos (pmol.ml⁻¹) en cultivos de *B. elkanii* 5019 obtenidos luego de la adición exógena de AIA en el medio de cultivo. Referencias: (ANT) ácido antranílico, (IPyA) ácido indol-3-pirúvico, (IAM) ácido indol-3-acetamida, (IAN) ácido indol-3-acetonitrilo, (IAA) ácido indol-3-acético, (oxIAA) 2-oxoindol-3-ácido acético, (IAAsp) ácido indol-3-acético aspartato, (IAAGlu) ácido indol-3-acético glutamato, (IAA-glc) ácido indol-3-acético glucosa. Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$. Los valores mostrados son la media \pm SD.

Cuando evaluamos los metabolitos producidos luego de la adición exógena de AIA en cultivos de E109, encontramos una alta concentración de ácido antranílico (ANT). Este compuesto es un intermediario y precursor químico de varias reacciones de importancia en diferentes rutas biosintéticas. El intermediario IPyA también se detectó en concentraciones ligeramente más altas en cultivos de E109 no inducidas con la fitohormona. No se detectó IAM, compuesto que si se detectó cuando no se realizó la inducción con la hormona. El AIA fue catabolizado a las 8 horas y se observó sólo una producción basal de la hormona. Se observó la formación de diferentes conjugados, como AIA-Glu. El tratamiento control sin adición exógena de la hormona, mantuvo valores constantes y sin diferencias significativas, durante todo el experimento.

Cuando evaluamos en catabolismo de AIA en 5019, vimos que los niveles de AIA permanecían sin diferencias significativas en comparación con el tratamiento control (sin agregado exógeno). Los metabolitos detectados para el experimento sin la inducción de AIA, se observaron sin cambios en

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

la concentración. Esto indica que la adición de AIA al cultivo no indujo la síntesis de nuevos metabolitos.

III.4 DISCUSIÓN

III.4.1 Biosíntesis de AIA

Se ha reportado en la bibliografía la capacidad de *Bradyrhizobium* sp. para sintetizar ácido indol-3-acético. Minamisawa y Fukai (1991), demostraron que las cepas productoras de rhizobitoxina en *B. japonicum* excretaban AIA, mientras que aquellas que no producían este compuesto no producían AIA. Estos reportes sugieren que en *B. japonicum*, la biosíntesis completa de AIA se limita exclusivamente a las cepas que producen la rhizobitoxina, mientras que aquellas que no la producen no tendrían las vías de síntesis necesarias para la producción de AIA tal como ocurre en el caso de *B. diazoefficiens* USDA110. Para la biosíntesis de AIA se proponen seis rutas metabólicas, utilizando como intermediario el aminoácido L-triptófano, pero las predominantes en rizobacterias serían la vía de la indol-3-acetamida (IAM) y la vía del indol-3-piruvato (IPyA) (Lambrecht et al., 2000). En E109, la vía predominante sería IAM. E109 tendría capacidad de sintetizar AIA a través de la vía de síntesis mencionada, pero en las condiciones evaluadas en nuestros ensayos no se pudo detectar el compuesto, aún con la adición del precursor al medio de cultivo. Una hipótesis sobre este comportamiento sería que el compuesto se cataboliza rápidamente por acción de uno o más compuestos producidos por la bacteria durante su desarrollo, lo que implicaría que el microorganismo produce AIA pero al mismo tiempo lo cataboliza, acorde a la hipótesis de Minamisawa y Fukai (1991).

III.4.2 Hidrólisis de conjugados de AIA con aminoácidos

Como se conoce de la fisiología vegetal, los conjugados de amidas son reservorios de moléculas de AIA, jugando un papel clave de la homeostasis en las plantas superiores (Bandurski, 1980). No se conoce cual es el rol de la producción, acumulación e hidrólisis de conjugados de auxinas en microorganismos, pero esta capacidad, confirmada en otras bacterias, no debería entenderse como un fenómeno de un microorganismo aislado, sino de una bacteria asociada e integrada a un sistema de mayor complejidad como lo es la fisiología de la planta. En la naturaleza, no son muchos los reportes que determinan la existencia de bacterias con la capacidad de hidrolizar conjugados de AIA, y dentro de los reportados, podemos citar *Enterobacter agglomerans* con capacidad de hidrolizar AIA-Asp y *Arthrobacter ilicis* con capacidad de hidrolizar AIA-ala (Chou et al., 1996; Chou y Huang, 2005), además del reporte de Glass y Kosuge (1986) en el que se reporta por primera vez la actividad de una AIA-lys de *Pseudomonas savastanoi*. En el caso particular de la hidrólisis de conjugados (AIA-amidas) por *B. japonicum* E109, en este trabajo se confirmó que la bacteria tiene capacidad metabólica para hidrolizar AIA-leucina, AIA-fenilalanina o AIA-alanina con la consecuente liberación de la molécula de AIA y su posterior inmediato catabolismo. La

adición de ambas formas de auxinas (libre o conjugada) a cultivos puros de la bacteria indujo similares cambios fisiológicos a nivel de la producción de biomasa y EPS, comparada con los controles sin el agregado exógeno. Así, con los resultados de este trabajo podemos confirmar que E109 además de hidrolizar AIA-amidas es capaz de catabolizar el AIA liberado de esa reacción.

III.4.3 Conjugación de AIA con aminoácidos

Los conjugados de auxinas desempeñarían un papel importante como formas de almacenamiento de AIA en la planta, pero todavía se desconoce cuál sería la función y rol ecológico en diferentes especies de bacterias que tienen esta capacidad, como por ejemplo *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* que transforma el AIA en su forma de amida conjugada, AIA-lisina (Hutzinger y Kosuge, 1968). *B. japonicum* E109 no tiene capacidad de conjugar AIA con aminoácidos; sin embargo en nuestros ensayos se pudo observar que la adición de ambos compuestos de manera simultánea produjo cambios significativos a nivel de la biomasa celular, el recuento de viables y la producción de EPS, similares a los obtenidos por la adición de la hormona de manera individual o como producto de la liberación de la misma a partir de una forma conjugada. Debido a que la actividad catabólica de E109 es fuerte, el AIA adicionado de manera exógena fue degradado rápidamente (a las 24 h no hay vestigios del compuesto en el medio de cultivo) por lo que no sería posible confirmar de manera inequívoca que esta capacidad no está presente en el microorganismo.

III.4.4 Hidrólisis AIA-amidas en diferentes fases de la curva de crecimiento bacteriana

Los ensayos de hidrólisis realizados en este trabajo se llevaron a cabo mayoritariamente en la fase exponencial temprana de la curva de crecimiento sigmoide (equivalente a una DO_{595} aprox. de 0.6) en la que los microorganismos se encuentran muy activos metabólicamente. Ensayos de catabolismo con otras cepas de *Bradyrhizobium* se realizaron en fases lag o exponencial temprana de crecimiento (Donati et al., 2013; Egebo et al., 1991; Jensen et al., 1995), pero no existen reportes del comportamiento de las cepas en las diferentes fases de la curva de crecimiento. En nuestros experimentos la hidrólisis de AIA-amidas y el subsecuente catabolismo de AIA estuvieron presentes en todas las fases de la curva de crecimiento; sin embargo la velocidad de degradación no fue la misma en todas ellas. En la fase lag, se observó el catabolismo completo del AIA luego de 48 h de incubación y a las 24 h se detectó la presencia de AIA libre, producto de la hidrólisis de AIA-amidas pero no se observa hidrólisis completa de las AIA-amidas. En fase exponencial temprana, la degradación de AIA ocurre de manera completa luego de 24 h desde la inducción; mientras que en la fase exponencial ocurre luego de 6 h de inducción. En ambos casos no es posible detectar como metabolito libre del producto de la hidrólisis de los conjugados con aminoácidos. Por último, en la

fase estacionaria el AIA se degrada luego de 48 h pero se diferencia de la fase lag porque no se detecta el AIA libre en el caso de los tratamientos con adición de AIA-amidas al medio. Los tratamientos de AIA-amidas, solo se degradan completamente en la fase exponencial y luego de 48 h desde la inducción; mientras que en la fase exponencial temprana solo se hidroliza completamente el AIA-ala.

III.4.5 Catabolismo de AIA

Minamisawa y Fukai, (1991) encontraron una posible explicación a las observaciones de Nielsen et al. (1988) sobre la ausencia del metabolito en cultivos de determinadas cepas de *Bradyrhizobium* sp. Ellos propusieron y comprobaron la existencia de dos genotipos con comportamiento disímil a nivel de la producción de la hormona en *B. japonicum*, donde las cepas de Genotipo II tendrían la capacidad de acumular AIA en el medio de cultivo; mientras que en el caso de las del Genotipo I la molécula no se detecta. Su hipótesis sobre este fenómeno se basó en que las cepas del Genotipo I no solo producen AIA, sino que también pueden catabolizarlo y es por ello no se acumula en el sobrenadante, mientras que las cepas de Genotipo II si bien producen la hormona no pueden catabolizarla por lo que se acumula en el medio. En la actualidad, sabemos que las cepas comprendidas en el Genotipo II de Minamisawa y Fukai, (1991) corresponden a la especie *B. elkanii*, mientras que las del Genotipo I pertenecen a las especies *B. japonicum* y *B. diazoefficiens*, más próximas entre sí desde el punto de vista evolutivo, lo que propone una reconsideración de esta clasificación y un análisis genómico más detallado de la capacidad de síntesis y catabolismo de AIA por los miembros de cada grupo funcional. En los ensayos presentados, pudimos confirmar el catabolismo de AIA en cultivos puros y sobrenadantes obtenidos de la cepa E109; sin embargo, en esos ensayos no se había evaluado si el AIA era la única auxina que la bacteria era capaz de catabolizar o el efecto que la presencia de AIA ocasionaba en el metabolismo y desarrollo de la bacteria. Donati et al. (2013) evaluaron la capacidad catabólica de AIA por *B. diazoefficiens* USDA110 y vieron que a medida que aumentaba la concentración (0.25 a 5 mM) de la hormona en el medio de cultivo, la tasa de crecimiento se veía disminuida luego de las 48 horas de incubación; mientras que la producción de EPS se vio incrementada. La producción de EPS se ha demostrado que aumenta como resultado de la exposición de la bacteria a diversos tipos de estrés, tales como la desecación (Cytryn et al., 2007; Chang y Halverson, 2003), el estrés oxidativo-mediado por superóxido (Donati et al., 2013) y el estrés por frío (Tamaru et al., 2005), entre otros.

Como observamos, en el cultivo de *B. japonicum* E109 con la adición de AIA, hay una disminución de la concentración de la hormona en función del tiempo (h). Luego de 6 horas de la adición de la

hormona en el medio de cultivo se puede observar una disminución de aproximadamente un 50 % de la concentración y luego de 24 horas no se detecta el compuesto en el medio de cultivo, lo que supone que el mecanismo catabólico es pre-existente a la adición de la hormona. También observamos, que al aplicar calor a un cultivo de *B. japonicum* E109 pierde la actividad catabólica de AIA. Estos resultados sugerirían que el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109, sería proveniente de una molécula con actividad biológica que al aplicarle calor la desnaturalizaría y pierde su actividad. El AIA exógeno es catabolizado eficientemente por *B. japonicum* E109 en medio de cultivo, generando cambios importantes en la fisiología de la bacteria en el medio, lo que permite especular sobre un nuevo papel de la hormona como una señal de la planta para regular el desarrollo bacteriano durante la interacción. La adición de AIA en los cultivos de E109, luego de 24 y 48 horas produjo un aumento en la producción de biomasa (DO_{595}) y la producción de EPS, mientras que por la adición de dos auxinas sintéticas, IBA y ANA, no se observaron diferencias significativas respecto al tratamiento control. *B. japonicum* E109 fue capaz de catabolizar completamente AIA, un 90% de IBA y un 50% ANA luego de 24 horas de incubación y degradarlos casi en su totalidad luego de 48 horas de incubación. Al adicionar una auxina natural, como el AIA a un cultivo puro de *B. japonicum* se produjeron cambios fisiológicos significativos a nivel de la producción de biomasa y EPS, así como en el número de células; mientras que la adición de auxinas sintéticas no determinó el mismo comportamiento.

Nuestros resultados indican que E109 tiene la capacidad de degradar AIA hasta una concentración de 0.5 mM, que degrada la fitohormona de manera constitutiva y a mayor velocidad en fase estacionaria debido a un proceso de acumulación de la enzima y que cuando se inoculan semillas de soja con un cultivo de E109, que fue previamente inducido con AIA, el número de nódulos y la producción de biomasa vegetal aumentan, debido en parte a una mayor supervivencia del microorganismo sobre la semilla y en correlación con una mayor acumulación de EPS. Los metabolitos encontrados durante el catabolismo de AIA, muestran una alta concentración de ácido antranílico, ácido indol-3-pirúvico y la formación de un conjugado glucosídico (AIA-glu). El ácido antranílico, es un producto de la degradación de AIA según Jensen et al. (1995); sin embargo no podemos confirmar que este sea parte de la vía de degradación dado que este compuesto es un intermediario y precursor químico en varias reacciones de importancia en diferentes rutas de síntesis biológicas.

III.5 CONCLUSIONES

De este capítulo de Tesis podemos concluir:

1. *Bradyrhizobium japonicum* E109, la cepa utilizada para la formulación de inoculante para soja en Argentina, no es capaz de sintetizar AIA aunque posee algunos de los genes para las vías de síntesis.
2. E109 tiene la capacidad de hidrolizar conjugados de amidas con el ulterior catabolismo de la hormona y no es capaz de conjugar AIA con aminoácidos. La hidrólisis y el catabolismo de AIA y AIA-amidas, se realiza en todas las etapas del crecimiento de la bacteria, pero la fase donde es más rápida es en la exponencial.
3. *B. japonicum* E109 es capaz de catabolizar AIA, muy rápidamente después de la adición exógena de la hormona en el medio de cultivo. Además:
 - a. La desnaturalización del cultivo y sobrenadante por calor, inactiva la degradación de la hormona.
 - b. Tiene la capacidad para catabolizar auxinas naturales como el AIA, y sintéticas como IBA y el ANA, pero degrada a mayor velocidad el AIA.
 - c. El catabolismo de AIA tuvo una cinética de reacción con saturación, ya que solo pudo degradar hasta 0.5 mM de AIA. La velocidad de degradación es mayor en la fase estacionaria por lo que suponemos que esto se debió a la acumulación enzimática en el medio de cultivo.
 - d. La inoculación de E109, pre-inducida por la adición de AIA exógeno, en semillas de soja aumenta la producción de EPS por parte de la bacteria, la recuperación de células bacterianas viables sobre semillas, el número de nódulos en raíces de soja y la producción de biomasa de la planta con respecto al tratamiento control.
 - e. El perfil metabólico de E109 evidenció en baja concentración, la presencia de ácido antranílico, IPyA, IAM y AIA. El análisis de catabolitos de AIA determinó la presencia de ácido antranílico, IPyA y el conjugado glucosídico (AIA-Glu).

**CAPÍTULO IV: Análisis de genes involucrados en
el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109**

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

IV.1 INTRODUCCIÓN

IV.1.1 Peroxidasas en el catabolismo de AIA

Las peroxidasas están presentes en todas las plantas del planeta. Estas enzimas están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos a lo largo de todo el ciclo de vida vegetal, donde podemos destacar su intervención en la germinación, el crecimiento celular, la reticulación de la pared celular, lignificación, estrés biótico y abiótico, simbiosis, nodulación, micorrización y la senescencia de la planta. Las peroxidasas vegetales catalizan la reducción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) mediante la adopción de electrones a diversas moléculas donantes, tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina, auxinas, o metabolitos secundarios (Hiraga et al. 2001). La descarboxilación oxidativa de AIA por peroxidasas vegetales se considera una reacción de degradación de gran importancia vinculada con el control de los niveles endógenos de AIA (Gazaryan et al. 1996). El catabolismo de AIA por peroxidasas se ha estudiado en numerosos sistemas biológicos además de las plantas, y el requisito de la presencia de diferentes co-factores y H_2O_2 varía entre especies. La degradación de AIA por peroxidasa de rábano picante (HRP) puede ocurrir sin co-factores añadidos y en presencia o ausencia de H_2O_2 (Hinman y Lang, 1965). La oxidación aeróbica de AIA catalizada por la peroxidasa en ausencia de H_2O_2 , deja como productos finales el indol-3-aldehído y oxindol 3-metileno, aunque la sensibilidad del sistema a una variedad de parámetros y la complejidad de los productos de reacción, como de los productos intermedios de la enzima han dificultado la dilucidación de la secuencia completa de las vías de reacción y el mecanismo de la activación de oxígeno (Grambow y Langenbeck-Schwich, 1977). Una peroxidasa inducida por *Ensifer* sp. (antes, *Sinorhizobium* sp.) se expresa con rapidez y de forma transitoria en las primeras etapas de la interacción con *Medicago truncatula* (Cook et al., 1995). Esta peroxidasa podría, mediar en la alteración de la pared celular y en la formación del hilo de infección en el desarrollo de nódulos tempranos (Salzwedel y Dazzo, 1993). Las auxinas se acumulan en el sitio de iniciación de nódulos y posteriormente disminuyen durante la formación del primordio nodular (Mathesius et al., 1998; Penmetsa et al., 2003). El aumento de peroxidasas durante nodulación podría estar relacionado con el control de los niveles de auxina en las raíces. De hecho, algunas peroxidasas de clase III oxidan las auxinas y así podrían controlar indirectamente la formación de nódulos a través del catabolismo de tales compuestos (Savitsky et al., 1999; Mathesius, 2001).

IV. 1.2 Clúster *iac* en el catabolismo de AIA

P. putida 1290 es capaz de utilizar AIA como única fuente de carbono y energía debido a la presencia de un clúster denominado *iac* que consiste de 10 genes que codifican para diferentes

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

enzimas responsables de la degradación de AIA como asimilación de fuente de carbono y nitrógeno (Leveau y Gerards, 2008).

Por otro lado, se han identificado grupos de genes similares en 22 genomas de otras bacterias, tales como *P. putida* GB-1; *Marinomonas* sp. MWYL1; *Burkholderia* sp. 383; *Sphingomonas wittichii* RW1; y *Rhodococcus* sp. RHA1.

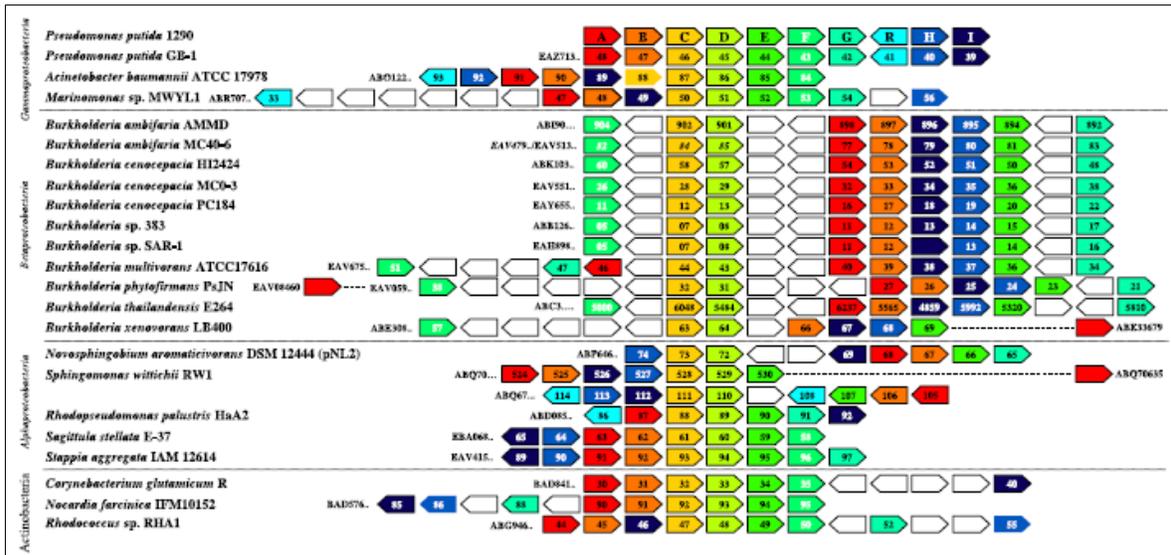


Figura 55. Comparación de los genes del locus *iac* en *P. putida* 1290 con los grupos de genes de tipo *iac* en otros genomas bacterianos. Los tamaños de los genes y espacios intergénicos no están en escala y los genes *iac* homólogos en otras bacterias se indican con el mismo color. La orientación de cada gen se indica en la figura (Leveau y Gerards, 2008).

Este clúster está bien conservado y consistiría en un locus de tres unidades transcripcionales putativas. La primera sería un operón de 9-15 ORF denominados *iacA*, *iacB*, *iacC*, *iacD*, *iacE*, *iacF* e *iacG*: el primer gen del clúster, denominado *iacA*, codifica para una acil-coA deshidrogenasa, que sería la primer enzima en atacar el anillo indol convirtiendo AIA en 2-hidroxi-AIA; *iacB* es una proteína hipotética conservada, función desconocida; *iacC* es un anillo aromático de hidroxilación dioxigenasa, proteína Rieske (2Fe-2S), subunidad alfa que está involucrada en la conversión de 3-hidroxi-2-oxo-AIA a catecol; *iacD* es un anillo aromático de hidroxilación dioxigenasa, subunidad beta (*IacD* es una subunidad de la proteína *IacC*) y su función es desconocida; *iacE* es una deshidrogenasa de cadena corta/reductasa está involucrado en la conversión de 2-hidroxi-AIA a 3-hidroxi-2-oxo-AIA; *iacF* corresponde a una ferredoxina con función desconocida dentro del clúster; e *iacG* es una Flavin proteína de dominio reductasa también con función desconocida. El segundo operón de ORF 17 y 18 consiste en los genes *iacH* e *iacI*, que codifican para Glu-RNAt

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

amidotransferasa y proteína hipotética conservada, respectivamente, ambas con función desconocida. El tercer operón consiste en un solo gen (ORF16 o *iacR*) localizado aguas arriba de ORF17, que codifica un regulador transcripcional de tipo MarR y sería un represor de la expresión de *iacA* (Scott et al. 2013).

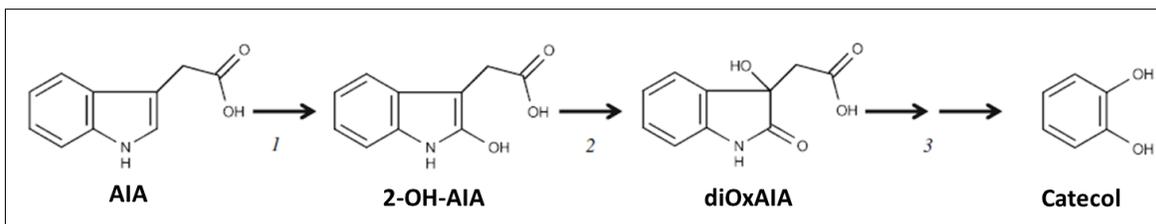


Figura 56. Vía propuesta para la degradación de AIA en *P. putida* 1290 por el clúster *iac*. Se muestran los tres intermedios, uno confirmado (catecol) y los otros dos aparentemente (2-hidroxi-AIA, o 2-OH-AIA; 3-hidroxi-2-oxo-AIA, o diOxAIA). El producto del gen *iacA* está implicado en el paso 1, *iacE* en el paso 2 e *iacC* en el paso 3.

En el caso de los rizobios el análisis del genoma de *B. diazoefficiens* USDA110 demuestra que carece de la mayoría de los genes del clúster *iac* pero contiene una secuencia homóloga al gen *iacA*, que codificaría para una enzima responsable de iniciar el proceso de asimilación del AIA en otros microorganismos (Leveau y Gerards, 2008).

IV.2 METODOLOGÍA

IV.2.1. Actividad de la enzima peroxidasa para el catabolismo de AIA en E109

IV.2.1.1 Detección de la actividad peroxidasa en cultivos de E109

Se inoculó un frasco de vidrio conteniendo caldo EMA (Vincent, 1970) suplementado con 10 mg.l^{-1} L-Trp en las condiciones antes mencionadas. En una cubeta de cuarzo para espectrofotometría se colocó $880 \mu\text{l}$ de buffer acetato de sodio/ácido acético 0.1 M a pH 5.3, $70 \mu\text{l}$ de solución de ortodiansidina 9 mM , $50 \mu\text{l}$ de solución de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) y $100 \mu\text{l}$ del cultivo de E109 en fase exponencial de crecimiento. Se agito rápidamente, tapándolo con una lámina de parafilm y se colocó en un espectrofotómetro Beckam Inc. (USA). Se llevó a cabo una cinética continua a 470 nm durante 60 segundos, tomando valores cada 10 segundos. Como controles positivos se realizó una cinética con $2 \mu\text{l}$ de una peroxidasa de extracto crudo de nabo y una peroxidasa de rábano picante (HRP) comercial. Posteriormente, se repitió el mismo procedimiento modificando los volúmenes de cultivo, se colocó 300 y $500 \mu\text{l}$ haciendo una cinética continua de 10 min. Para calcular la unidades de enzima se utilizó la Ley de Lambert y Beer, $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ donde A es la absorbancia, C es la concentración, l es el espesor recorrido (donde siempre es igual a 1) y ϵ es el factor de concentración (es un número constante).

IV.2.1.2 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos modificados por la adición de HRP

En función de los resultados obtenidos, este experimento tiene como objetivo evaluar el comportamiento del catabolismo de AIA en E109 con la adición de una peroxidasa del tipo comercial, sobre la base que este tipo de enzimas interviene en la degradación de la fitohormona.

B. japonicum E109 se cultivó como se describió. Con una pipeta estéril se tomaron alícuotas de 5 ml de cultivo y se colocaron de manera individual en tubos de 10 ml de capacidad previamente esterilizados. Se obtuvo el sobrenadante, se tomaron 5 ml y se colocó en un tubo estéril. Este proceso se repitió para un total de seis tubos de ensayo, donde tres de ellos fueron expuestos a una temperatura de 90°C por 10 min. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. E109 con la adición de $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ y $20 \mu\text{l}$ de HRP comercial
2. Sobrenadante de E109 con la adición de $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ y $20 \mu\text{l}$ de HRP comercial
3. Sobrenadante desnaturalizado de E109 con la adición de $20 \mu\text{g.ml}^{-1}$ y $20 \mu\text{l}$ de HRP comercial.

Los tubos se incubaron a una temperatura de 30°C y 180 rpm de agitación, y se tomaron muestras periódicas de sobrenadante cada 2 horas y hasta la finalización del experimento, donde se cuantificó la concentración de AIA.

Nota: la concentración de AIA utilizada es el doble de lo que en promedio produce *A. brasilense* Az39 en similares condiciones de cultivo (cepa utilizada como referencia sobre la producción de AIA). La concentración utilizada de HRP proviene de una estandarización previa, donde se evaluaron varias concentraciones y se eligió 20 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ debido a que demostró una mayor velocidad de degradación para la concentración de AIA antes mencionada.

IV.2.1.3 Catabolismo de AIA en sobrenadantes modificados por la adición de H_2O_2

El fundamento de la realización de este experimento, fue evaluar si el agregado de H_2O_2 , uno de los sustratos de la enzima peroxidasa, aumentaba la velocidad en la degradación de AIA en cultivos de E109. Para ello, se obtuvo un cultivo de E109 y se centrifugó para la obtención del sobrenadante. Con una pipeta estéril se fraccionaron 5 ml de cultivo y se colocaron en tubos de ensayo para establecer los siguientes tratamientos:

1. Sobrenadante de E109 con la adición de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AIA
2. Sobrenadante de E109 con la adición de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AIA y 20 μM de H_2O_2

Luego de analizar los resultados de este primer experimento, se procedió a repetir la metodología aumentando la concentración de la solución de H_2O_2 y utilizando medio EMA para control. Los tratamientos fueron:

1. Medio EMA con la adición de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AIA y 80 μM de H_2O_2
2. Sobrenadante de E109 con la adición de 10 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AIA y 80 μM de H_2O_2

Los tubos se incubaron a una temperatura de 30°C y 180 rpm de agitación y luego de 2 horas se tomaron muestras periódicas cada 30 minutos en el primer experimento y cada 60 minutos en el segundo experimento, hasta la finalización del ensayo, donde se cuantificó la concentración de AIA.

IV.2.1.4 Construcción de una mutante Δper12 de *B. japonicum* E109

La construcción de la mutante deficiente en la enzima peroxidasa (EC.1.11.1.7) se realizó en colaboración con el Dr. Elías Mongiardini del Laboratorio de Interacción *Bradyrhizobium*-Soja del Instituto de Biotecnología y Biología Molecular de La Plata. Este laboratorio cuenta con una amplia experiencia en la construcción de mutantes en el modelo de *B. diazoefficiens* USDA110 (Quelas et al., 2010; Althabegoiti et al. 2011; Quelas et al., 2013; Mongiardini et al., 2016; Mongiardini et al., 2017).

La secuencia blanco para el procedimiento de mutagénesis se obtuvo sobre la base del análisis genómico de *B. japonicum* E109 a través del sistema RAST en el que se identificaron 2 secuencias codificantes relacionadas con la actividad peroxidasa, la fig375.26.pcg.786 y la

fig|375.26.peg.5242. La elección de solo una de ellas para la intervención molecular se fundamentó en los siguientes hechos: (1) debido a las características del género y a la complejidad del procedimiento resulta difícil obtener dobles mutantes para cualquier carácter en *B. japonicum*; (2) la mutación de uno de los genes produciría una disminución de la actividad peroxidasa y (3) la secuencia seleccionada no tenía asociada una actividad catalasa (EC 1.11.1.6), como en el caso de la fig|375.26.peg.786. Las conjugaciones fueron realizadas empleando la técnica de (Simon et al., 1989) con modificaciones menores según se indica a continuación. En un microtubo de polipropileno de 1.5 ml se mezclaron 0.5 ml de la cepa donadora que llevaba el plásmido de interés a una DO₆₂₀ de 0.4-0.5 con 0.9 ml de un cultivo de igual DO de la cepa *B. japonicum* E109. La mezcla fue luego centrifugada a 3.000 *xg* durante 8 min y el pellet se re suspendió suavemente en aproximadamente 50-75 μ l de medio de cultivo. Dicha suspensión fue colocada en una placa de Petri con medio sólido PSY sin antibióticos e incubada a 28°C durante 48 horas. Finalmente, la mezcla de bacterias donadoras con el plásmido y E109 fue re suspendida en agua bidestilada estéril y plaqueada en medio sólido suplementado con gentamicina y kanamicina para la selección de transconjugantes. En todas las conjugaciones se realizaron controles en los que sólo se agregaron ya sea la bacteria donadora o E109. La selección de los mutantes fue por resistencia a gentamicina y sensible a kanamicina y el chequeo por PCR con primers externos.

La técnica de PCR, brevemente, consistió de una desnaturalización por calor de la doble hebra de ADN (95°C por 5 a 10 min), luego un enfriamiento para permitir que el cebador se una a su secuencia complementaria en el ADN molde (40-68°C durante 20-40 segundos), y la posterior elongación de la cadena por la ADN polimerasa, tomando el ADN molde para sintetizar la cadena complementaria y partiendo del cebador como soporte inicial necesario para la síntesis de nuevo ADN. Así se repitieron los ciclos. Los primers utilizados en la PCR fueron:

1. PerEXT5FW: GGGGAGTATTGCTGCCACTT
2. PerEXT3RV: GCACCGAAGAAAAGCACCTG

IV.2.1.5 Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 Δ per12

B. japonicum E109 se cultivó como se describió. La mutante *B. japonicum* E109 Δ per12 (Clon 12) se cultivó en las mismas condiciones que la cepa salvaje, pero dado que contiene un plásmido con resistencia a gentamicina, el caldo de cultivo y las placas de EMA contenían gentamicina en una concentración final de 50 μ g.ml⁻¹ para mantener la presión de selección.

Para evaluar el comportamiento de la mutante Δ per12 frente a la cepa salvaje E109, se procedió a evaluar la capacidad de catabolizar diferentes concentraciones de AIA en sistemas controlados. Una vez crecidas ambas cepas hasta principios de la fase exponencial, se tomaron 50 ml de cultivo y se

centrifugó como se describió. Los sobrenadantes de cada una de las cepas se fraccionaron en tubos de borosilicato estériles en los siguientes tratamientos:

1. Sobrenadante de E109 con la adición de 10-20-30-40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AIA
2. Sobrenadante de la mutante E109 $\Delta\text{per}12$ con la adición de 10-20-30-40 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ de AIA

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

IV.2.1.6 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos puros de E109 y E109 $\Delta\text{per}12$

Como en los ensayos de catabolismo, se utilizó la metodología descrita anteriormente para el crecimiento de la bacteria salvaje y mutante. Luego de 72 horas de agitación, se procedió tomar alícuotas de cada microorganismo y dividir las de acuerdo a los siguientes tratamientos:

1. Cultivo de E109 con la adición 40 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ de AIA
2. Cultivo de $\Delta\text{per}12$ con la adición 40 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ de AIA
3. Medio EMA con la adición 40 $\mu\text{l}.\text{ml}^{-1}$ de AIA

Al igual que en las evaluaciones de catabolismo previas, los tubos se colocaron en similares condiciones experimentales y se evaluaron con la misma metodología.

IV.2.2 Análisis del perfil de proteínas presentes en E109 potencialmente relacionadas con la degradación de AIA

IV.2.2.1 Búsqueda de secuencias codificantes el catabolismo de AIA en el genoma de E109

De acuerdo a la información obtenida en relación al catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109, así como de la existencia de trabajos publicados en otros modelos biológicos en relación al catabolismo asimilativo de auxinas, se desarrolló una nueva búsqueda de secuencias codificantes en el genoma de E109, tomando como referencia el clúster *iac* de *P. putida* 1290 ya que se encuentra caracterizado (Leveau y Gerards, 2008). Así, para la búsqueda de los genes *iac* en E109 se utilizó la base de datos NCBI tomando *P. putida* 1290 como cepa de referencia. El procedimiento de manera general fue el siguiente:

1. Búsqueda de las secuencias de las proteínas *iac* en la base de datos de NCBI-Proteína (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/>)
2. Obtención de las secuencias FASTA de las proteínas codificadas por los genes *iac*
3. Búsqueda de la proteína similar en el genoma de E109, a través de la herramienta blastp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)
4. Análisis de las secuencias obtenidas.

Además de las búsquedas en el genoma de E109 se adicionaron búsquedas en el genoma de *H. seropedicae* SmR1, ya que esta bacteria tiene la capacidad de catabolizar AIA de manera asimilativa mediante el clúster de genes *iac* (comunicación personal Prof. Emanuel de Souza) y la secuencia de su genoma se encuentra disponible en las bases de datos (Pedrosa et al., 2011).

IV.2.2.2 Perfil proteómico del catabolismo de AIA en E109

Sobre la base del análisis bioinformático, se realizó el análisis bioquímico del perfil de proteínas secretadas al sobrenadante del medio de cultivo de E109, con el objetivo de verificar si alguna de las proteínas homóloga a las del clúster *iac* de *P. putida* 1290 se encontraba en el sobrenadante de *B. japonicum* E109. Para ello, se obtuvieron 100 ml de cultivo en fase estacionaria, a los que se adicionaron 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Se incubó en las mismas condiciones descritas anteriormente durante 24 horas. Luego de este período de tiempo, se controló la pureza del cultivo y se midieron los siguientes parámetros referenciales: DO_{595} , recuento de microorganismos, concentración de AIA y cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Brevemente, para medir el contenido de proteínas por el método de Bradford, se tomó 1 ml de cultivo y se centrifugó 10 min a 10 rpm, se tomaron 200 μl de sobrenadante y se agregaron 800 μl del reactivo de Bradford (10 mg de Comassie Blue G-250 con 10 ml de fosfórico al 88% y 4.7 ml de etanol absoluto). Luego se añadió agua destilada hasta completar un volumen de 100 ml, se homogenizó la muestra y se midió la absorbancia a DO_{595} , para convertir los valores a $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de proteínas teniendo en cuenta el factor de dilución de las muestras. Se tomaron 45 ml del cultivo y se centrifugaron a 8000 rpm a 4°C. Se repitió el procedimiento para lograr la máxima separación de EPS en el medio de cultivo. Luego, se tomaron 10 ml del sobrenadante con jeringa estéril y se filtró (con un filtro de 0.22 μm), colocando el filtrado en un tubo falcón de 15 ml de capacidad. El tubo se conservó a -20°C hasta su procesamiento. La muestra fue reducida con 20 mM de DTT (Ditiotreitol) durante 45 min a 56°C, luego fue alquilada con 20 mM de iodoacetamida durante 45 min en oscuridad. Luego se precipitó con ácido tricloroacético durante 30 min. Se centrifugó en frío y se lavó el pellet con acetona. Se dejó secar y se agregó buffer bicarbonato de amonio 50 mM para la digestión con tripsina. Al digerido con tripsina se les realizó una limpieza con Zip-Tip C18 para extraer las sales. La muestra fue liofilizada por Speed Vac y se re suspendió con 10 μl de ácido fórmico 0.1% (v/v). La muestra se analizó por nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que permitió en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión triptica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realizó por electrospray. El análisis de los datos obtenidos se realizó con el software Proteome Discoverer™-Thermo Fisher Scientific (USA).

IV.2.2.3 Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en E109

Este ensayo se realizó con el objetivo de confirmar la capacidad de E109 para usar AIA como única fuente de carbono en medio de cultivo definido. Para ello, se modificó la formulación del medio EMA (Vincent, 1970) reemplazando la fuente de carbono (manitol) por AIA y el extracto de levadura (dado que aporta hidrolizados de N y carbono) por glutamato de sodio. La formulación del medio EMA modificado, es la siguiente:

Tabla 19. Composición del medio EMA modificado

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

Brevemente, se obtuvo un cultivo de E109 con una DO₅₉₅ aproximadamente de 1, se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó 10 min a 10000 rpm y las células se re suspendieron en medio EMA (Vincent, 1970) como control y medio EMA modificado. Se tomó de cada medio 25 µl y se inoculó en tubos de borosilicato conteniendo 5 ml de medio EMA (Vincent, 1970) y EMA modificado. Este modelo experimental se realizó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos realizados se resumen a continuación:

1. Cultivo de E109 en medio EMA.
2. Cultivo de E109 en medio EMA modificado

Los tubos se incubaron en estufa a 30°C y con una agitación de 180 rpm durante 4 días. Los parámetros medidos fueron el crecimiento (DO₅₉₅) y el número de células viables (ufc.ml⁻¹).

IV.2.2.4 Evaluación del catabolismo de AIA en la mutante *B. diazoefficiens* 8620 para el gen *ngrC* (similar a *iacA*)

Para hacer una evaluación rápida del posible rol del gen *ngrC* de *B. diazoefficiens* sobre el catabolismo de AIA y evitar la generación de una nueva mutante de *B. japonicum* E109, se realizó un análisis filogenético en las bases de datos disponibles, indicando que *iacA* (acil-CoA deshidrogenasa) está estrechamente relacionada con *idoA* de *P. alcaligenes* PA-10 y el gen *ngrC* de *B. diazoefficiens* USDA110 (Alemayehu et al., 2004). El producto del gen, *nrgC*, se menciona en varios trabajos previos como un gen controlado por el regulador de la fijación de nitrógeno NifA (Nienaber et al. 2000). Gracias a la colaboración del Dr. Hans-Martin Fischer (Alemania) pudimos evaluar el comportamiento de una cepa conteniendo la mutación en el gen similar a *iacA* sobre el catabolismo de AIA.

Para ello, *B. diazoefficiens* USDA110 *spc4* (cepa salvaje) fue mutado en el gen *nrgC* y se denominó *B. diazoefficiens* 8620 (Nienaber et al., 2000). Tanto *B. diazoefficiens* USDA110 *spc4*, como 8620 se cultivaron en las mismas condiciones que *B. japonicum* E109, más el agregado de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de espectinomomicina y kanamicina. Una vez que las cepas llegaron a la fase exponencial, se fraccionaron los cultivos en un total de nueve tubos de borosilicato estériles. Este modelo experimental se evaluó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos fueron:

1. Cultivo de *B. japonicum* E109 con 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA
2. Cultivo de *B. diazoefficiens* USDA110 *spc4* con 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA
3. Cultivo de *B. diazoefficiens* 8620 con 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA

Los tubos se incubaron a 180 rpm a 30°C, y se tomaron muestras cada 2 h hasta la finalización del ensayo. En cada punto de muestreo se evaluó la concentración de AIA, como se describió.

IV.2.3 Actividad de la enzima codificada por el gen *iacC* para el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109

IV.2.3.1 Análisis in silico del genoma

Se determinó la presencia de genes relacionados con el clúster descrito para el catabolismo de AIA en el genoma de *B. japonicum* E109 y se compararon las secuencias de las proteínas predichas con las obtenidas previamente para *B. diazoefficiens* USDA110 y *P. putida* 1290. Para el análisis se utilizó KEGG (Kanehisa et al., 2012) y RAST (Aziz et al., 2008).

IV.2.3.2 Construcción de la mutante *B. japonicum* E109 Δ *iacC*

Al igual que la mutante deficiente en la enzima peroxidasa, esta mutante fue construida gracias a la colaboración del Dr. Elías Mongiardini.

La secuencia blanco para el procedimiento de mutagénesis se obtuvo sobre la base del análisis genómico de *B. japonicum* E109 en el que previamente se identificó una secuencia codificante homóloga al gen *iacC* de *P. putida* 1290 identificada como GenBank: AJA64126.1 en la anotación del genoma en la base de datos de NCBI, correspondiente a una oxidoreductasa o 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa (EC 1.14.1.-) según RAST. A nivel molecular, se empleó la técnica de delección limpia y contra-selección por sacarosa mediante la utilización del plásmido pK18mobSacB (Schäfer et al., 1994). Para la obtención de la construcción que lleva las regiones homólogas río arriba y río abajo respecto de la región a deleccionar se emplearon técnicas de clonado convencionales (PCR y digestiones con enzimas de restricción) de acuerdo con Sambrook et al. (1989). Para la reacción de PCR se utilizaron los primers FWiacCE (AAAAGAattcGCTGGGTCTATGTCGGGC [EcoRI]) y RViacCH (AAAaagcttGACCTGCCACTGCATCGT [HindIII]) que permiten amplificar la región comprendida entre las bases 6.365.033 a 6.363.748 del genoma de *B. japonicum* E109. Este fragmento fue purificado de gel y digerido con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII que se agregaron en la secuencia de los primers. El producto se clono en el vector pK18mobSacB digerido con las mismas enzimas de restricción dando el plásmido pK18Sac::*iacCBj*. Una vez obtenido el clon deseado, el fragmento se digirió con la enzima SalI que libera un fragmento de 458 pb del inserto. El plásmido digerido fue purificado del gel y religado. De esta manera se obtuvo la construcción final, pK18Sac::*ΔiacCBj*, llevando los fragmentos homólogos río arriba y río abajo al fragmento que se desea deleccionar. Una vez obtenida la construcción final, se realizaron las respectivas conjugaciones de acuerdo a Simon et al. (1989) con modificaciones menores de acuerdo a Quelas et al. (2010). De esta conjugación se obtuvieron recombinantes simples resistentes a Km que llevan el plásmido transferido recombinado en el cromosoma por cualquiera de los dos fragmentos homólogos. Una vez verificada la inserción simple por una de la regiones homologas se indujo la doble recombinación que resuelve el plásmido dejando la región intacta como en la cepa salvaje o deleccionada. La identificación de una u otra posibilidad se realizó mediante una reacción de PCR que amplifica desde regiones externas a la zona de recombinación. Las mutantes obtenidas fue denominadas *B. japonicum* E109 *ΔiacC*.

IV.2.3.3 Construcción de la mutante complementada de *B. japonicum* E109 *ΔiacC*

Restauramos el fenotipo de la mutante E109 *ΔiacC*. Para la obtención de E109 *ΔiacC*/pJN105 *iacC* se obtuvieron células competentes en *E. coli* S-17 conteniendo el plásmido pJN105 (pBBR) (Newman y Fuqua, 1999) con los fragmentos clonados de *iacCD* inducible en arabinosa. *E. coli* S-17 creció en medio LB modificado con la adición de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de gentamicina; mientras que *B.*

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

japonicum E109 lo hizo en medio PSY con arabinosa. Al momento de la conjugación, el cultivo de *E. coli* S-17 fue diluido 1/100 en medio LB sin antibióticos y creció hasta alcanzar una $DO_{595}=0.8-1$. Posteriormente, se realizó una mezcla de 900 μ l del cultivo en fase exponencial de E109 con 400 μ l de S-17. Los cultivos se centrifugaron durante 8 min a 3000 rpm y el pellet se re-suspendió y colocó en una placa de medio fresco PSY con arabinosa agarizado. Las placas se incubaron por 48 horas a 30°C y luego se recolectó colonia generada y se resuspendió en 1 ml de solución fisiológica, donde se homogenizó. Se sembró 150 μ l del homogenato de conjugación en medio EMA con 50 μ g.ml⁻¹ gentamicina y las placas se incubaron en las condiciones mencionadas previamente por 72-96 h. Evaluamos la restauración del fenotipo de la mutante E109 $\Delta iacC$ /pJN105 *i acC* utilizando E109 (wt) y E109 $\Delta iacC$ como controles. El procedimiento llevado a cabo es el descrito en el ítem a continuación.

IV.2.3.4 Biosíntesis de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$

Se obtuvieron dos cultivos de *B. japonicum* E109 y la mutante *B. japonicum* E109 $\Delta iacC$ como se mencionó, con la adición de L-Trp para la síntesis de AIA. A partir de las 24 h de crecimiento (DO_{595}), y cada 12 h se tomaron muestras de 1 ml para medir el crecimiento (DO_{595}) y correlacionarlo con la concentración de AIA en medio de cultivo. Se realizaron además los controles de calidad relacionados con la pureza del cultivo

IV.2.3.5 Evaluación del catabolismo de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$

Tanto E109 como la mutante $\Delta iacC$ se cultivaron como se describió anteriormente. Los cultivos se mantuvieron en agitación hasta llegar a una $DO_{595}=0.8$ correspondiente con una fase exponencial temprana de crecimiento. Con una pipeta estéril se tomaron alícuotas de 5 ml de cultivo y se colocaron de manera individual en tubos de borosilicato previamente esterilizados. Este modelo experimental se realizó por triplicado para cada cepa y para cada condición experimental. Luego de un período de adaptación de 15 min, se establecieron dos condiciones experimentales:

1. E109 con la adición de 40 μ g.ml⁻¹ de AIA
2. E109 $\Delta iacC$ con la adición de 40 μ g.ml⁻¹ de AIA

Como parámetros de mayor interés fueron evaluados el crecimiento bacteriano como DO_{595} (antes de la inducción y al final de la incubación) y la concentración de AIA (μ g.ml⁻¹) en función del tiempo. Para ello, se tomaron muestras del medio de cultivo cada 2 h.

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

IV.2.9 Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos de los resultados obtenidos se realizaron a través del software *InfoStat*, versión 2008, Grupo InfoStat. (Di Rienzo et al. 2008). Los análisis estadísticos realizados fue análisis de varianza (ANOVA), el test de comparación Tukey con un $p \leq 0,05$.

IV.3 RESULTADOS

Luego de identificar que en E109 existe una fuerte degradación de AIA, realizamos una búsqueda de posibles enzimas relacionadas con esta actividad. Una hipótesis para el catabolismo de AIA, fue conocer si una enzima del tipo peroxidasa producida y liberada al medio de cultivo por *B. japonicum* E109 era la responsable de la degradación de la fitohormona, por ello se desarrollaron los experimentos a continuación.

IV.3.1 Actividad de la enzima peroxidasa para el catabolismo de AIA en E109

IV.3.1.1 Detección de la actividad peroxidasa en cultivos de E109

El objetivo de este experimento fue detectar y cuantificar actividad de la enzima peroxidasa en cultivos de E109, como posible responsable del catabolismo de AIA. En la bibliografía no existen protocolos para la determinación de la actividad peroxidasa en bacterias PGPR, por ello usamos como protocolo base un método para evaluar la cinética de la actividad de peroxidasas presentes en extractos vegetales. Esta etapa del trabajo fue desarrollada en colaboración con la Dra. Melina Talano del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNRC. Para ello, se utilizaron dos tipos de enzimas como control, una extraída de manera artesanal de plantas de nabo denominada Extracto Crudo de Nabo (ECN) y una peroxidasa comercial (HRP).

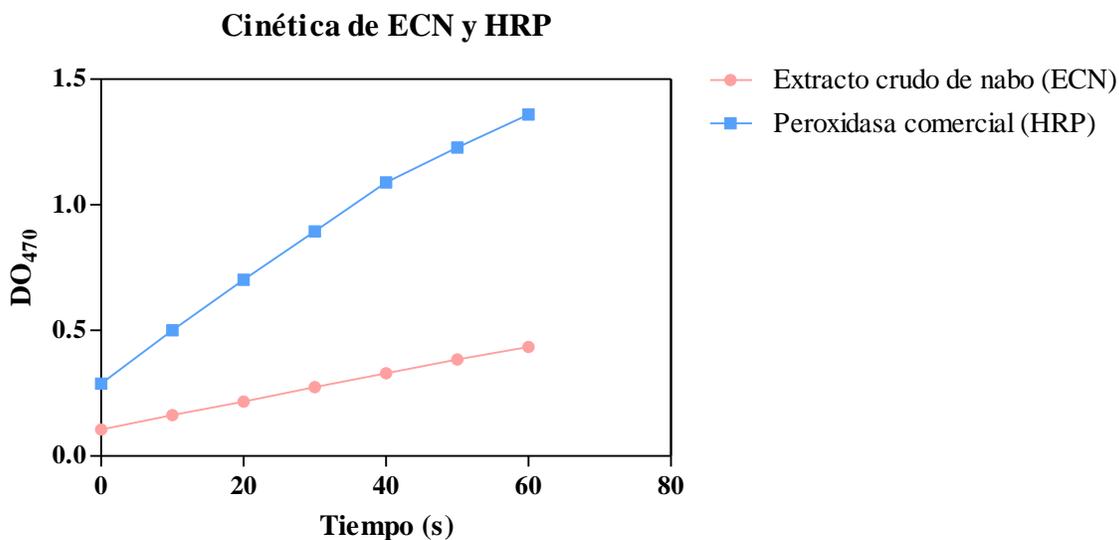


Figura 57. Valores de DO_{470} de la cinética de ECN y HRP en función del tiempo.

Según la Ley de Lambert y Beer, $A = \epsilon \cdot l \cdot C$ se calculó el promedio de la densidad óptica, ΔDO_{470} , que coincidió con el arrojado por el equipo, y se calcularon las unidades de enzima en cada caso. Para ECN en los 2 μ l agregados hay 28,31 μ moles o U (unidades de enzima); mientras que para HRP

hay 94,69 μ moles o U (unidades de enzima). Estos valores obtenidos por la evaluación de la actividad peroxidasa de las enzimas de origen comercial y extraídas en el laboratorio nos permitieron validar el procedimiento de evaluación y por ello decidimos evaluar la actividad de esta enzima en cultivos puros de *B. japonicum* E109.

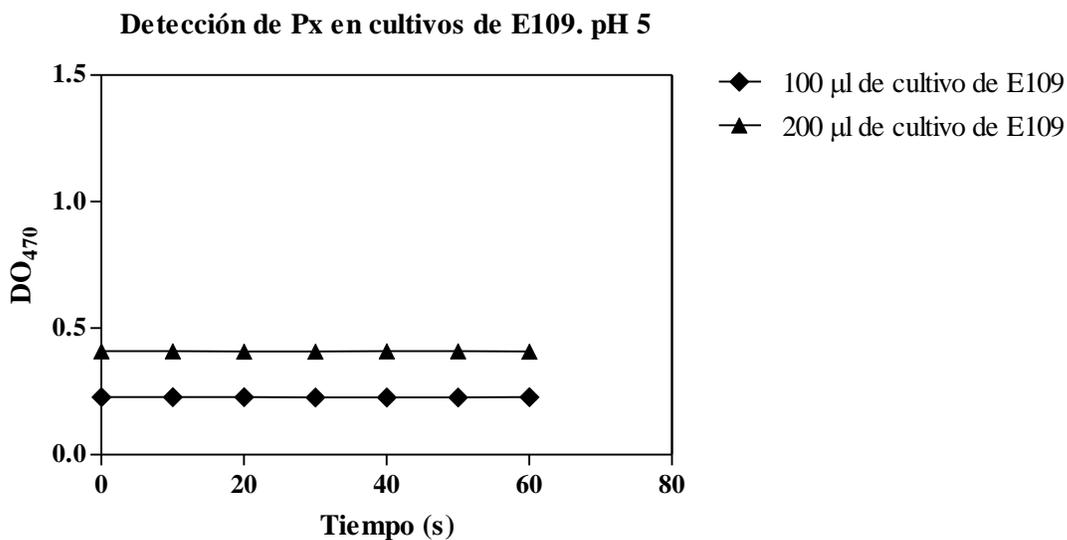


Figura 58. Valores de DO₄₇₀ para los ensayos de cinética desarrollados en 100 y 200 μ l de medio de cultivo puros de *B. japonicum* E109 a la mezcla de reacción a pH 5.

En la **Figura 58** se puede observar que los valores obtenidos fueron muy bajos y constantes a lo largo de la curva, por lo que no se pudo confirmar la presencia de la enzima o su actividad. A partir de estos resultados decidió realizar algunos cambios relacionados con la preparación de la mezcla de reacción, tales como, el agregado de un mayor volumen de medio de cultivo, la modificación del pH del buffer a 7, como así también el aumento del tiempo de reacción con mediciones más espaciadas entre los puntos. En este caso no se pudo aplicar la Ley de Lambert y Beer para conocer la cantidad de unidades de enzima, ya que la función no fue lineal.

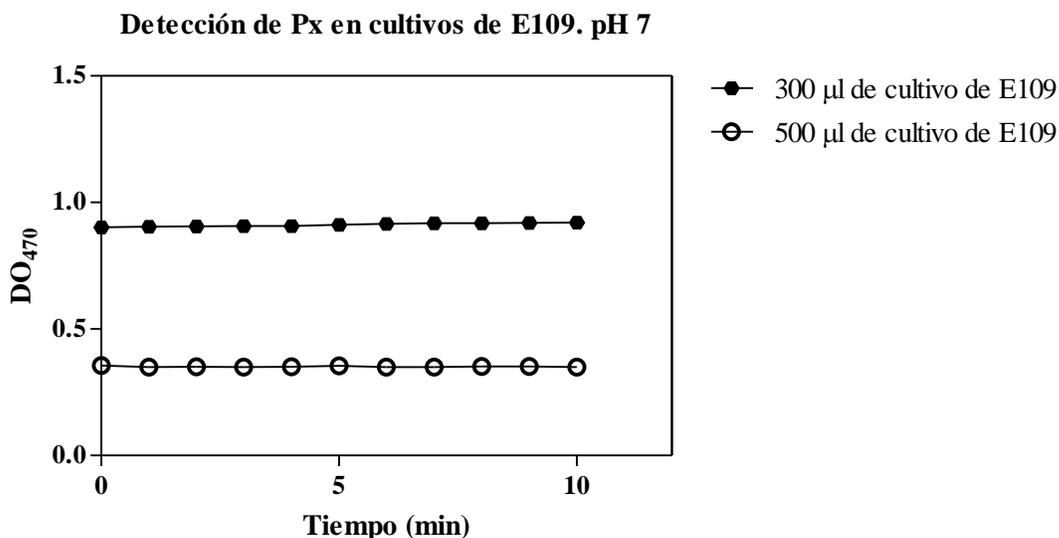


Figura 59. Valores de DO_{470} para los ensayos de cinética desarrollados en 300 y 500 µl de medio de cultivo puros de *B. japonicum* E109 a la mezcla de reacción a pH 7.

En la **Figura 59** podemos observar un comportamiento similar al anterior donde los valores fueron bajos y constantes a lo largo del tiempo, aunque mayores que los obtenidos a pH 5. Como lo hemos mencionado previamente, detectamos la presencia de dos secuencias codificantes para enzimas del tipo peroxidasa en el análisis funcional del genoma de E109, pero en estos ensayos preliminares no pudimos cuantificar actividad biológica del tipo peroxidasa, motivo por el cual decidimos utilizar una nueva estrategia que se detalla a continuación.

IV.3.1.2 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos de E109 modificados por la adición de HRP

Existen reportes que demuestran que enzimas del tipo peroxidasa podrían ser responsables del catabolismo de auxinas en células vegetales (Savitsky et al., 1999; Mathesius, 2001), evaluamos si la adición de HRP modificaba la velocidad de degradación de AIA en cultivos puros de *B. japonicum* E109.

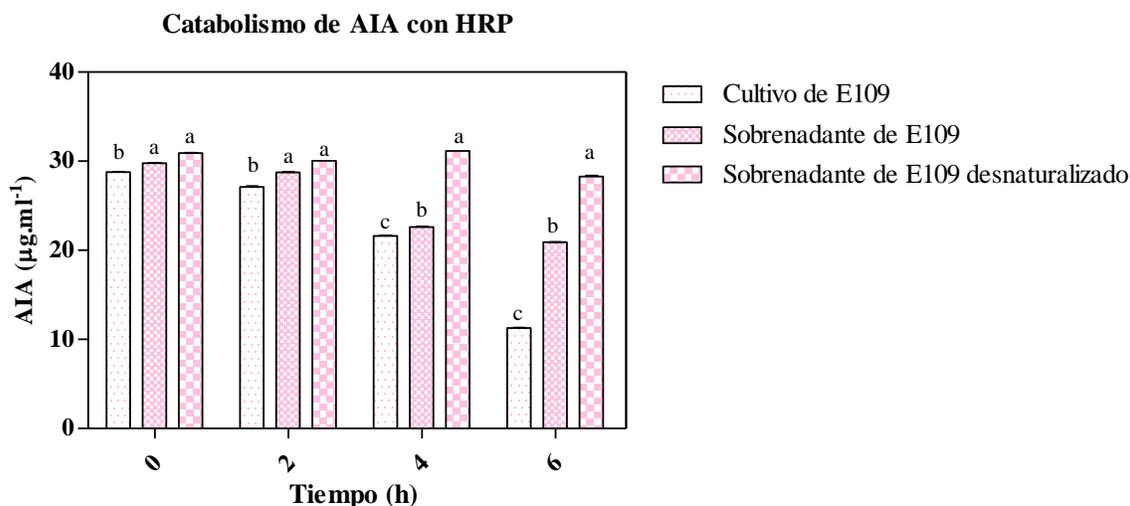


Figura 60. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos y sobrenadantes de E109 modificados por la adición exógena de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y HRP. Las barras representan el promedio y la T el SD ($n=3$). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

Como se observa en la **Figura 60**, en el tratamiento del cultivo de E109 con la adición exógena de AIA y HRP, hubo una disminución de la concentración de la hormona en función del tiempo (h) a las 6 horas, de un 50% aproximadamente de la concentración, y luego de las 24 horas no se detectó el compuesto en el medio de cultivo. Lo mismo ocurre para el tratamiento de sobrenadante de un cultivo de E109, se observa la degradación de la hormona sin cambios en la velocidad. Por último, en el caso del el tratamiento de sobrenadante desnaturalizado de E109, se observa que la concentración de AIA es la misma respecto de la concentración inicial a lo largo del tiempo y que la adición de la enzima HRP no revierte este comportamiento. Resumiendo, estos comportamientos son idénticos a los demás ensayos de catabolismo, es decir, que la adición de HRP a los tratamientos de cultivos y sobrenadantes no modifica la velocidad de degradación de AIA.

IV.3.1.3 Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de E109 modificados por la adición de H_2O_2

El H_2O_2 es sustrato de numerosas peroxidasas vegetales, si bien hay algunas de estas enzimas que pueden prescindir de su presencia para funcionar como en el caso de las que usarían el AIA como sustrato de la reacción. En nuestro laboratorio se han llevado a cabo experimentos preliminares donde se evaluó el comportamiento del catabolismo de AIA en condiciones de estrés oxidativo y para los que se usó H_2O_2 como compuesto efector de la condición de estrés *B. japonicum* E109

(Pierantonelli, 2012). En los experimentos de este trabajo, evaluamos la adición de dos concentraciones de H_2O_2 a sobrenadantes obtenidos de cultivos puros de *B. japonicum* E109 con el objetivo de verificar si la velocidad del catabolismo de AIA, como consecuencia de la posible competencia del peróxido sobre el AIA como sustrato de las peroxidasa presentes en el sobrenadante del cultivo, mostraba alguna variación.

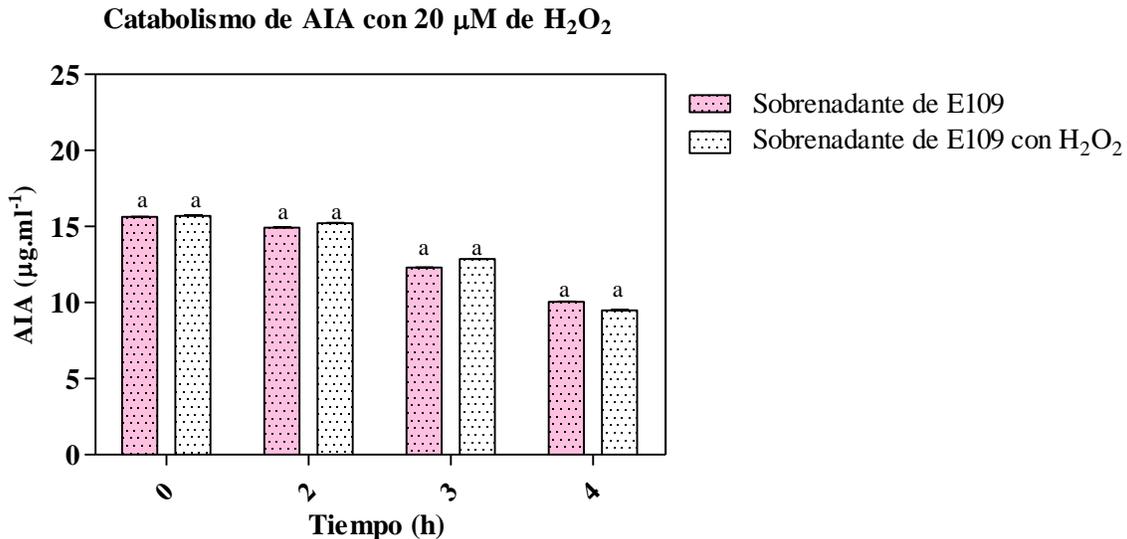


Figura 61. Concentración de AIA ($\mu g.ml^{-1}$) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 modificados por la adición exógena de AIA ($\mu g.ml^{-1}$) y 20 μM de H_2O_2 . Las barras representan el promedio y la T el SD (n=2). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

Cuando evaluamos la adición de 20 μM de H_2O_2 observamos que el catabolismo de AIA es similar al control, sin el agregado del peróxido. No se observa un aumento o retraso en la velocidad de degradación de la hormona. Llevamos a cabo una nueva evaluación del catabolismo con un aumento en la concentración de peróxido.

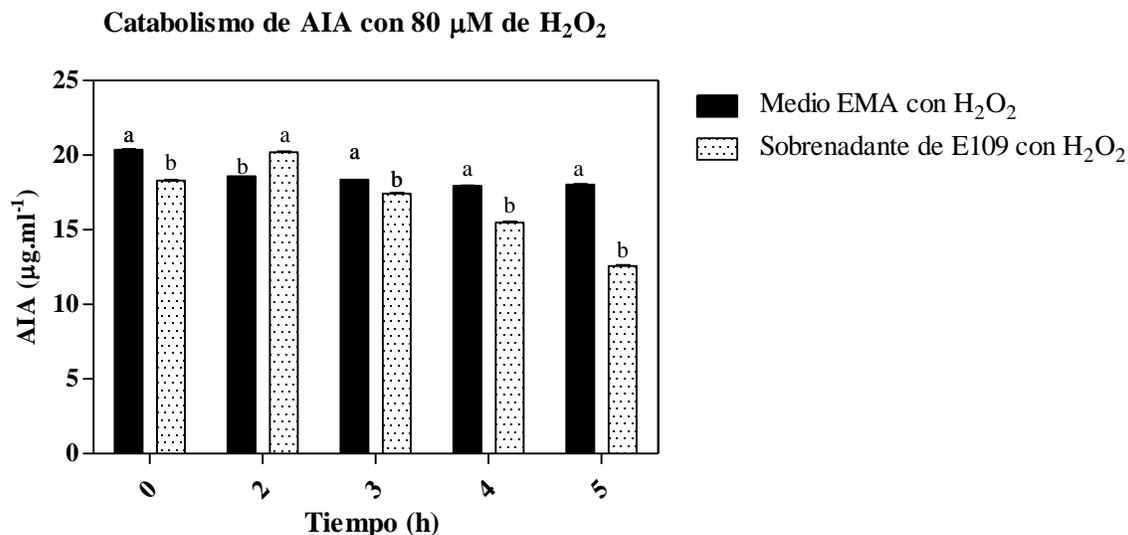


Figura 62. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadante de E109 y medio EMA, modificados por la adición exógena de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y 80 μM de H₂O₂. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=2). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

Como se puede observar en la **Figura 62**, el nivel de AIA en el tratamiento del medio de cultivo sin la bacteria (EMA) con 80 μM de H₂O₂, se mantuvo constante hasta al final del experimento indicando que el peróxido no sería capaz de degradar *per se* la hormona en estas condiciones experimentales. En el caso del segundo tratamiento, el sobrenadante de E109 degradó la hormona un 50% en las 5 primeras horas luego de la inducción, comportamiento que habíamos confirmado en ensayos preliminares. Esto indicaría que el H₂O₂ no afectaría el comportamiento en la degradación de AIA en relación a la velocidad observada en ensayos similares en los que no se adicionó este compuesto.

IV.3.1.4 Construcción de una mutante de *B. japonicum* E109 Δ per

Se llevó a cabo una mutación con una deleción en el gen que codifica para una peroxidasa (EC.1.11.1.7) ubicada en la fig|375.26.pcg.5242 del genoma de E109. Como resultado del proceso de mutagénesis, se obtuvieron cuatro clones de la mutante (Δ per) denominados clones Δ per8, Δ per9, Δ per10 y Δ per12.

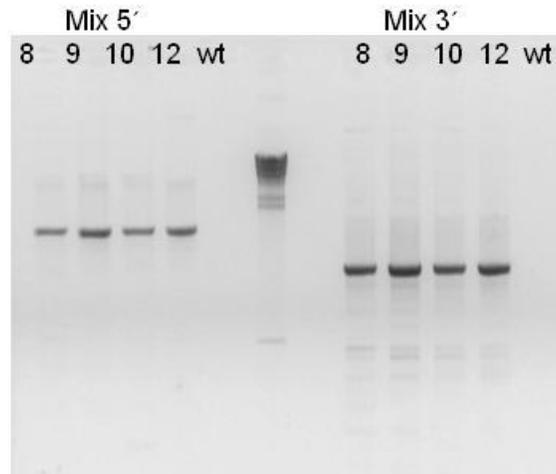


Figura 63. Electroforesis de gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de estudio en el que se muestra el producto de amplificación de Δper . En cada uno de los pozos corresponden a clones de *E. coli* DH5- α con diferentes mix de primers.

Se llevó a cabo un ensayo de screening de los cuatro clones de *B. japonicum* E109 (Δper) y debido a que todos tuvieron un comportamiento similar entre sí, se seleccionó el clon $\Delta per12$ para los ensayos detallados a continuación.

IV.3.1.5 Evaluación del catabolismo de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 $\Delta per12$

Evaluamos la degradación de AIA en sobrenadantes de E109, con diferentes concentraciones de la hormona.

Catabolismo de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA

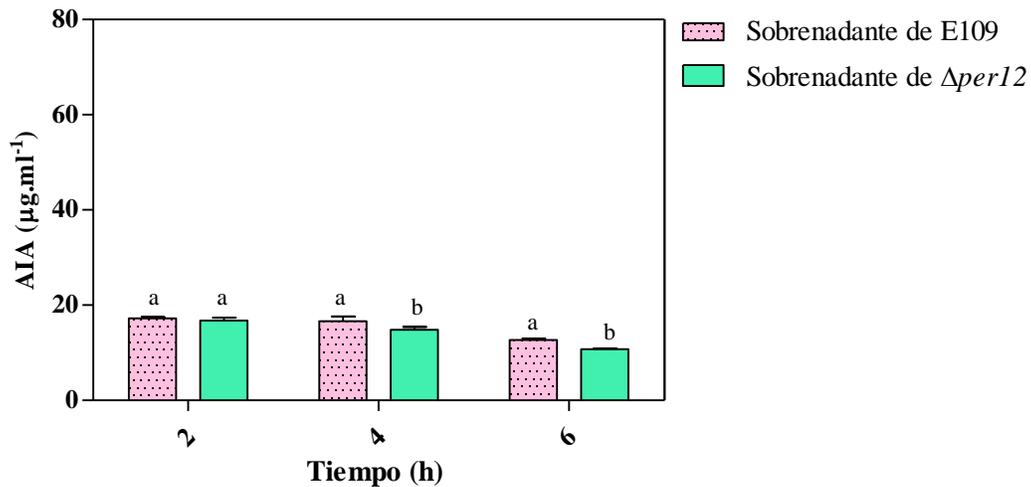


Figura 64. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y la mutante E109 $\Delta\text{per}12$, modificados por la adición exógena de $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

En la **Figura 64** se puede observar que hubo una pequeña diferencia significativa, a nivel de la degradación de la AIA entre ambas cepas pero ambas degradaron la misma cantidad del AIA adicionado. En este ensayo se evaluaron los sobrenadantes, debido a que en experimentos anteriores se comprobó que en tales fracciones se obtenía actividad catalítica sobre la hormona. La mutante demostró que aun deficiente en la enzima peroxidasa, es capaz de catabolizar la hormona en el sobrenadante de cultivos bacterianos. Como se observó una tendencia catabólica positiva luego de 6 horas de incubación desde el agregado de la hormona a favor del mutante y aun teniendo en cuenta que este resultado era absolutamente opuesto al esperado, decidimos realizar un nuevo experimento aumentando la concentración de AIA adicionada de manera exógena para verificar si la capacidad catalítica del mutante era mayor que la de la cepa salvaje.

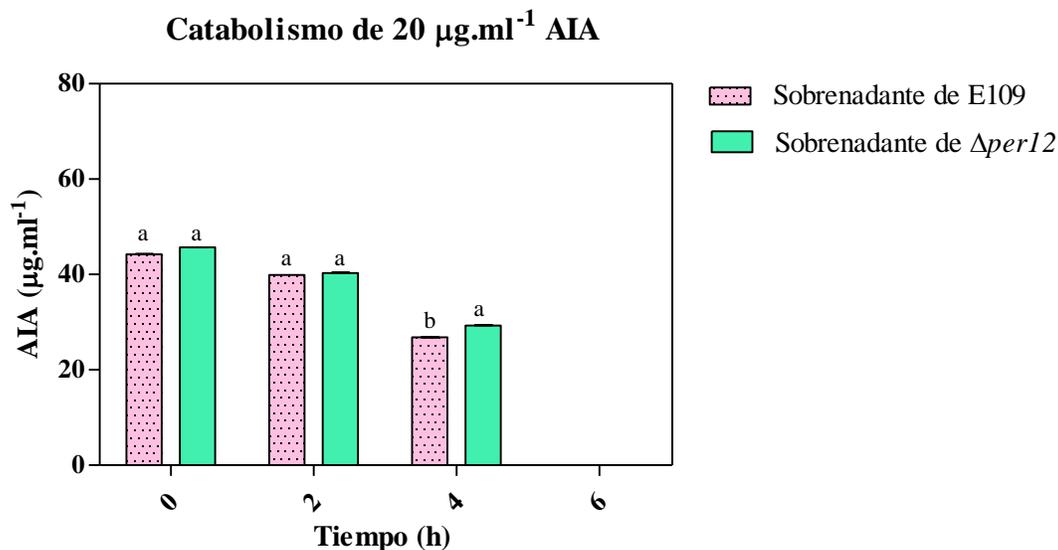


Figura 65. Concentración de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y la mutante E109 $\Delta\text{per}12$, modificados por la adición exógena de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

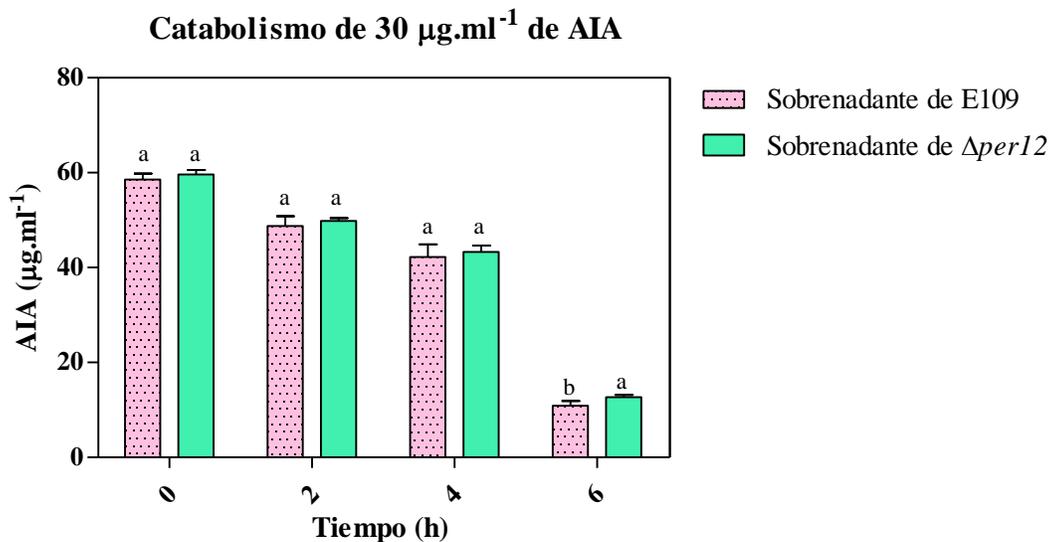


Figura 66. Concentración de AIA en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y la mutante E109 $\Delta\text{per}12$, modificados por la adición exógena de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

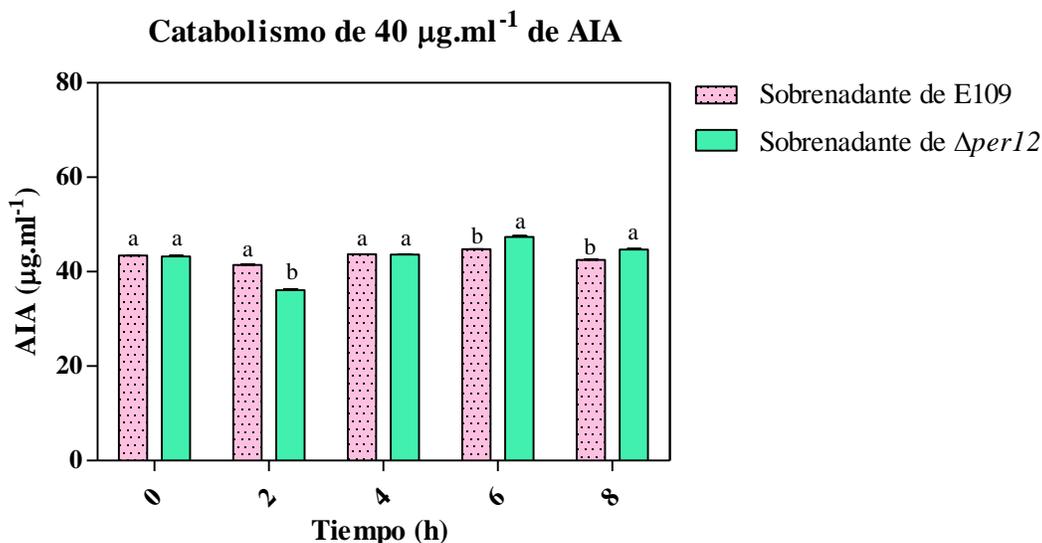


Figura 67. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 y la mutante E109 $\Delta\text{per}12$, modificados por la adición exógena de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey $p < 0,05$.

Como se observa en las figuras el agregado de mayores concentraciones de AIA no modificó el comportamiento catabólico sobre la hormona de la cepa salvaje y la mutante deficiente en la peroxidasa y ambos microorganismos tuvieron un comportamiento similar en relación a la velocidad con la que ocurrió el catabolismo. Otro resultado inesperado de este experimento se observó por la adición de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA en el que no se observó degradación de la hormona luego de 8 horas post-inducción en ninguno de los dos tratamientos evaluados. Esto despertó nuestra curiosidad en saber qué es lo ocurriría más allá de las 8 horas, entonces se repitió el ensayo dejándolo hasta ver la desaparición de la hormona y se observó que los sobrenadantes de E109 y E109 $\Delta\text{per}12$ con 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA tardaron al menos 48 horas en degradar el 90% de la hormona adicionada exógenamente (datos no mostrados).

III.3.1.6 Evaluación del catabolismo de AIA en cultivos puros de E109 y E109 $\Delta\text{per}12$

De acuerdo a los resultados del experimento anterior, se pudo observar que el catabolismo de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA en sobrenadantes de E109 y E109 $\Delta\text{per}12$, no se produjo hasta las 48 horas luego de la inducción con la hormona, por lo que decidimos evaluar la misma concentración de la hormona en cultivos puros de cada cepa.

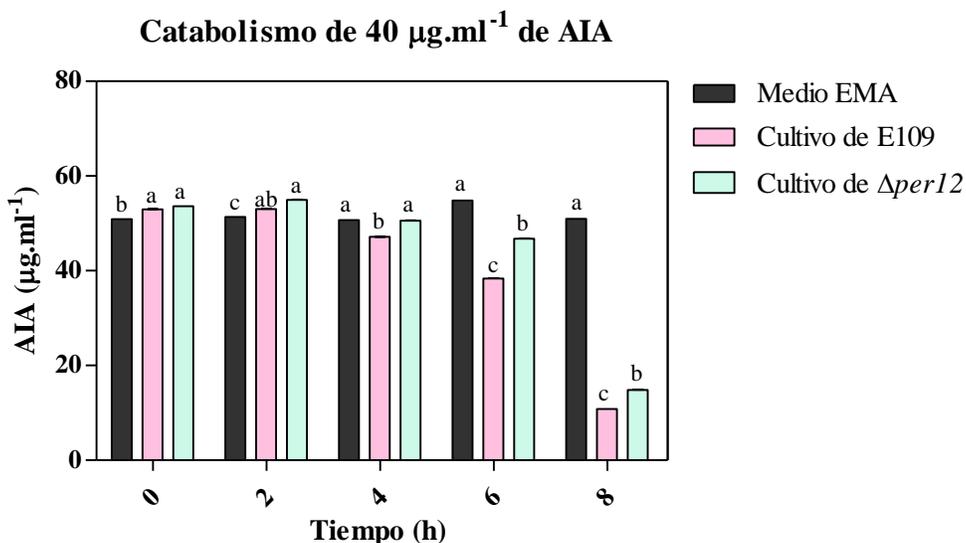


Figura 68. Concentración de AIA ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109 y la mutante $\Delta\text{per}12$, modificados por la adición exógena de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA. Las barras representan el promedio y la T el SD (n=3). Letras diferentes representan diferencias significativas por la prueba de Tukey p < 0,05.

En la **Figura 68** se puede observar que tanto en la cepa salvaje como en la mutante E109 $\Delta\text{per}12$ la degradación de la hormona ocurre dentro de las 8 horas posteriores a la adición de la hormona, en un porcentaje de un 90% en relación a la concentración inicial para el caso de la E109 y en un 80% para el caso de E109 $\Delta\text{per}12$.

Resumiendo; los resultados obtenidos en la degradación de la fitohormona relacionados a la peroxidasa, nos mostraron que esta enzima no es la responsable del catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109. Esto nos obligó a re-direccionar la búsqueda de otra enzima por el que el microorganismo sería capaz de degradar el AIA en medio de cultivo.

IV.3.2 Análisis del perfil de proteínas de E109 relacionadas con la degradación de AIA

IV.3.2.1 Búsqueda bioinformática de secuencias codificantes relacionadas con el catabolismo de AIA en el genoma de E109

Según los reportes de Olesen y Jochimsen (1996) las dos enzimas responsables del catabolismo de AIA hasta ácido antranílico serían la isatina reductasa, que reduce el dioxindol a isatina, y este compuesto se convierte a ácido isatínico por acción de la isatina amidohidrolasa. Previamente

Egebo et al. (1991) sugirieron que la molécula de AIA se degradaría por una abertura oxidativa del anillo de indol en una reacción análoga a la catalizada por la triptófano 2,3-dioxigenasa. Realizamos la búsqueda de estas enzimas en el genoma de E109 a través de la base de datos NCBI y solo se identificó una secuencia similar a la enzima triptófano 2,3-dioxigenasa. Debido a que nunca hubo reportes relacionados a esta enzima con la degradación de AIA, procedimos a iniciar una nueva búsqueda, utilizando como referencia las secuencias codificantes del clúster de catabolismo asimilativo reportado para *P. putida* 1290, dado que USDA110 posee una secuencia similar al gen *iacA* (Leveau y Gerards, 2008).

A continuación se detallan los resultados del análisis bioinformático obtenido en NCBI utilizando la herramienta p-BLAST para el genoma de *B. japonicum* E109. También se realizó el mismo análisis en *Herbaspirillum seropedicae* cepa SmR1 porque esta bacteria tiene la capacidad de catabolizar el AIA, pero como fuente de C y N.

Tabla 20. Secuencias codificantes del clúster *iac* en E109 y *H. seropedicae* SmR1 en relación con las secuencias homólogas del clúster de *P. putida* 1290.

| | Gen: Proteína Identificada en <i>P. putida</i> 1290 | Score | E-value | % ID |
|---|---|--------------|----------------|-------------|
| <i>iacA</i>: Acil-CoA deshidrogenasa | | | | |
| E109 | Proteína pigmento | 370 | E-127 | 51% |
| SmR1 | Acil-CoA deshidrogenasa | 385 | 5,00E-132 | 53% |
| <i>iacB</i>: Proteína hipotética conservada | | | | |
| E109 | Dolicol-fosfato manosiltransferasa | 27 | 0,7 | 36% |
| SmR1 | Proteína hipotética conservada | 146 | 3,00E-46 | 58% |
| <i>iacC</i>: Anillo aromático dioxigenasa, subunidad α | | | | |
| E109 | 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad α | 149 | 4,00E-41 | 40% |
| SmR1 | Fenilpropionato dioxigenasa subunidad α | 539 | 0 | 64% |
| <i>iacD</i>: Anillo aromático dioxigenasa/ Subunidad β | | | | |
| E109 | 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad β | 65 | 1,00E-14 | 27% |
| SmR1 | Proteína de la subunidad pequeña dioxigenasa fenilpropionato | 128 | 4,00E-38 | 41% |
| <i>iacE</i>: Deshidrogenasa de cadena corta. Reductasa | | | | |
| E109 | 3-oxoacyl- (acil-proteína portadora) reductasa | 137 | 1,00E-40 | 33% |
| SmR1 | 3-oxoacyl- (acil-proteína portadora) reductasa | 254 | 1,00E-84 | 51% |
| <i>iacF</i>: Ferredoxina. Reductasa componente de vanillato-O-demetilasa | | | | |
| E109 | Flavodoxina reductasa vanillato-O-demetilasa | 212 | 9,00E-68 | 39% |
| SmR1 | Flavodoxina reductasa | 259 | 8,00E-85 | 45% |
| <i>iacG</i>: Flavin proteína de dominio reductasa, unido FMN | | | | |
| E109 | 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa, reductasa | 115 | 1,00E-33 | 36% |
| SmR1 | 4-hidroxifenilacetato 3-monooxigenasa, cadena pequeña | 153 | 2,00E-47 | 49% |
| <i>iacR</i>: Regulador transcripcional, familia MarR | | | | |
| E109 | Regulador transcripcional Familia MarR | 49 | 4,00E-08 | 28% |
| SmR1 | Proteína reguladora transcripcional | 40 | 2,00E-05 | 32% |
| <i>iacH</i>: Glu-tRNA amidotransferasa/amidasa | | | | |
| E109 | Asp-tRNAAsn/Glu-tRNAGln amidotransferasa | 137 | 3,00E-37 | 32% |
| SmR1 | Proteína de la familia amidasa | 252 | 2,00E-80 | 52% |
| <i>iacI</i>: Proteína hipotética conservada | | | | |
| E109 | Espermidina tipo ABC/Sistema de transporte putrescina, permeasa | 27 | 0,7 | 36% |
| SmR1 | Proteína hipotética conservada | 114 | 4,00E-32 | 39% |

En la **Tabla 20** podemos observar que en el genoma de E109 se encuentran secuencias codificantes similares a las del clúster *iac* de *P. putida* 1290 (Leveau y Gerards, 2008). La secuencia con mayor

similitud es la del gen *iacA*, que codifica para una acil-CoA deshidrogenasa, y en el genoma de E109 se encuentra anotada como una proteína de pigmento. Cuando a esta secuencia se le realizó un análisis del tipo Blast contra el genoma de *B. diazoefficiens* USDA110, arrojó una alta similitud para una acil-CoA deshidrogenasa (score=370; e-value=7e-126; %ID=52%) confirmando que se trata de la misma proteína. En *P. putida* 1290, se sugiere que la enzima acil-CoA deshidrogenasa sería una de las responsables en iniciar el proceso de degradación de AIA en esta bacteria.

IV.3.2.2 Perfil proteómico del catabolismo de AIA en E109

Luego de la búsqueda informática de proteínas homólogas del clúster *iac* en *B. japonicum* E109 intentamos confirmar la presencia de estas proteínas en el sobrenadante de un cultivo de E109 inducido con AIA. El procedimiento se llevó a cabo en el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría de Masa (Cequibiem) (<http://www.qb.fcen.uba.ar/cequibiem/>) donde se realiza la identificación de proteínas por proteómica cuantitativa en microorganismos que poseen genomas secuenciados. El análisis se realizó a través del uso del software Proteome Discoverer^(TM). En base a la información proporcionada y a los datos obtenidos del espectrómetro de masa, el programa desarrolla un informe donde indican las proteínas que fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación. El programa asigna un nivel de confianza a estos péptidos (alto/medio/bajo) y el usuario decide trabajar con los péptidos del nivel correspondiente.

El cultivo de E109 con AIA que fue analizado, desarrollo un fenotipo de colonias normales y sin desarrollo de contaminantes. A las 24 horas luego de la inducción no se encontraron trazas de AIA en el medio y el contenido de proteínas fue de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. De los resultados de proteómica se obtuvieron planillas Excel que contienen la lista de hits (proteínas identificadas) reconocidas al realizar la búsqueda contra las bases de datos Proteome Discoverer^(TM). Al realizar la búsqueda contra las secuencias del posible clúster *iac* de E109, se observan solamente tres hits (poco confiables debido a que solo se identifican con un péptido de confianza media), con lo cual no se podría confirmar la presencia de esas proteínas en la muestra.

Tabla 21. Proteínas del clúster *iac* identificadas, con cobertura media, en el sobrenadante inducido con AIA de *B. japonicum* E109

| Descripción de la enzima identificada | Score | Cobertura | # Proteínas | # Péptidos únicos | # Péptidos | # PSMs | # AAs | MW [kDa] | calc. pI |
|---|-------|-----------|-------------|-------------------|------------|--------|-------|----------|----------|
| Dolichol fosfato manosiltransferasa 3-fenilpropionato | 0 | 2.86 | 1 | 1 | 1 | 1 | 245 | 26.9 | 9.82 |
| dioxigenasa subunidad β | 0 | 7.59 | 1 | 1 | 1 | 1 | 158 | 18.5 | 5.58 |
| Regulador transcripcional Familia MarR | 0 | 3.80 | 1 | 1 | 1 | 1 | 184 | 20.7 | 9.86 |

Como se observa en la **Tabla 21**, las proteínas identificadas en el sobrenadante de E109 corresponden a aquellas codificadas por los genes *iacB*, *iacD* e *iacR*, respectivamente. No se encontró la enzima codificada por el gen *iacA*, la cual sería la enzima con mayor similitud del clúster *iac* presente en el genoma de E109. Si bien, según la evaluación del método la presencia de estas proteínas no es confiable, determina una aproximación a lo que estaría presente en el sobrenadante de E109. Al relajar los filtros del programa de búsqueda se encontraron nuevos hits.

Tabla 22. Proteínas del clúster *iac* identificadas, con cobertura baja, en el sobrenadante inducido con AIA de *B. japonicum* E109

| Descripción de la enzima identificada | Score | Cobertura | Proteínas | Péptidos únicos | #Péptidos | # PSMs | # AAs | MW [kDa] | calc. pI |
|---|-------|-----------|-----------|-----------------|-----------|--------|-------|----------|----------|
| Dolichol fosfato manosiltransferasa 3-fenilpropionato | 0 | 2,86 | 1 | 1 | 1 | 1 | 245 | 26,9 | 9,82 |
| dioxigenasa subunidad β | 0 | 7,59 | 1 | 1 | 1 | 1 | 158 | 18,5 | 5,58 |
| Acil-CoA dehidrogenasa | 0 | 2,07 | 1 | 1 | 1 | 1 | 387 | 42,3 | 6,55 |
| Dehidrogenasa de cadena corta | 0 | 5,04 | 1 | 1 | 1 | 1 | 258 | 26,7 | 7,81 |
| Acil-CoA dehidrogenasa | 0 | 4,25 | 1 | 1 | 1 | 1 | 353 | 37 | 5,82 |
| FMN reductasa | 0 | 7,14 | 1 | 1 | 1 | 1 | 182 | 19,2 | 6,52 |
| Regulador transcripcional Familia MarR | 0 | 3.80 | 1 | 1 | 1 | 1 | 184 | 20.7 | 9.86 |

Como se observa en la **Tabla 22**, podemos observar que algunas enzimas del clúster *iac* fueron reconocidas en el sobrenadante del cultivo, estas son aquellas codificadas por los genes *iacB*, *iacD*, *iacA*, *iacE*, *iacG* e *iacR*. Debido a que estos resultados son solo sugestivos, es probable que la cantidad de muestra no haya sido suficiente para detectar las proteínas por lo que se decidió evaluar el mismo procedimiento con mayores volúmenes de cultivo, precipitando y luego digiriendo las mismas para aumentar la concentración de proteínas en la muestra. Este procedimiento se llevó a cabo pero no arrojó datos relevantes a los presentados anteriormente.

IV.3.2.3 Evaluación del catabolismo asimilativo de AIA en E109

Leveau y Lindow (2005) confirmaron en *P. putida* 1290 la capacidad de utilizar el AIA como única fuente de C, N y energía debido a la presencia de un grupo de genes agrupados en un clúster denominado *iac*. El alto valor nutritivo y la fácil digestibilidad del compuesto indólico, le permite ser un potente selector para la presencia y expansión de poblaciones de *P. putida* 1290 en lugares donde este compuesto está presente. En el caso de *B. japonicum* E109, luego del análisis bioinformático, encontramos que posee secuencias similares para varios de los genes que codifican enzimas pertenecientes al clúster, por lo que nos preguntamos si esta bacteria sería capaz de usar el AIA para crecer.

Tabla 23. Valores de la producción de biomasa (DO_{595}) y el número de células ($ufc.ml^{-1}$) por *B. japonicum* E109 en el medio EMA o EMA modificados por la adición de AIA como fuente de carbono. Las letras diferentes representan diferencias significativas por test de Tukey con un $p < 0,05$.

| E109 | DO ₅₉₅ | | ufc.ml ⁻¹ | |
|----------------|-------------------|--------------------|----------------------|----------------------|
| | 72 h | 96 h | 72 h | 96 h |
| EMA | 0,56 ^a | 1,546 ^a | 7,37x10 ⁸ | 2,33x10 ⁹ |
| EMA modificado | 0,04 ^c | 0,053 ^b | 6,12x10 ⁶ | 7,03x10 ⁶ |

Como se observa en la **Tabla 23**, E109 creció en el medio EMA con la formulación original pero no creció en el medio EMA modificado por la adición de AIA. Sin embargo, se observa que las células inoculadas sobrevivieron en el medio. El pequeño aumento a nivel de la DO_{595} entre las 72 y 96 horas podría deberse a un aumento en la cantidad de EPS producido, como se observó previamente. A partir de estos resultados, hicimos nuevas modificaciones en el medio de cultivo, relacionadas con el aumento de la concentración de la fitohormona e incluso probamos la utilización de un medio mínimo solo con AIA como suplemento de carbono, pero se obtuvieron resultados similares a los presentados en la tabla. Así podemos decir que E109 no crece en medio mínimo suplementado con AIA como única fuente de C.

Con el hallazgo de las secuencias codificantes con similitud en el clúster *iac*, enfocamos nuestro interés de investigación en probar si el gen *iacA* sería el responsable de la degradación de AIA como parte de un metabolismo degradativo pero no asimilativo de E109. El resultado negativo sobre la asimilación de AIA como fuente de carbono, hizo que nos replanteáramos la hipótesis de que *IacA* es la enzima encargada de la degradación de AIA. Inicialmente evaluamos la posibilidad

de generar una mutación en este gen, pero debido a los resultados obtenidos en nuestros experimentos preliminares, encontramos que existía la mutación en el mismo gen descrito en *B. diazoefficiens* USDA110 en trabajos relacionados con la fijación biológica de nitrógeno y no relacionados con el metabolismo de auxinas, por lo que decidimos probarlo para testear rápidamente que ocurría cuando se adicionaba AIA a cultivos de un rizobio deficiente en la biosíntesis de la enzima similar a la codificada por el gen *iacA* de *P. putida*. A continuación se presentan los resultados de este ensayo.

IV.3.2.4 Evaluación del catabolismo de AIA en la mutante *B. diazoefficiens* 8620 para el gen *ngrC* (similar a *iacA*)

A continuación, en la **Figura 69** se presentan los resultados de la evaluación del catabolismo de AIA en cultivos de *B. japonicum* E109, *B. diazoefficiens* USDA110 sp4 (salvaje) y *B. diazoefficiens* USDA110 sp4 con una mutación en el gen *ngrC*, la cual es similar al gen *iacA*, denominada 8620 (Nienaber et al. 2000).

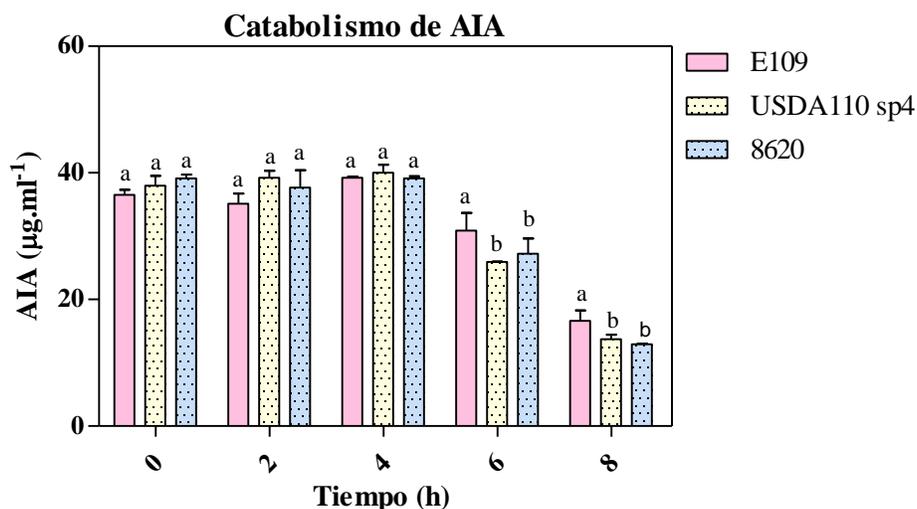


Figura 69. Concentración de AIA agregado exógenamente ($30 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109, *B. diazoefficiens* USDA110 sp4 y 8620 en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$.

Observando la **Figura 69** podemos advertir que cuando se adiciona AIA al medio de cultivo, la cepa 8620 (mutante en el gen *ngrC*, similar a *iacA*) puede degradar la fitohormona. No se

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

observaron diferencias significativas en la degradación, con respecto a la cepa salvaje USDA110 sp4 y a nuestra cepa en estudio, E109. Los resultados obtenidos en *B. diazoefficiens* USDA110 sp4 podrían dar indicios de que el gen *nrgC* no sería responsable del catabolismo de AIA en esta cepa o de la especie *B. japonicum*. Estos resultados en conjunto, amplían nuestro desafío para encontrar posibles enzimas candidatas responsables de la degradación de la fitohormona en *B. japonicum* E109.

IV.3.3 Actividad de la enzima codificada por el gen *iacC* para el catabolismo de AIA en E109

IV.3.3.1 Análisis *in silico* del genoma

De la información obtenida en el perfil proteómico en un cultivo de E109 y con la confirmación de que la enzima IacA no está involucrada en la degradación de AIA, comenzamos a estudiar la implicancia de las dioxigenasas. Encontramos que estas enzimas están relacionadas a la degradación de indol y que en *B. phytofirmans* esta enzima está relacionada a la capacidad de degradar AIA pero para asimilarlo como *P. putida* 1290. Esta enzima es la IacC del clúster de *Pseudomonas*, por ello crearon una mutante deficiente para la codificación del gen *iacC* y al evaluar la degradación de AIA, esta perdió la capacidad de poder hacerlo. Con estos resultados buscamos en el genoma de E109 las dioxigenasas presentes.

Tabla 24. Búsqueda de enzimas dioxigenasas en el genoma de E109 mediante RAST

| Subcategoría | Subsistema | Rol | Característica |
|---|---|--|--|
| NAD y NADP | Biosíntesis del cofactor NAD y NADP global | Triptófano 2,3-dioxigenasa (EC 1.13.11.11) | fig 375.26.peg.5627 |
| Folato y pterinos | Pterin carbinolamina dehidratasa | Homogentisato 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.5) | fig 375.26.peg.285 |
| Folato y pterinos | Pterin carbinolamina dehidratasa | Dioxigenasa de 4-hidroxifenilpiruvato (EC 1.13.11.27) | fig 375.26.peg.281, fig 375.26.peg.1082 |
| Varios - sin subcategoría | Dioxigenasas (EC 1.14.12.-) | 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad beta (EC 1.14.1.-) | fig 375.26.peg.6235 |
| Varios - sin subcategoría | Dioxigenasas (EC 1.14.12.-) | 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa (EC 1.14.1.-) | fig 375.26.peg.6236 |
| Estrés oxidativo | Glutaredoxinas | Flavoheproteína (proteína de tipo hemoglobina) (Flavoheproteína) (óxido nítrico dioxigenasa) (EC 1.14.12.17) | fig 375.26.peg.6107 |
| Respuesta al estrés: sin subcategoría | Flavoheproteína | Flavoheproteína (proteína de tipo hemoglobina) (Flavoheproteína) (óxido nítrico dioxigenasa) (EC 1.14.12.17) | fig 375.26.peg.6107 |
| Respuesta al estrés: sin subcategoría | Hemoglobinas bacterianas | Flavoheproteína (proteína de tipo hemoglobina) (Flavoheproteína) (óxido nítrico dioxigenasa) (EC 1.14.12.17) | fig 375.26.peg.6107 |
| Vías periféricas para el catabolismo de compuestos aromáticos | Degradación de bifenilo | Proteína relacionada con bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa III | fig 375.26.peg.860 |
| Vías periféricas para el catabolismo de compuestos aromáticos | Degradación de bifenilo | Bifenil-2,3-diol 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.39) | fig 375.26.peg.4493 |
| Metabolismo de compuestos intermedios aromáticos centrales | Rama catecol de la vía beta-cetoadipato | Catecol 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.1) | fig 375.26.peg.940, fig 375.26.peg.6425, fig 375.26.peg.6961 |
| Metabolismo de compuestos intermedios aromáticos centrales | Catabolismo de salicilato y gentisato | Gentisato 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.4) | fig 375.26.peg.107, fig 375.26.peg.6227 |
| Metabolismo de compuestos intermedios aromáticos centrales | Rama protocatecuato de la vía beta-ketoadipato | Protocatecuato 3,4-dioxigenasa cadena beta (EC 1.13.11.3) | fig 375.26.peg.941, fig 375.26.peg.7513 |
| Metabolismo de compuestos intermedios aromáticos centrales | Rama protocatecuato de la vía beta-ketoadipato | Protocatecuato 3,4-dioxigenasa cadena alfa (EC 1.13.11.3) | fig 375.26.peg.942, fig 375.26.peg.2077, fig 375.26.peg.7512 |
| Metabolismo de compuestos intermedios aromáticos centrales | Vía de homogeneización de la degradación de compuestos aromáticos | Homogentisato 1,2-dioxigenasa (EC 1.13.11.5) | fig 375.26.peg.285 |

Llevamos a cabo una búsqueda bioinformática de dioxigenasas en el genoma de *B. japonicum* E109 con el objetivo de encontrar enzimas potencialmente relacionadas con la degradación de AIA. De

esta búsqueda surgió que en E109 posee 15 dioxigenasas, donde algunas de ellas están vinculadas en la bibliografía relacionada a la degradación de AIA o indol. La enzima triptófano 2,3-dioxigenasa fue indicada por Egebo et al. (1991) como la enzima capaz de catalizar la apertura del anillo indol por consumo de la molécula de oxígeno y en la investigación de Donati et al. (2013) fue moderadamente inducida cuando se adicionó 1 mM de AIA a un cultivo de *B. diazoefficiens* USDA110. La enzima gentisato 1,2-dioxigenasa está involucrada en la degradación de indol en *Alcaligenes* sp. (Claus y Kutzner, 1983). La enzima catecol 1,2-dioxigenasa está involucrada en la vía del catecol en *Aspergillus niger* para la degradación de indol (Kamath y Vaidyanathan, 1990). Qu et al. (2013) mostró que *E. coli* que expresan bifenil dioxigenasa y bifenil-2,3-dihidrodiol-2,3-deshidrogenasa transforma de manera eficiente a indol índigo. Las enzimas 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa y beta, son IacC e IacD respectivamente, identificadas en el clúster *iac* de *P. putida* 1290 (Leveau y Gerards, 2008). La mutación de *iacC* detuvo el catabolismo de AIA en *B. phytofirmans* (Zúñiga et al. 2013). Estas enzimas se encontraron en la búsqueda informática de E109 pero también en el análisis de proteómica del sobrenadante de E109, por lo que consideramos que eran un modelo interesante para verificar su rol en la degradación de AIA.

IV.3.3.2 Construcción de la mutante *B. japonicum* E109 $\Delta iacC$

Construimos la mutación de la enzima IacC (3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa) (EC 1.14.1.-) mediante una deleción en el gen ubicado en la fig|375.26.peg.6236 del genoma de E109 con el objetivo de evaluar si la enzima IacC está involucrada en la degradación de AIA.

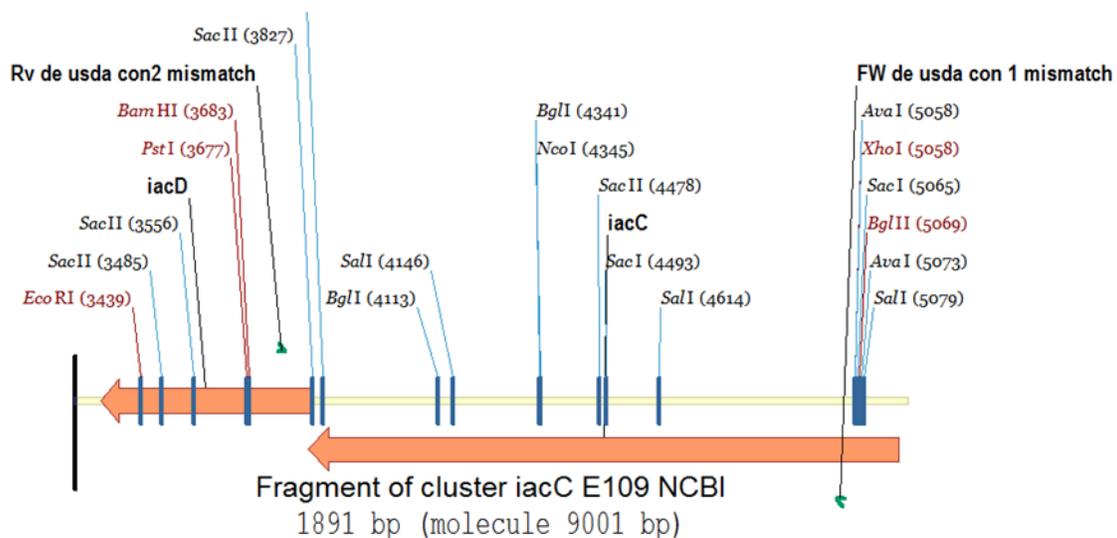


Figura 70. Estrategia utilizada para la obtención de la mutante de E109 $\Delta iacC$

Se obtuvieron cuatro clones y debido a que todos tuvieron un comportamiento similar entre sí, se seleccionó solo uno de ellos.

IV.3.3.3 Biosíntesis de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$

Con la obtención de la mutante E109 $\Delta iacC$, evaluamos si podíamos cuantificar AIA en el medio de cultivo EMA con la adición de L-Trp, utilizando como control la cepa salvaje de E109. Luego de varios días de mantener los cultivos en condiciones de crecimiento, no pudimos cuantificar AIA en ninguno de los dos cultivos. Esto sugiere que podría existir más de una enzima involucrada en el catabolismo de la fitohormona por lo que no se puede cuantificar en el medio de cultivo.

IV.3.3.4 Evaluación del catabolismo de AIA por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$

Evaluamos la degradación de AIA en E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$.

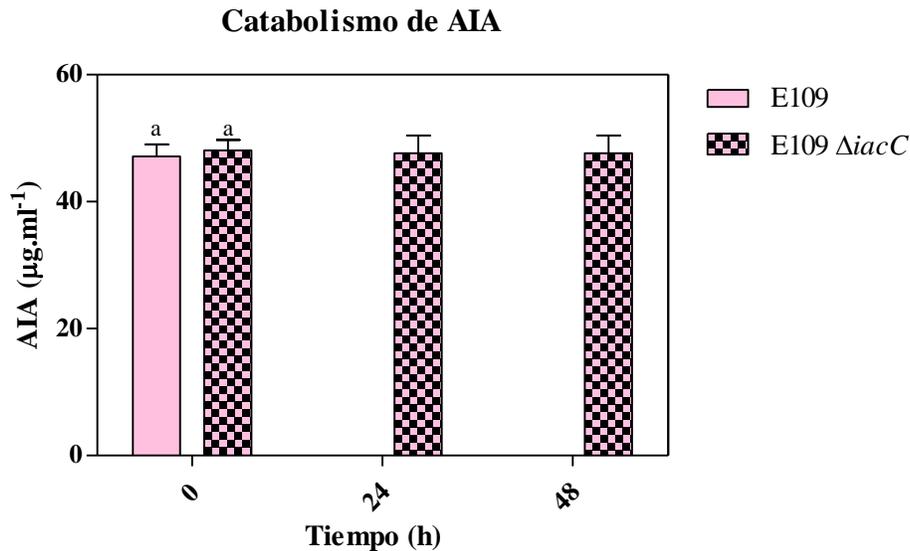


Figura 71. Concentración de AIA agregado exógenamente ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109 y la mutante *B. japonicum* E109 $\Delta iacC$ en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$.

Como se observa en la **Figura 71**, el cultivo de E109 a las 24 h degradó la totalidad del contenido de AIA adicionado exógenamente mientras que el cultivo de la mutante E109 $\Delta iacC$ no fue capaz de degradar el AIA. Con este resultado podemos concluir un modelo experimental, que ha estado inconcluso desde la década del 90, la enzima IacC (3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa)

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

(EC 1.14.1.-) es la enzima responsable de la degradación de AIA tanto en *B. japonicum* E109 como en *B. diazoefficiens* USDA110 (datos no mostrados).

En el caso de la cepa complementada E109 $\Delta iacC/pJN105$ se confirmó la complementación del fenotipo por la degradación de un 28% de AIA ($10.96 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en las primeras 24 h posteriores a la adición de la hormona, un 72% luego de 48 h ($28.4 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y cerca de un 90% ($34,1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) luego de 72 h, en comparación con la mutante E109 $\Delta iacC$ en el que la concentración de la hormona fue inalterable a lo largo del experimento y en contrapartida con la cepa salvaje E109, en la que la degradación de AIA alcanzó un 100% en las primeras 24 h. Estos resultados indicarían que la enzima 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad α sería, al menos una, sino la más importante enzima responsable de la degradación de AIA en esta bacteria.

IV.4 DISCUSIÓN

Para dilucidar el modelo de catabolismo de AIA en E109, buscamos enzimas potencialmente relacionadas con la degradación de este compuesto. Las peroxididasas se encuentran distribuidas en diversos ambientes y están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos. Tienen como función primaria catalizar la reducción de H_2O_2 mediante la adopción de electrones a diversas moléculas donantes, tales como compuestos fenólicos, precursores de lignina y entre ellas las auxinas (Hiraga et al., 2001). De aquí el interés, por esta enzima en nuestro modelo de catabolismo de AIA. En la bacteria *Ensifer meliloti* (ex-*Sinorhizobium meliloti*), una peroxidasa se expresa en la interacción con *Medicago truncatula* (Cook et al., 1995) y se cree que esta enzima podría controlar el nivel de auxinas en las raíces de plantas noduladas o en raíces de manera general, ya que ciertas peroxididasas oxidan auxinas y de esta manera controlan indirectamente la organogénesis de nódulos a través de su catabolismo (Savitsky et al., 1999; Mathesius, 2001). También, se ha informado de la existencia de otras enzimas con capacidad de metabolizar el AIA, tales como AIA oxididasas, o poli fenol oxididasas de raíces y nódulos que poseen algún papel en el metabolismo de AIA en la simbiosis (Ghosh y Basu, 2006).

Previo a la construcción de la mutante para una peroxidasa en *B. japonicum* E109 se llevaron a cabo varios experimentos para determinar la posible actividad de la enzima en el medio de cultivo o sobrenadante del medio de cultivo de la bacteria o ensayos por la adición exógena de HRP o H_2O_2 a las mismas muestras. En estos experimentos no pudimos confirmar la actividad de una enzima del tipo peroxidasa en las condiciones evaluadas. El agregado exógeno de HRP o H_2O_2 , no aumento la velocidad de degradación de AIA en cultivos de E109. La mutante de *B. japonicum* E109 $\Delta per12$, construida con una delección en el gen que codifica para una peroxidasa presente en el genoma de esta bacteria, se ensayó junto con la cepa salvaje a nivel de su capacidad de catabolizar el AIA en concentraciones crecientes de la molécula (10 a 40 $\mu g \cdot ml^{-1}$) y pudimos observar que no presentaba diferencias significativas en la degradación de la hormona respecto de la cepa salvaje. En base a estos resultados podemos decir que esta enzima no estaría involucrada en el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109.

Luego de descartar las enzimas peroxididasas como posibles enzimas involucradas en la degradación de AIA, llevamos a cabo un análisis bioinformático del genoma de E109 para identificar enzimas relacionadas con la degradación de AIA. Esta búsqueda reveló que E109 posee la mayoría de los genes que componen el clúster *iac* de *P. putida* 1290 (Leveau y Gerards, 2008), pero no como un clúster sino distribuidos en todo el genoma, por lo que podemos decir que si bien E109 no tiene un clúster *iac* para la asimilación de AIA como fuente de carbono y energía, posee algunos genes que podrían expresar alguna actividad catabólica sobre el AIA. Los únicos genes del clúster putativo

que se encuentran agrupados de manera independiente en el genoma son los genes *iacC* y *iacD*, que codifican para una fenilpropionato dioxigenasa subunidades alfa y beta respectivamente, junto con otros tres genes no vinculados con el clúster *iac*. De acuerdo a la bibliografía disponible hasta el momento, la enzima expresada por el gen *iacA* sería la primera en iniciar la degradación del AIA, por lo que en una primera etapa de trabajo, centramos nuestra atención en ella. De manera general, podemos mencionar que nuestros experimentos alineados con esta propuesta experimental no fueron reveladores ya que no se pudo comprobar la asimilación de AIA por *B. japonicum* E109, la proteómica no demostró la presencia de la enzima codificada por el gen similar a *iacA* en niveles confiables en los sobrenadantes de cultivos puros y fundamentalmente, la mutación en el gen *ngrC* (gen similar a *iacA*) de *B. diazoefficiens* 8620 no detuvo la capacidad del microorganismo para degradar el AIA. Estos resultados en su conjunto, indican que la asimilación de AIA en *B. japonicum* E109 no opera como un mecanismo activo por la presencia de los genes similares al clúster *iac* de *P. putida* 1290 y que la enzima IacA no sería la responsable en iniciar la degradación de AIA en E109.

De acuerdo a reportes recientemente publicados por Zúñiga et al. (2013) nuestro segundo gen de interés del clúster fue *iacC*, que codifica para la subunidad alfa de una fenilpropionato dioxigenasa, porque parecería ser el responsable de la degradación de AIA en *B. phytofirmans*. Nuestros resultados de proteómica determinaron la presencia de esta proteína en el sobrenadante del medio de cultivo. Con este resultado, más los antecedentes en otras bacterias, llevamos a cabo la mutación en E109 deficiente para la enzima IacC. La evaluación del catabolismo de AIA, mostró que la mutante E109 $\Delta iacC$ no es capaz de catabolizar AIA más allá de 96 horas de cultivo. Con este resultado satisfactorio, encontramos que la enzima responsable del catabolismo de AIA tanto para *B. japonicum* E109 como para *B. diazoefficiens* USDA110 es la enzima IacC. Esto nos lleva, en un futuro, a investigar otros aspectos de la degradación de esta hormona tales como los metabolitos generados durante la degradación, la explicación fisiológica de porque lo realiza como así también la interacción con la planta en las mutantes generadas.

IV. 5 CONCLUSIONES

En este capítulo, nos centramos en la búsqueda de genes involucrados en el catabolismo de AIA como la generación de mutantes y llegamos a las siguientes conclusiones:

1. La enzima peroxidasa no está involucrada en la degradación de AIA.
2. *B. japonicum* E109 posee secuencias homólogas a las del clúster *iac* de *P. putida* 1290 aunque no agrupadas en forma de clúster, sino distribuidas en el genoma.
3. La enzima putativa codificada por el gen *iacA* no es la responsable de la degradación de AIA en E109, ya que la bacteria no es capaz de asimilar AIA como fuente de C y la mutación en un gen similar en *B. diazoefficiens* USDA110 (mutante denominada 8620) sigue presentando capacidad de degradar AIA.
4. Las enzimas putativas codificadas por los genes homólogos de *iacC* y *iacD*, la fenilpropionato dioxigenasas subunidades alfa y beta, se encuentran formando un clúster independiente en el genoma de E109 y son las responsables de la degradación de AIA en E109.
5. La mutante $\Delta iacC$ complementada, restauró su fenotipo y es capaz de degradar AIA.

CAPÍTULO V: Catabolismo de Indol por *B. japonicum* E109

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

V.1 INTRODUCCIÓN

V.1.1 Catabolismo de Indol

El indol y sus derivados comprenden un grupo de compuestos aromáticos heterocíclicos los cuales están ampliamente distribuidos en la naturaleza. El indol es uno de los principales productos de degradación del metabolismo del L-Trp microbiano, un aminoácido presente en la mayoría de las proteínas (Yokoyama y Carlson, 1974; Mohammed et al., 2003). Más de 85 bacterias Gram positivas y negativas son capaces de producir indol (Lee y Lee, 2010), pero un grupo mucho menor es capaz de degradarlo.

V.1.2 Degradación microbiana de Indol

La degradación de indol ocurre principalmente por dos mecanismos, uno es la mineralización donde el compuesto es utilizado como fuente de carbono y energía, y el otro mecanismo es el co-metabolismo del indol que involucra la transformación bacteriana del indol en otros compuestos en presencia de fuentes de carbono adicionales. Para la mineralización existen tres vías principales propuestas y estas son la vía del catecol, la vía de gentisato y la vía del antranilato. La vía del catecol fue estudiada en bacterias Gram negativas aisladas de agua potable. El primer paso de esta vía es la hidroxilación de indol a indoxil, el cual fue hidroxilado a 2,3-dihidroxyindol. La degradación procede vía isatina, ácido N-formilantranílico, ácido antranílico, ácido salicílico y finalmente catecol (Sakamoto et al., 1953). La vía del antranilato fue estudiada en cocos Gram positivos que utilizan en indol como fuente de carbono y energía. Este se degrada por la vía de 2,3-dihidroxyindol, ácido N-carboxyantranílico y ácido antranílico (Fujioka y Wada, 1968). La vía del gentisato fue reportada en aislados de *Alcaligenes* sp. En esta vía la degradación de indol ocurre vía indoxil, isatina, ácido antranílico y ácido gentísico (Claus y Kutzner, 1983).

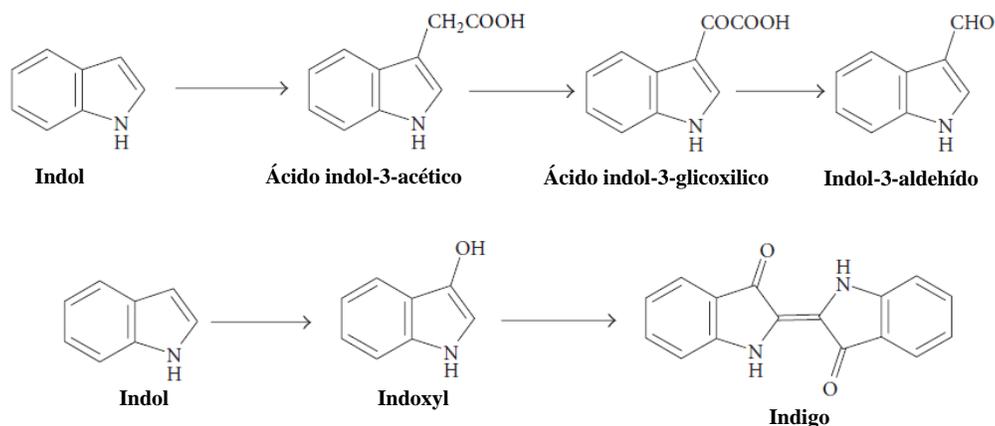


Figura 73. Degradación de indol por biotransformación vía indol-3-aldehído (a) y vía indigo (b).

V.1.3. Importancia del indol en la naturaleza y similitud funcional con el AIA

El indol es una molécula de señalización entre interespecies e interreino (Lee et al., 2007; Bansal et al., 2009). Las bacterias Gram positivas y negativas producen una gran cantidad de indol extracelular utilizando la enzima triptofanasa (Lee y Lee, 2010). Diferentes reportes científicos muestran que el indol juega un papel importante en el control de la virulencia, la resistencia a los medicamentos, la formación de biofilms de bacterias Gram negativas productoras de indol (Lee y Lee 2010; Lee et al., 2010) y la formación de esporas en bacterias Gram positivas productoras de indol (Stamm et al., 2005). Las bacterias no productoras de indol, lo utilizan para mejorar la tolerancia a los antibióticos para incrementar la formación de biofilms (Kim et al., 2013) y la reducción de la virulencia de *S. aureus* (Lee et al., 2013) y *C. albicans* (Oh et al., 2012). Los derivados de indol, tales como AIA y 3-indolilacetónitrilo juegan un papel importante clave en las interacciones planta-microorganismo (Lee et al., 2011; Spaepen y Vanderleyden, 2011) y se considera que guardan cierta similitud funcional con el primero desde el punto de vista de la señalización. *A. tumefaciens* no es capaz de sintetizar indol pero puede degradarlo rápidamente a través de un proceso catabólico similar a *B. japonicum* en presencia de AIA. A diferencia del primero, la adición de indol exógeno inhibe el crecimiento *A. tumefaciens* y disminuye su motilidad. También provoca un incremento en la formación de biofilms y mejora su tolerancia a los antibióticos de manera general. El análisis transcripcional mostró que el indol induce la expresión de genes relacionados a la formación de biofilms (*celA*, *cheA*, *exoR*, *phoB*, *flgE*, *fliR* y *motA*), genes relacionados con el estrés (*clpB*, *dnaK*, *gsp*, *gyrB*, *marR* y *soxR*) y de flujo de eflujo (*emrA*, *norM*, y *Atu2551*), lo que explicaría el aumento de la formación de tales estructuras y la tolerancia a

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

compuestos biocidas. En contraste, el AIA no afecta a la formación de biofilms, la tolerancia a antibióticos o la expresión de los genes en esta bacteria, pero como hemos mencionado previamente, este mismo patrón de expresión fue generado en *B. diazoefficiens* USDA110 en presencia del AIA (Donati et al., 2013), lo que sugiere que el AIA en *B. japonicum* tendría un rol de señalización similar al del indol en *A. tumefaciens*. Por otra parte, se ha reportado que en *A. baumannii* la enzima IacA (correspondiente al clúster *iac*) sería la responsable de la degradación de ambos compuestos (Lin et al. 2012).

V.2 METODOLOGÍA

V.2.1 Evaluación del catabolismo de Indol en cultivos de E109

El procedimiento utilizado para evaluar la degradación de indol fue el mismo que el utilizado para la evaluación del catabolismo de AIA. Para ello, se obtuvo un cultivo de E109 en fase exponencial y se dividió el cultivo en los siguientes tratamientos:

1. *B. japonicum* E109 con la adición de 30 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de indol
2. *B. japonicum* E109 con la adición de 20 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de indol
3. *B. japonicum* E109 con la adición de 10 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de indol
4. *B. japonicum* E109 con la adición de 5 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de indol

Previo a este experimento se llevó a cabo la evaluación de la producción de indol en E109. Se omitió un tratamiento control debido a que E109 no es capaz de producir este compuesto.

La solución madre de indol se preparó con una concentración de 1 mg.ml^{-1} y se esterilizó por filtración. Luego de la adición de indol (inducción), se tomó una muestra, para determinar a tiempo cero (T_0) la concentración del compuesto. Los tubos se incubaron como se describió y a diferentes períodos de tiempo, se tomaron muestras para realizar la cuantificación de la concentración del metabolito en el medio de cultivo, como se describirá a continuación.

V.2.2 Metodología general para la cuantificación de Indol por espectrofotometría

La cuantificación de indol se hizo a través de una adaptación del método de Mueller et al. (2009). Brevemente, se tomaron 1000 μl del cultivo bacteriano del cultivo y se colocaron en un tubo plástico (del tipo eppendorf) de 1,5 ml de capacidad. Se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min y opcionalmente se filtró (0.2 μm). Se tomaron 500 μl del sobrenadante y se mezclaron con 500 μl del reactivo de Ehrlich (alcohol etílico, p-dimetilaminobenzaldehído y ácido clorhídrico concentrado) agitando hasta homogenizar. Se incubó por 10 min y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 571 nm. Con los datos de absorbancia se obtuvo un promedio de tres réplicas de cada muestra (réplica experimental), tres réplicas del tratamiento (réplica biológica) y se hizo el cálculo de concentración por el uso de la ecuación obtenida de una curva patrón generada con soluciones entre 0-90 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ de indol puro. La concentración de indol se expresó en $\mu\text{g.ml}^{-1}$.

V.2.3 Evaluación del catabolismo de Indol en sobrenadantes de E109

Durante los experimentos desarrollados del catabolismo de AIA, observamos que la actividad de degradación se encontraba en el sobrenadante de E109. Es este experimento evaluamos si la degradación de indol se encontraba en el sobrenadante.

Utilizando el mismo procedimiento que en el punto anterior. A partir de un cultivo de E109, se obtuvo el sobrenadante y se agregó solución de indol estéril para generar las siguientes concentraciones:

1. Sobrenadante de *B. japonicum* E109 con adición de 30 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de indol
2. Sobrenadante de *B. japonicum* E109 con adición de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de indol
3. Sobrenadante de *B. japonicum* E109 con adición de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de indol
4. Sobrenadante de *B. japonicum* E109 con adición de 5 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de indol

Los tubos se incubaron en agitación a 30°C y se tomaron muestras periódicas para la cuantificación del indol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) hasta el final del experimento.

V.2.4 Catabolismo del indol en diferentes fases de crecimiento de E109

Este ensayo se realizó con el objetivo de observar si había diferencias en la velocidad de degradación de indol en las diferentes fases de crecimiento. Para ello, *B. japonicum* E109 se cultivó como se mencionó hasta llegar a la fase exponencial ($\text{DO}_{595}=0,7$) y estacionaria ($\text{DO}_{595}=1,2$). Una vez obtenidos los cultivos en la fase de crecimiento apropiada, se agregó 40 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de indol a cada uno de los tratamientos. Los tubos inducidos de ambos estadios de crecimiento se llevaron a condiciones de agitación a 180 rpm a 30°C, y se tomaron muestras periódicas cada 8 h hasta final del experimento, donde se evaluó en cada punto la concentración de indol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

V.2.5 Catabolismo de Indol en concentraciones crecientes de indol

Evaluamos el catabolismo con concentraciones crecientes de indol para establecer si la bacteria posee una saturación. Para ello, se obtuvo un cultivo de E109 en fase estacionaria ($\text{DO}_{595}=1,119$) y se fraccionó 5 ml de cultivo en tubos de boro silicato estériles 10 ml de capacidad (por triplicado), según los siguientes tratamientos:

1. E109 (Control)
2. E109 con la adición de 0.25 mM de Indol
3. E109 con la adición de 0.5 mM de Indol
4. E109 con la adición de 1 mM de Indol
5. E109 con la adición de 2 mM de Indol
6. E109 con la adición de 5 mM de Indol

Inmediatamente luego de la inducción se tomó una muestra a la cual se cuantificó la concentración de indol considerada como muestra a tiempo cero (T_0) del experimento y luego se tomaron muestras a las 8, 12 h y luego cada 24 h hasta el final del experimento. Los tubos se incubaron en estufa a 30°C en agitación, como se describió.

V.2.6 Evaluación del catabolismo de indol en la mutante para el gen *nrgC* (similar a *iacA*) de *B. diazoefficiens* 8620

B. diazoefficiens USDA110 *spc4* (cepa salvaje) fue mutado en el gen *nrgC* (gen similar a *iacA*) y se denominó *B. diazoefficiens* 8620 (Nienaber et al., 2000). Tanto *B. diazoefficiens* USDA110 *spc4*, como 8620 se cultivaron en las mismas condiciones que *B. japonicum* E109, más el agregado de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de espectinomicina y kanamicina. Una vez que las cepas llegaron a la fase exponencial, se fraccionaron los cultivos en un total de 9 tubos de borosilicato estériles. Este modelo experimental se evaluó por triplicado y para cada condición experimental. Los tratamientos fueron:

1. *B. japonicum* E109 con 0.5 mM de indol
2. *B. diazoefficiens* USDA110 *spc4* con 0.5 mM de indol
3. *B. diazoefficiens* 8620 con 0.5 mM de indol

Los tubos se incubaron a 180 rpm a 30°C, y se tomaron muestras cada 2 h hasta la finalización del ensayo. En cada punto de muestreo se evaluó la concentración de indol, como se describió.

V.2.7 Evaluación del catabolismo de indol por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$

Tanto E109 como la mutante $\Delta iacC$ se cultivaron como se describió anteriormente. Los cultivos se mantuvieron en agitación hasta llegar a una $\text{DO}_{595}=0.8$ correspondiente con una fase exponencial temprana de crecimiento. Con una pipeta estéril se tomaran alícuotas de 5 ml de cultivo y se colocaron de manera individual en tubos de borosilicato previamente esterilizados. Este modelo experimental se realizó por triplicado para cada cepa y para cada condición experimental. Luego de un período de adaptación de 15 min, se establecieron dos condiciones experimentales:

1. E109 con la adición de 0.5 mM de indol
2. E109 $\Delta iacC$ con la adición de 0.5 mM de indol

Como parámetros de mayor interés fueron evaluados el crecimiento bacteriano como DO_{595} (antes de la inducción y al final de la incubación) y la concentración de indol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en función del tiempo. Para ello, se tomaron muestras del medio de cultivo cada 2 h.

V.3 RESULTADOS

Durante la búsqueda de enzimas relacionadas con la degradación de AIA, encontramos que una de las enzimas del clúster de *P. putida* 1290, IacA (acil-coA deshidrogenasa) sería responsable de degradar indol en *Acinetobacter baumannii* (Lin et al., 2012). El mecanismo de degradación de indol en *Agrobacterium tumefaciens* (otra bacteria perteneciente al Orden *Rhizobiales*) como parte de una ruta metabólica que posee grandes similitudes a la descripta para la degradación de auxinas (Lee et al., 2014). Considerando que el indol de manera particular ha tomado un inmenso rol protagónico como molécula señal en otros microorganismos del suelo, nos interesó abordar ciertos aspectos de este modelo, ya que consideramos que al identificar el factor común en la degradación de auxinas e indol, podremos establecer el rol de ambos compuestos en el proceso de señalización rizosférica para *B. japonicum*.

V.3.1 Evaluación del catabolismo de Indol en cultivos de E109

Evaluamos la degradación de indol en un cultivo de E109 con concentraciones crecientes del metabolito adicionado de manera exógena, para probar su comportamiento.

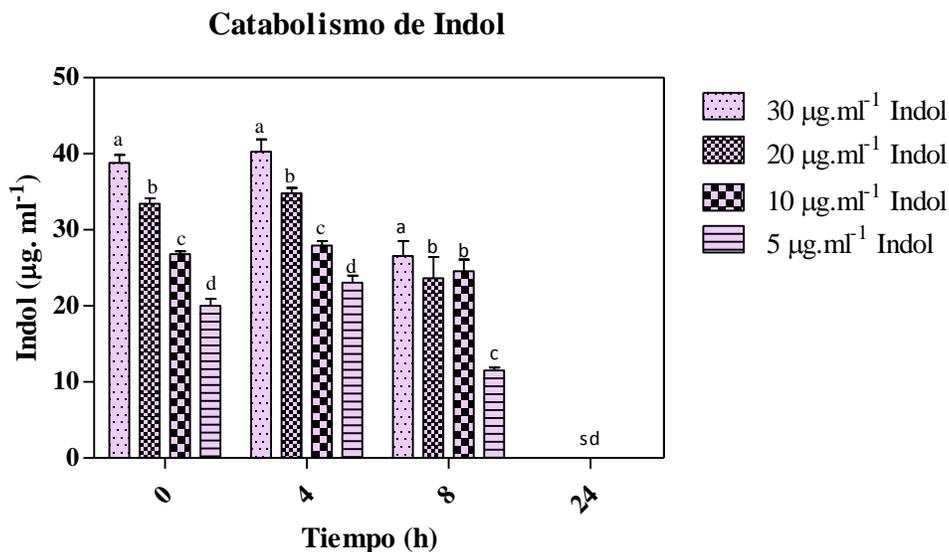


Figura 74. Concentración de indol agregado exógenamente (5-30 µg.ml⁻¹) en cultivos de *B. japonicum* E109 en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un p < 0,05.

Como lo sugiere la **Figura 74**, podemos inferir que E109 es capaz de degradar diferentes concentraciones de indol cuando se agrega al cultivo en fase exponencial de crecimiento. Dada la

similitud en la degradación con AIA, nos preguntamos si la enzima responsable de esta actividad también estaría liberada en el sobrenadante del cultivo por lo que evaluamos la degradación de indol en el mismo.

V.3.2 Evaluación del catabolismo de Indol en sobrenadantes de E109

Como sabemos por resultados expuestos con antelación, la enzima IacC es excretada al medio de manera constitutiva y esto fue confirmado cuando se trabajó con sobrenadantes libres de células de E109. Así, de manera comparativa, evaluamos el comportamiento de la degradación de indol en sobrenadantes de cultivos de E109.

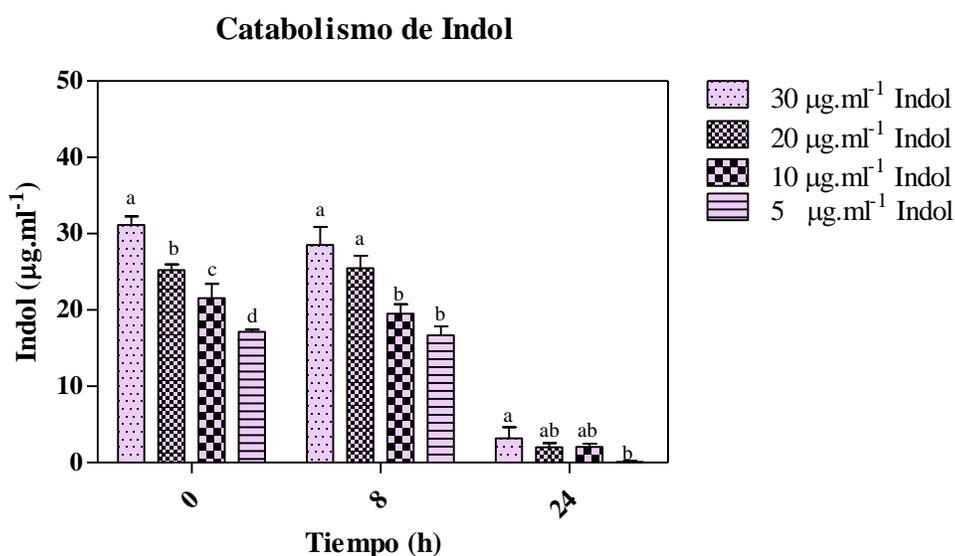


Figura 75. Concentración de indol agregado exógenamente (5-30 µg.ml⁻¹) en sobrenadantes de *B. japonicum* E109 en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un p < 0,05.

Como lo indica la **Figura 75**, en los sobrenadantes de E109 se puede observar la presencia de una actividad catabólica del compuesto indólico a diferentes concentraciones de la molécula en el medio; sin embargo a las 24 horas desde la inducción, todavía se identifican cantidades de indol, lo que indica, que al igual que AIA, el compuesto que degrada el indol E109 es excretado al medio de cultivo de manera constitutiva.

V.3.3 Catabolismo del indol en diferentes fases de crecimiento de E109

Al igual que en el caso del AIA, se evaluó la degradación de indol en fases exponencial y estacionaria de cultivo de E109. Los resultados se resumen en la **Figura 76**.

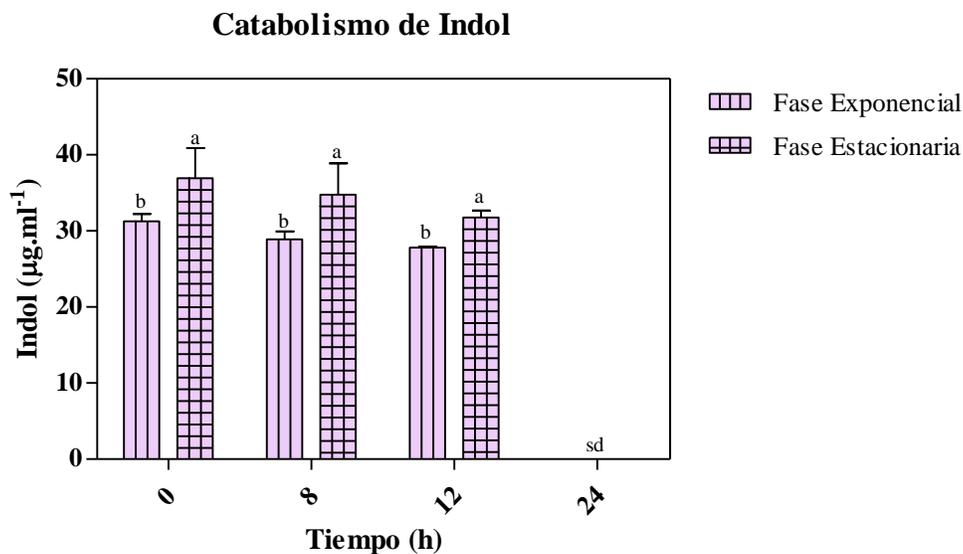


Figura 76. Concentración de indol agregado exógenamente ($40 \mu\text{g.ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109 en fase exponencial y estacionaria, en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$.

Cuando evaluamos el catabolismo de indol en fase exponencial y estacionaria de crecimiento de E109, no observamos diferencia en la velocidad de degradación como en AIA donde la degradación fue mayor en fase estacionaria de crecimiento. En resumen, *B. japonicum* E109, aunque no es productora de indol, es capaz de degradar esta molécula cuando se adiciona exógenamente al medio de cultivo, aunque la velocidad de degradación del indol es diferente (más lenta) a la de velocidad de degradación del AIA.

V.3.4 Catabolismo de Indol en concentraciones crecientes de indol

Evaluamos si la degradación de indol tiene un posee un comportamiento de saturación. Estos resultados se resumen en la **Figura 77**.

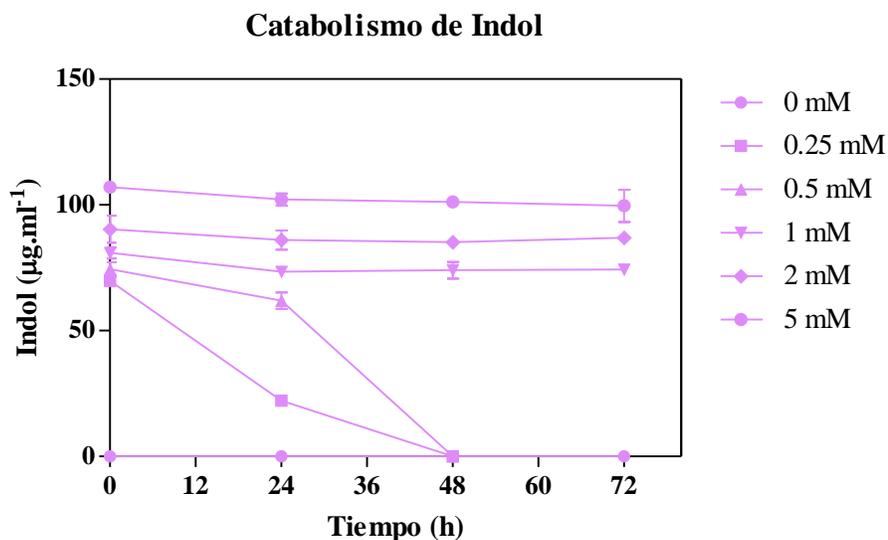


Figura 77. Concentración de indol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109 en función del tiempo (h) con la adición exógena 0-5 mM de indol. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$).

Como podemos observar en la **Figura 77**, un cultivo de E109 es capaz de degradar totalmente indol hasta una concentración final de 0.5 mM (aproximadamente $70 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de la hormona) en 12 horas posteriores a la inducción. A concentraciones mayores de la hormona, hay una degradación parcial y se observa una clara cinética de saturación.

V.3.5 Evaluación del catabolismo de indol en la mutante para el gen *ngrC* (similar a *iacA*) de *B. diazoefficiens* 8620

Una de las hipótesis en la que nos basamos para investigar la degradación de indol en E109, es que la enzima IacA en *Acinetobacter baumannii* sería responsable de degradar indol (Lin et al., 2012). Por ello utilizamos la mutante de USDA110 con la mutación en el gen similar a *iacA*.

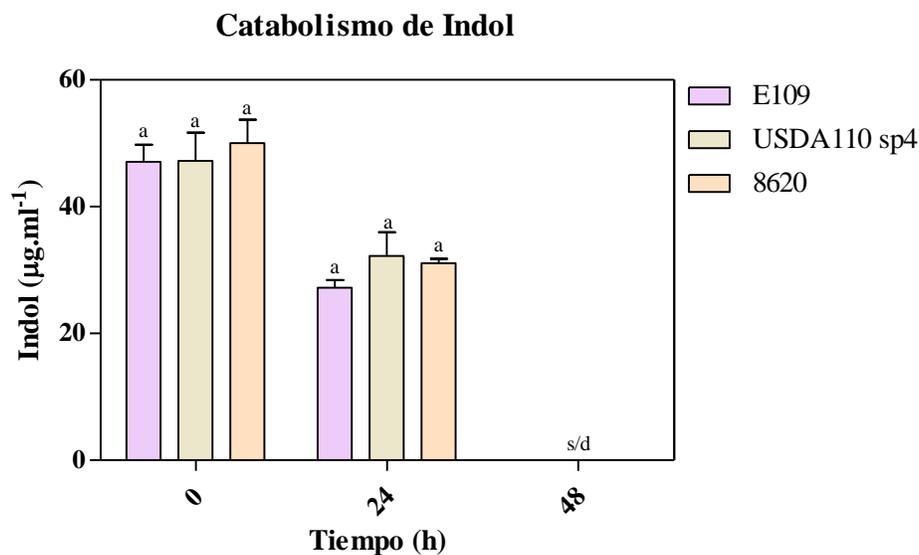


Figura 78. Concentración de indol ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) en cultivos de *B. japonicum* E109, *B. diazoefficiens* USDA110 sp4 y la mutante *B. diazoefficiens* 8620 en función del tiempo (h) con la adición exógena 0.5 mM de indol. Las barras representan el promedio y su SD ($n=3$). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$.

En la **Figura 78**, podemos observar que E109 como la cepa salvaje de USDA110 y la mutante 8620 deficiente para la enzima IacA degradaron el indol agregado exógenamente. Esto indica que en E109, la enzima IacA no estaría involucrada en la degradación de indol.

V.3.6 Evaluación del catabolismo de indol por E109 y la mutante E109 $\Delta iacC$

Debido a que la proteína codificada por el gen *iacA* no está involucrada en la degradación de AIA, evaluamos la enzima IacC.

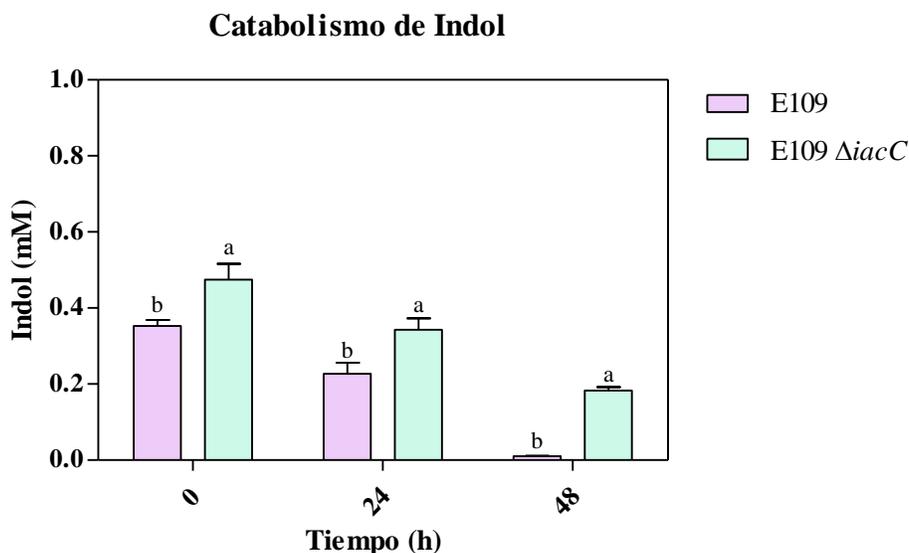


Figura 79. Concentración de indol (mM) en cultivos de *B. japonicum* E109 y la mutante *B. japonicum* E109 $\Delta iacC$ en función del tiempo (h) con la adición exógena 0.5 mM de indol. Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$.

La evaluación del catabolismo de indol en la mutante E109 $\Delta iacC$, mostró que es capaz de degradar indol a una velocidad menor que la cepa salvaje pero lo continua degradando. Llevamos a cabo otros experimentos con concentraciones menores de 0.5 mM de indol (esta es la concentración máxima que puede catabolizar AIA, como observamos en experimentos anteriores), y se observa un catabolismo total del contenido adicionado (datos no mostrados). Estos resultados indican que la enzima IacC no está involucrada en la degradación de este compuesto.

Resumiendo, las enzimas codificadas por los genes *iacA* e *iacC* no son responsables de la degradación de indol en E109 mostrando que no comparte una vía en común con el catabolismo de AIA.

V.4 DISCUSIÓN

Los microorganismos degradan indol por mineralización o co-metabolismo (biotransformación). En la mineralización, las bacterias utilizan el indol como fuente de carbono y energía, y lo degradan por completo a través de una serie de reacciones químicas. En el proceso de biotransformación, el indol se transforma en otros compuestos en presencia de una fuente de carbono adicional. Estos productos biotransformados pueden ser más o menos tóxico que el indol y a veces se usan como productos útiles para la industria; por ejemplo, varias bacterias convierten indol a índigo, un pigmento de valor industrial. Del mismo modo, *Arthrobacter sp.* SPG biotransforma el indol en AIA, ácido indol-3-glioxílico, y indol-3-aldehído (Arora y Bae, 2014). Algunos microorganismos adoptan mecanismos de desintoxicación a través de la biotransformación y la convierten en compuestos menos tóxicos o no tóxicos, por ejemplo, *Cupriavidus sp.* cepa KK10 transforma el indol en productos menos tóxicos o no tóxicos a través del clivaje del anillo N-heterocíclico o de escisión de anillo aromático carbocíclico (Fukuoka et al., 2015).

Lin et al. (2012) observaron que la enzima IacA podría degradar AIA e indol, por ello evaluamos la capacidad de *B. japonicum* E109 para degradar este compuesto. No existen reportes sobre la degradación de indol en *B. japonicum*. En nuestra investigación encontramos que E109 es capaz de degradar indol de manera similar al AIA por lo que podría existir una conexión metabólica de ambas vías metabólicas. La degradación ocurre en cultivos y sobrenadantes, hasta una concentración de 0.5 mM por lo que se considera constitutiva; sin embargo la velocidad con la que se cataboliza el compuesto no se diferencia en ninguna de las fases de crecimiento de la bacteria, a diferencia de lo que ocurre con la hormona, que se acumularía en fase estacionaria. La evaluación del catabolismo de indol con la mutación en un gen similar a *iacA* de USDA110, mostró que esta enzima no está involucrada en la degradación de este compuesto. Hay reportes que indican que las dioxigenasas, entre otras enzimas, serían las responsables de la degradación de indol (Eaton y Chapman, 1995; Qu et al., 2013). La búsqueda en el genoma de E109 evidenció que E109 posee 15 dioxigenasas, y que algunas de ellas han sido reportadas en la degradación de indol en otras bacterias. La presencia de dioxigenasas en E109 fue confirmado por la degradación de fenantreno (dato no mostrado). Evaluamos el catabolismo de indol con la mutante $\Delta iacC$ de E109, pero al igual que *iacA*, esta enzima tampoco está relacionada a la degradación de indol como si está relacionada al catabolismo de AIA. Estos resultados, abren la puerta a futuras investigaciones para encontrar respuestas acerca de la ventaja fisiológica en E109 que le otorga la degradación de indol, encontrar la o las enzimas responsables de esta vía y su ventaja o desventaja frente a su simbiote.

V.5 CONCLUSIONES

De este capítulo de Tesis, derivan las siguientes conclusiones:

1. *B. japonicum* E109 es capaz de catabolizar indol.
2. La degradación ocurre tanto en cultivos como en sobrenadantes, por lo que consideramos que es de carácter constitutivo.
3. Tiene una cinética de saturación, ya que solo puede degradar hasta 0.5 mM de indol de manera completa.
4. Las enzimas codificadas por los genes *iacA* e *iacC* no están involucradas en la degradación de este compuesto, porque la mutación de estos genes en E109 continuó degradando indol.

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

CAPÍTULO VI: Análisis transcriptómico del catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

VI.1 INTRODUCCIÓN

VI.1.1 Secuenciación de ARN (RNA-Seq) y análisis transcriptómico

Las moléculas de ARN son componentes esenciales de todas las células vivas. En los organismos celulares desempeña diversas funciones, ya que es la molécula que dirige las etapas intermedias de la síntesis proteica; el ADN utiliza el ARN para transferir esta información vital durante la síntesis de proteínas (producción de las proteínas que necesita la célula para sus actividades y su desarrollo). Comprender la identidad y la abundancia de cada molécula de ARN en una célula dada bajo una condición específica es el objetivo final de la investigación del ARN.

Las tecnologías de alto rendimiento que permiten la investigación de las secuencias de ARN a gran escala surgieron a principios de la década de los 90. Uno de los primeros métodos utilizados fue el método EST, acrónimo del inglés Expressed Sequence Tag, y examina la expresión génica mediante la secuenciación parcial de clones complementarios de ADN (ADNc), revelando tanto la secuencia como la abundancia del ARN correspondiente (Adams et al., 1992); sin embargo, el alto costo de secuenciación y su carácter semicuantitativo limitaron su utilización extensiva. El método SAGE del acrónimo, Serial Analysis of Gene Expression, desarrollado por Velculescu et al. (1995) redujo significativamente el costo del análisis de expresión, gracias a la secuenciación de una región corta de ADNc; sin embargo, este tipo de tecnologías fueron reemplazadas por la de microarrays (Schena et al., 1995; Lockhart et al., 1996). El análisis de microarrays se basa en la hibridación de secuencias dianas marcadas fluorescentemente que se derivan de transcripciones a sondas que están unidas a una superficies sólidas mediante impresión o síntesis *in situ*. Sin embargo, el requisito del método es la necesidad de poseer *a priori* la secuencia de los genomas o transcritos de referencia para el diseño de las sondas.

La secuenciación de nueva generación o NGS, del acrónimo Next Generation Sequencing, transformó rápidamente la investigación con ARN. En tal sentido, la secuenciación de ARN o RNA-Seq es el método de elección para estudiar la expresión génica e identificar nuevas especies de RNA. En comparación con los métodos basados en microarrays, la RNA-Seq ofrece menos ruido de fondo y un mayor rango dinámico para la detección. La RNA-Seq revela directamente la identidad de secuencia, crucial para el análisis de genes desconocidos y nuevas isoformas de transcripción. A la fecha, se han desarrollado varias tecnologías diferentes para RNA-Seq (Han et al., 2015; Nookaew et al., 2012; Adiconis et al., 2013; Li et al., 2014; Van Dijk et al., 2014).

La secuenciación directa de moléculas de ARN es posible (Ozsolak et al., 2009), aunque la mayoría de los experimentos de ARN-Seq se llevan a cabo utilizando equipos que secuencian moléculas de ADN. La preparación de la biblioteca de ADNc a partir de ARN es un paso requerido para RNA-Seq. Cada ADNc en una biblioteca para RNA-Seq y se compone de un inserto de ADNc flanqueado

por secuencias adaptadoras, según se requiera para la amplificación y secuenciación en una plataforma específica. 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).

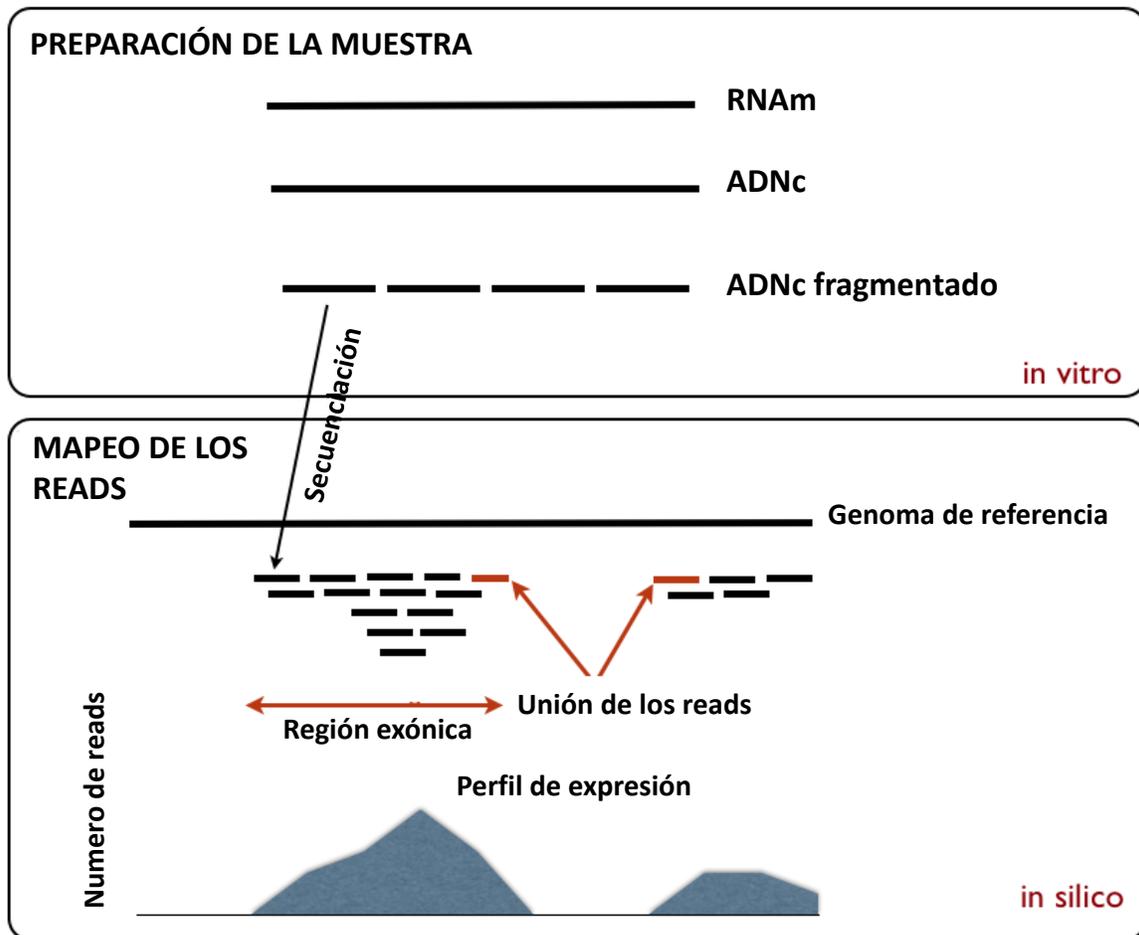


Figura 80. Protocolo de trabajo para el desarrollo de la metodología de RNA seq. Los ARN se convierten primero en una biblioteca de fragmentos de ADNc a través de la fragmentación del ARN o la fragmentación del ADN. Los adaptadores de secuenciación se añaden posteriormente a cada fragmento de ADNc y se obtiene una secuencia corta de cada ADNc usando tecnología de secuenciación de alto rendimiento. Las lecturas (o reads) de secuencia resultantes están alineadas con el genoma de referencia y se puede construir un patrón de expresión.

VI.1.1.1 Construcción de la biblioteca de RNA-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 interactúan con Piwi (piRNA) y ARNs de interferencia cortas (siRNA) y otros, se pueden secuenciar después 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).

VI.1.1.2 Bioinformática en RNA-seq

La RNA-Seq 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 RNA sobre genoma de referencia. Para ello existen varios programas tales como ELAND, SOAP (Li et al., 2008), MAQ (Li et al., 2008) y RMAP (Smith et al., 2008).

VI.1.1.3 Nivel de transcripción de RNA-seq

RNA-Seq 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 RNA 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 RNA-Seq es que puede capturar la dinámica del transcriptoma en diferentes condiciones sin normalización sofisticada del conjunto de datos (Wang et al., 2009).

VI.1.2 Transcriptómica en el estudio de *Bradyrhizobium*

Con el aumento de la capacidad de secuenciación a través de nuevas tecnologías de secuenciación, el enriquecimiento de ARNm y los microarrays, se ha vuelto más sencillo en estos últimos años estudiar los transcriptomas de organismos procarióticos (Sorek y Cossart, 2010). La transcriptómica

ha permitido el estudio de la interacción de la simbiosis *Bradyrhizobium*-soja como así también la expresión génica de *Bradyrhizobium* en una condición de interés. A modo de ejemplo, podemos mencionar el análisis de transcriptoma de pelos de raíz de soja inoculados con *B. diazoefficiens* USDA110 mediante tres tecnologías diferentes; hibridación de microarrays, secuenciación de Illumina y qRT-PCR, revelaron la expresión diferencial de 1.973 genes de soja durante la infección del pelo radical (Libault et al., 2010). La expresión diferencial de genes en la raíz de soja inoculada con *Bradyrhizobium*, mediante RNA-Seq., se encontraron 280 y 316 transcriptos sobreexpresados y reprimidos, respectivamente. Se detectaron 104, 182 y 178 genes asociados con componentes celulares, función molecular y proceso biológico, respectivamente (Qingyuan et al., 2015). El análisis transcripcional en dos cepas de *B. diazoefficiens*, con capacidades diferentes para la nodulación, ante la presencia de exudados de raíz de soja demostró que hubo grandes diferencias en los perfiles de expresión de genes relacionados con el sistema de dos componentes, quimiotaxis bacteriana, proteínas de transporte ABC, metabolismo de AIA y aptitud metabólica, lo que puede explicar la mayor competitividad de nodulación de *B. diazoefficiens* en la rizósfera (Liu et al., 2017). En el análisis transcripcional en *B. diazoefficiens* USDA110, mediante microarray, se observó una expresión incrementada de los genes implicados en la traducción, la motilidad y la síntesis de la membrana celular en medio rico, mientras que en medio mínimo la expresión aumentó para los genes implicados en la biosíntesis de vitaminas y las respuestas de estrés. El tratamiento con NaCl activó genes inducibles por estrés, pero reprimió genes implicados en la quimiotaxis y la motilidad. El sistema de secreción tipo III, se reguló negativamente en los bacteroides (Chang et al., 2007).

VI.1.3 Análisis transcriptómico del efecto de AIA sobre los microorganismos

El AIA es una fitohormona capaz de inducir, en procariotas y eucariotas, cambios en las expresiones de genes y proteínas que conducen a diferentes alteraciones fisiológicas. El tratamiento con AIA en *E. coli* K-12, reveló que 16 genes mostraron un nivel de expresión alterado. Estos genes codifican para componentes de envoltura celular o proteínas implicadas en la adaptación bacteriana a condiciones ambientales desfavorables. Las células tratadas con AIA aumentaron la producción de trehalosa, lipopolisacárido (LPS), exopolisacárido (EPS) y biofilm. También hubo un incremento en la tolerancia a varias condiciones de estrés (calor y frío, irradiación UV, shock osmótico, shock ácido y estrés oxidativo) y diferentes compuestos tóxicos (antibióticos, detergentes y colorantes) y esto se correlacionó con niveles más altos de las proteínas de choque térmico (Bianco et al., 2006b). El perfil transcriptómico de *Agrobacterium* en respuesta al AIA determinó la inducción de la transcripción de 115 genes, 51 genes reprimidos y 64 inducidos. Varios genes implicados en la

síntesis de aminoácidos y el metabolismo del carbono fueron regulados positivamente (Yuan et al., 2008). Se evaluaron los efectos de 0.5 mM AIA, en el metabolismo central de *S. meliloti* 1021 y se observó que la actividad de las enzimas clave del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA), citrato sintasa y la α -cetoglutarato deshidrogenasa, se incrementaron. También demostraron que el contenido de acetil-CoA intracelular se incrementó y la actividad de las enzimas clave, utilizando acetil-CoA para la biosíntesis de poli- β -hidroxibutirato (PHB), también se indujo. Sin embargo, los resultados obtenidos indicaron que el tratamiento con AIA no afectó significativamente el nivel de expresión de los genes del ciclo TCA y PHB (Imperlini et al., 2009). El análisis transcripcional, ante la exposición con 1 mM de AIA, en *A. brasilense* Sp245 y una mutante Sp245 *ipdC*⁻ (deficiente para la biosíntesis de AIA) demostraron una regulación positiva del sistema de secreción tipo VI (T6SS) en presencia de AIA. También se demostró que AIA es una molécula de señalización en esta bacteria ya que cuando se adicionó AIA a un cultivo de esta bacteria, el microorganismo cambió y se adaptó a una condición similar a la de la rizósfera, cambiando su perfil de proteínas de transporte y de superficie celular (van Puyvelde et al., 2011). El análisis de RNA-seq de próxima generación de *S. meliloti* salvaje 1021 y su mutante RD64, sobreproductora de ácido indol-3-acético, con 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{ml}^{-1}$ de AIA mostró un mayor número de cambios en genes implicados en el metabolismo, el procesamiento de información ambiental y el procesamiento de información genética (Defez et al., 2016). Estos ejemplos de análisis transcriptómicos en presencia de AIA, son de bacterias capaces de sintetizar esta hormona, pero no son capaces de degradarlo.

VI.1.3.1 Evaluación transcriptómica del efecto de AIA en *Bradyrhizobium* sp.

B. diazoefficiens USDA110 es una rizobacteria capaz de degradar el AIA. En el año 2013, se llevó a cabo el perfil transcripcional de USDA110 en función a la exposición con una solución pura de AIA. Un total de 1323 genes (619 sobreexpresados y 704 reprimidos) exhibieron expresión diferencial en USDA110 en respuesta a una exposición 1 mM de AIA durante 3 horas (Donati et al., 2013). Los genes implicados en la biosíntesis de aminoácidos, procesos celulares, funciones relacionadas con ácidos nucleicos, metabolismo energético, traducción y proteínas de transporte y unión, se reprimieron; mientras que muchos genes asociados con funciones reguladoras y funciones no definidas o hipotéticas, fueron regulados positivamente; las proteínas de shock térmico y de shock frío, al menos cinco genes relacionados con la biosíntesis de EPS, varios genes de respuesta al estrés oxidativo (como proteínas de resistencia a hidroperóxido orgánico) varias proteínas de replicación, recombinación y reparación del ADN, fueron reguladas positivamente. La exposición a AIA para los genes de la simbiosis y la fijación de nitrógeno involucraron tanto la inducción como la represión. El gen *nifH*, que codifica para la enzima dinitrogenasa reductasa, y el gen *nifA*, que

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

codifica una proteína reguladora nif-específica, fueron inducidas. Los genes del operón *fixNOQP*, que codifican proteínas implicadas en el complejo de citocromo c (*cbb3*) oxidasa de alta afinidad en la cadena respiratoria, la proteína de unión al clúster hierro-azufre y una proteína FixH fueron reprimidos.

VI.1.4 Importancia del análisis transcriptómico en el catabolismo de AIA en E109

B. japonicum E109 ha demostrado que tiene la capacidad de degradar AIA, en todas las fases de crecimiento y con una cinética de saturación. Como parte de esta investigación, hemos dilucidado que la enzima responsable de esta actividad es la 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa. Los cultivos de E109 tratados exógenamente con AIA son capaces de degradar la fitohormona y cuando los mismos se utilizan para inocular semillas de soja, aumenta su asociación simbiótica con la bacteria e incrementa su crecimiento. Teniendo en cuenta estos resultados, llevamos a cabo el análisis transcriptómico de un cultivo de E109 tratado de manera exógena con AIA para estudiar la expresión de genes más relevantes en este proceso metabólico y comprender como estos impactan en la capacidad de la bacteria para interactuar con semillas de soja.

VI.2 METODOLOGÍA

Esta metodología fue llevada a cabo en una Universidad Federal de Paraná en Curitiba, Brasil, bajo la dirección del Dr. Emanuel de Souza y la colaboración de la Dra. Anelis Marin. Esto se pudo realizar gracias a un programa de colaboración científica entre Argentina y Brasil financiado por un proyecto CNPq-CONICET Nivel II.

VI.2.1 Catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109 para análisis de transcriptómica

Se inoculó un frasco de vidrio de 250 ml de capacidad, conteniendo 100 ml de medio de cultivo EMA (Vincent, 1970) con un pre-cultivo de *B. japonicum* E109. El cultivo se incubó en estufa a 30°C y con una agitación de 180 rpm. Una vez que el cultivo llegó a una DO₅₉₅ aproximadamente de 1.2, correspondiente a fase exponencial tardía, se tomaron alícuotas de 10 ml y se colocaron en erlenmeyers estériles de 50 ml de capacidad. Este modelo experimental se realizó por quintuplicado y para cada condición experimental, que se detallan a continuación:

1. Cultivo de E109 (control)
2. Cultivo de E109, con la adición de 0.5 mM de AIA

En el tratamiento control se adicionó un volumen de agua destilada estéril equivalente, como un control de la dilución. Como parámetros de mayor interés fueron evaluados el crecimiento para la determinación de la DO₅₉₅, el recuento de unidades formadoras de colonias (ufc.ml⁻¹) y se llevó a cabo los controles de calidad relacionados con la pureza de los cultivos en agar EMA (Vincent, 1970) y agar TSA. La concentración de AIA se midió cada 2 horas, desde la inducción, hasta las 8 horas donde se detuvo el experimento.

VI.2.2 Extracción de ARN por el método de Trizol®

Cuando los cultivos mencionados en el ítem anterior, llegaron a las 8 horas post inducción, se agregó en mismo volumen de una solución llamada RNAlater® (TermoFisher), para detener cualquier reacción metabólica que ocurra en el cultivo y para proteger el ARN. Cada tratamiento y cada réplica, se colocaron en tubos cónicos estériles y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue descartado 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 agregaron bolitas de zirconia y se centrifugó por 10 min a 13000 rpm, para romper las células. Se incubaron los tubos a temperatura ambiente durante 2-3 min. Luego se transfirieron 600 µl de la fase acuosa (que contiene el ARN), en un nuevo tubo. En este nuevo recipiente, el ARN fue precipitado con 500 µl de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

por 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 μ l de agua ultrapura libre de ARNsas. Finalmente, el ARN fue purificado y visualizado en un gel de agarosa al 1% (p/v). Fueron realizadas extracciones de réplicas biológicas.

VI.2.3 Cuantificación y evaluación de la integridad del ARN

El ARN total extraído fue cuantificado por espectrofotometría a 260nm utilizando el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (ThermoScientific). La validación de la integridad del ARN total extraído, se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v), coloreadas con una solución de bromuro de etidio al 1% (p/v) y fueron visualizadas con luz ultravioleta en un transiluminador UV.

VI.2.4 Tratamiento con la enzima DNasa

En las muestras obtenidas se llevó a cabo la inactivación de las posibles DNasas presentes en las muestras de ARN extraído. A cada réplica se adicionó DNasa Buffer y 2 μ l de DNasa I (2U/ μ l). La mezcla se incubó a 37°C por 30 minutos. Luego se agregó solución inactivante (ADNse Inactivation Reagent), 20% del volumen, y las muestras fueron mantenidas a temperatura ambiente por 2 min, tiempo en el que fue homogeneizada vigorosamente en dos ocasiones durante este período. Después de la incubación, la mezcla fue centrifugada, a 13.400 rpm por 60 segundos, para precipitar la solución inactivante. El sobrenadante conteniendo el ARN fue transferido en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 ml de capacidad. De la misma manera que las visualizaciones anteriores, un gel de agarosa al 1% (p/v), libre de ARNsas, fue realizado para analizar la muestra.

VI.2.5 Depleción de rRNA

El ARN total (4–10 μ g aproximadamente) fue disuelto en 15 μ l de agua, fue seguidamente depletado el ARN ribosomal utilizando el kit MICROBExpress™ (Ambion®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez realizado este procedimiento se utilizó el equipo de Agilent 2100 Bioanalyzer para evaluar la integridad del ARN a través de la obtención del número RIN (RNA Integrity number).

VI.2.6 Construcción de las bibliotecas de ADNc y secuenciación

Para la construcción de las bibliotecas destinadas al secuenciamiento, 500 ng de ARN (depletado de rRNA, en un máximo de 8 μ l) se utilizó el método de preparación por agotamiento de ARN

ribosómico para Proton RNA-seq. El ARN fue fragmentado, se ligaron los adaptadores antes de la amplificación y se realizó la secuenciación de próxima generación. Las bibliotecas de ADNc se evaluaron y se cuantificaron usando el chip de Agilent Bioanalyzer. Enseguida, estas bibliotecas se amplificaron usando PCR en emulsión unidas a esferas de iones por Ion Torrent OneTouch™ 2. Las bibliotecas templadas por el kit v3 Ion PI™ template se secuenciaron en el sistema de Ion Torrent Proton™, mediante el kit v3 Ion PI™ sequencing chip V2 siguiendo los protocolos de life technologies. La secuenciación se realizó enjuagando los nucleótidos individualmente sobre la superficie del chip que contiene la biblioteca. Las lecturas “reads” se producen mediante la detección del cambio del pH de los nucleótidos que se van incorporando (Merriman et al., 2012).

VI.2.7 Análisis del Transcriptoma

Las secuencias obtenidas fueron inicialmente comparadas y mapeadas utilizando el programa bioinformático CLC (Genomics Workbench 4.8, QIAGEN, Company Netherlands). Para el análisis y normalización de las bibliotecas, las lecturas correspondientes a los genes de tRNA fueron excluidas. La normalización de las lecturas fue realizada por el método de RPKM utilizando la ecuación que considera el tamaño de la biblioteca, el tamaño de los genes y el número de lecturas por gen. Además, fue realizado un análisis para la expresión diferencial de los genes. Luego se llevó a cabo el mapeamiento de los reads obtenidos, con el genoma completo de *B. japonicum* E109 disponible en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/CP010313>). El procesamiento de datos y análisis estadísticos de la expresión génica diferencial fueron realizados utilizando el software CLC Genomics Workbench 6.5, DESeq (paquete R del proyecto de Bioconductor) y edgeR (análisis de expresión diferencial de datos de expresión genética digital). Se consideraron regulados aquellos genes que presentaron:

- cobertura de los reads mayor a 3
- \log_2 Fold Change mayor a 2
- p value menor o igual 0.05, para DESeq
- p value menor o igual 0.05, para edgeR

Los valores expresados en RPKM (Reads Per Kilobase of exon model per Million mapped reads) (Mortazavi et al., 2008) se calcularon con el software CLC Genomics Workbench 6.5.

VI.3 RESULTADOS

VI.2.1 Catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109 para análisis de transcriptómica

Se evaluó la degradación de 0.5 mM AIA por E109. Esta concentración se eligió debido a que es la máxima concentración de AIA que el microorganismo puede degradar.

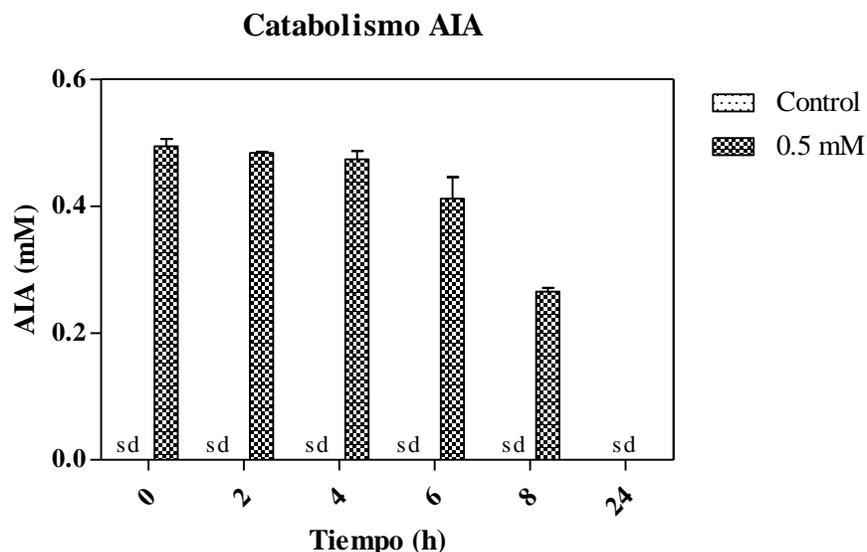


Figura 81. Concentración de AIA en cultivos control de *B. japonicum* E109 y *B. japonicum* E109 con la adición de 0.5 mM de AIA en función del tiempo (h). Las barras representan el promedio y su SD (n=3). Las letras diferentes representan diferencias significativas por el test de Tukey con un $p < 0,05$.

En la gráfica se puede observar que en el tratamiento control no se detectó contenido de la fitohormona, mientras que en el tratamiento con la adición de 0.5 mM de AIA se observa una degradación del 50% del contenido a las 8 horas desde la inducción y a las 24 horas ya no se encuentran rastros del compuesto. El experimento se detuvo a las 8 horas post inducción para la extracción de ARN, porque en ese momento había AIA en el medio y el metabolismo de la bacteria se encontraba activo degradando la fitohormona.

VI.3.2 Evaluación de la integridad del ARN

Para el análisis de transcriptómica del tratamiento control y el tratamiento con adición exógena de AIA, se realizó la cuantificación y evaluación de la integridad del ARN obtenido de cada una de las réplicas de los tratamientos. Como mencionamos previamente, la validación de la integridad del ARN total extraído, se llevó a cabo por electroforesis en gel de agarosa al 1%.

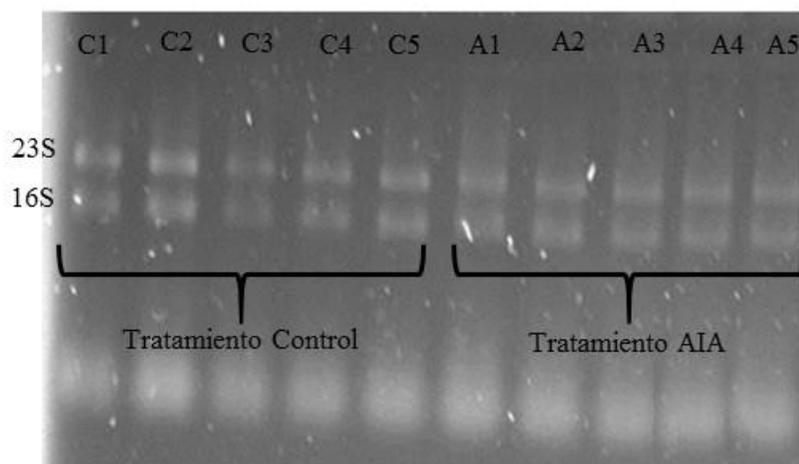


Figura 82. Electroforesis en gel de agarosa al 1% donde se visualiza el ARN total de todas las réplicas de ambos tratamientos; Tratamiento Control (C1, C2, C3, C4 y C5) y Tratamiento con 0.5 mM de AIA (A1, A2, A3, A4 y A5).

En la figura se puede observar que el ARN extraído de cada una de las muestras se encontraba en perfecta calidad para la secuenciación del transcriptoma. Una vez chequeada la integridad de los ARN se realizó los procedimientos mencionados en la metodología.

VI.3.3 Análisis transcriptómico del catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109

B. japonicum E109 es capaz de degradar el AIA adicionado de manera exógena en el medio de cultivo en todas las fases de crecimiento, pero con mayor velocidad durante la fase exponencial. Además, tiene una cinética de saturación porque solo puede degradar hasta 0.5 mM de la fitohormona. Este comportamiento es de carácter enzimático, llevado a cabo por la 3-fenilpropionato dioxigenasa o IacC. Con estos resultados, quisimos evaluar que es lo que sucedía en el metabolismo de la bacteria mientras sucedía la degradación de AIA. A continuación se presentan los resultados obtenidos.

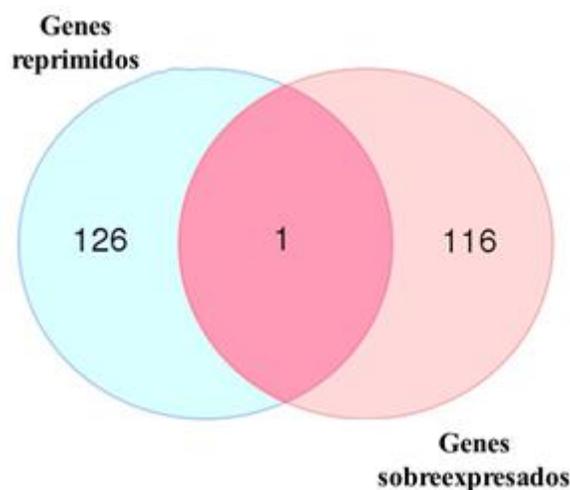


Figura 83. Número de genes expresados diferencialmente durante el catabolismo de AIA en E109.

El análisis de los genes expresados diferencialmente, por CLC, Deseq y EdgeR, arrojaron que durante el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109 se expresaron en total 242 genes, de los cuales 126 genes se reprimieron y 116 genes se sobreexpresaron, de un total de 8621 genes. Para analizar los genes que se expresaron diferencialmente, primero se identificaron con la herramienta NCBI y luego de identificar cada gen, utilizamos KEGG genes (<https://www.genome.jp/kegg/genes.html>) para asociar una función biológica a cada gen (Kanehisa et al., 2012).

VI.3.3.1 Genes expresados diferencialmente

En la **Figura 84** podemos observar que las categorías con mayor cantidad de genes expresados diferencialmente son: transportadores, vías metabólicas, proteínas hipotéticas, enzimas, reguladores transcripcionales y otras categorías. Las categorías de genes inducidos fueron los transportadores, proteínas hipotéticas y enzimas. Por otro lado, los genes reprimidos afectaron todas las categorías mencionadas previamente. Los genes expresados diferencialmente del transcriptoma del catabolismo de AIA, muestran la expresión global del genoma de E109. El resultado de la intersección de los tres análisis estadísticos (CLC, Deseq y EdgeR) no permitió conocer la expresión diferencial de los genes que son de interés para nuestro estudio, por lo cual hemos flexibilizado el análisis del transcriptoma. Esta flexibilización se realizó teniendo en cuenta el fold change $\geq \pm 2$ y $p < 0.05$ de los datos arrojados por el software CLC. Para algunos casos particulares, con el fin de enriquecer la información del análisis se tomaron algunos genes con un fold change $\geq \pm 1$ y un valor de p cercano. Con este nuevo análisis, las categorías de genes inducidos y

reprimidos fueron similares al análisis anterior pero con mayor número de genes en cada vía. A continuación, se mostrará el análisis de clústers con genes seleccionados de forma separada tanto para la expresión negativa (represión) como positiva (inducción).

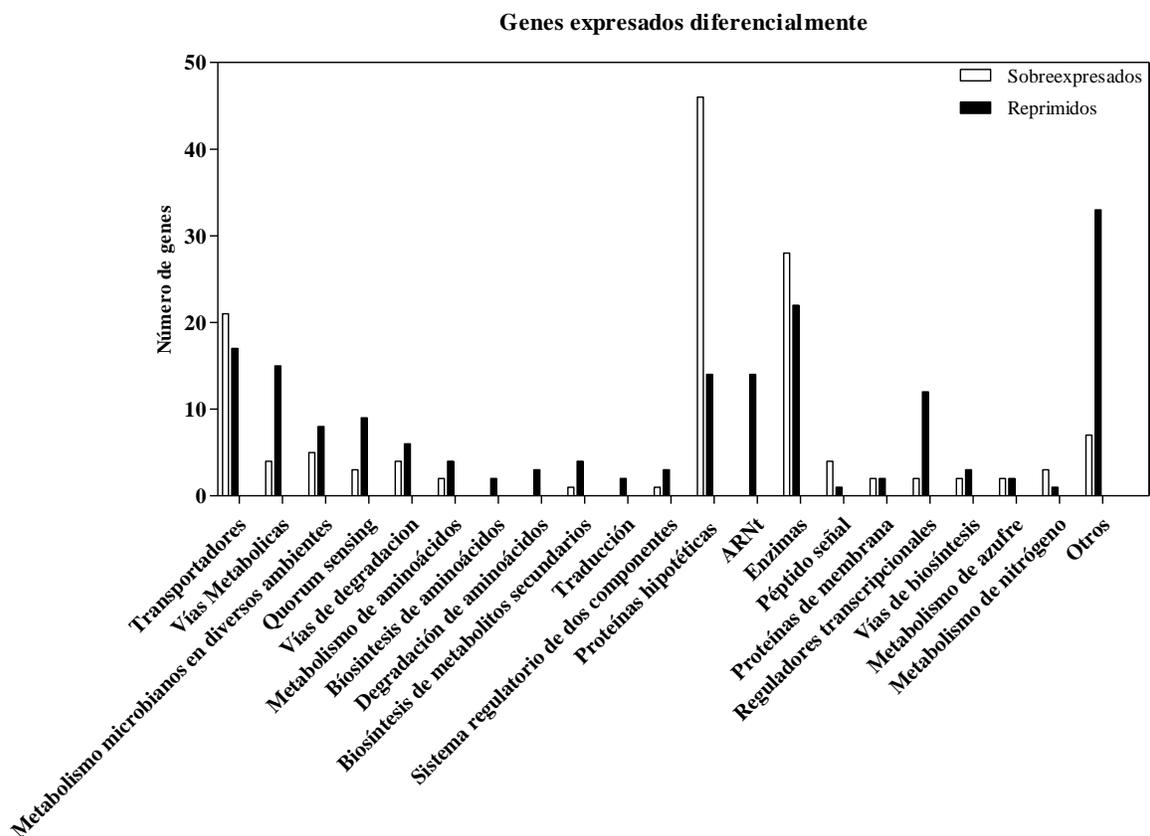


Figura 84. Genes expresados diferencialmente, clasificados según las vías metabólicas de KEGG, durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

VI.3.3.2 Metabolismo de Nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno es uno de los mecanismos más estudiado en rizobacterias y particularmente en *B. japonicum*. Por esta razón, analizamos como la adición exógena de AIA en el medio de cultivo podría afectar los genes de este clúster, con principal interés a nivel de la fijación biológica. En la siguiente figura se observan los genes sobreexpresados y reprimidos en el metabolismo de nitrógeno durante el proceso de degradación de AIA.

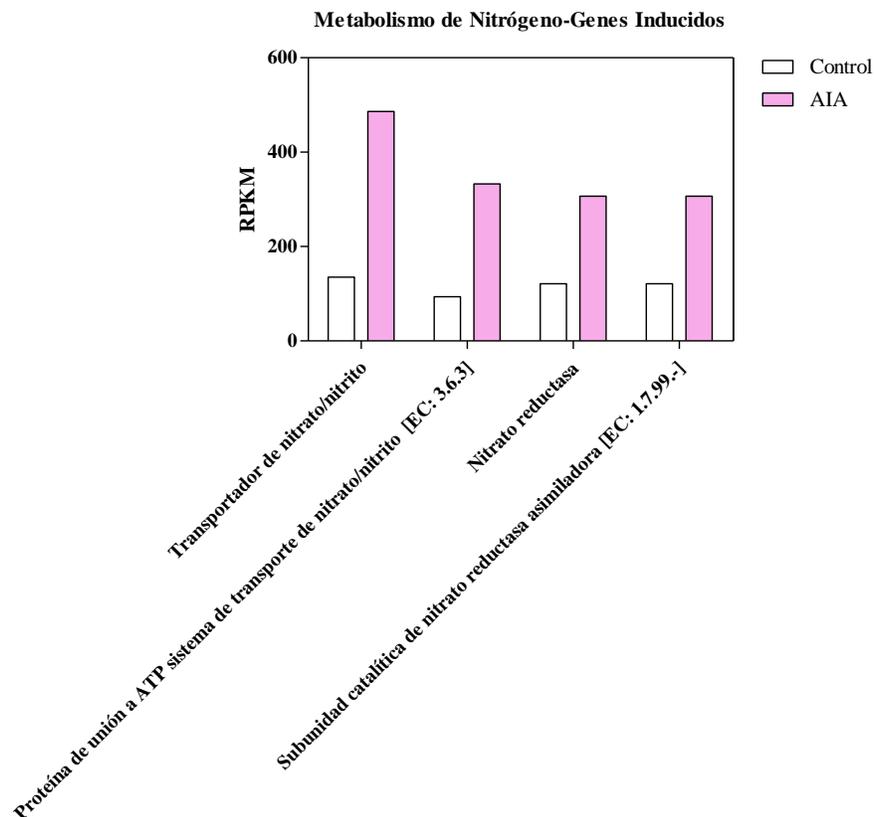


Figura 85. Genes sobreexpresados en el metabolismo de nitrógeno, durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

En la **Figura 85** se puede observar cuatro genes sobreexpresados del metabolismo del nitrógeno: el gen RN69_33760 (transportador de nitrato/nitrito) que se expresó 72% respecto a su control, el gen RN69_33765 que codifica para la proteína de unión a ATP sistema de transporte de nitrato/nitrito que se indujo su expresión un 71%. Estos genes están involucrados en la conversión y transporte de nitrato a nitrito, para la posterior conversión a amonio. El gen RN69_33745 (nitrato reductasa) que se expresó un 60%, el gen RN69_33745 (subunidad catalítica de nitrato reductasa asimiladora [EC: 1.7.99.-] o nitrato reductasa) con una expresión diferencial del 60%. Además, se expresó diferencialmente el gen RN69_07270 (2-nitropropano dioxigenasa) pero no fue incluido en la figura debido a que solo se expresó un 9% más respecto a su control (RPKM=1.19).

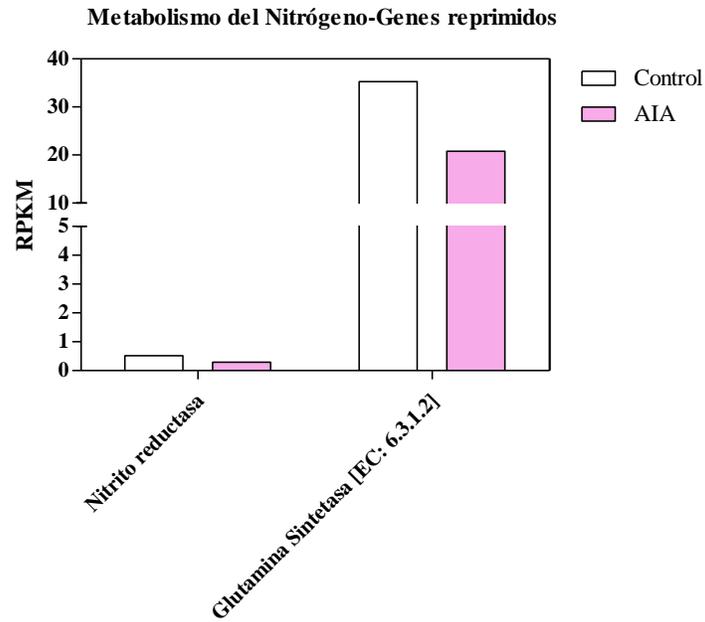


Figura 86. Genes reprimidos en el metabolismo de nitrógeno, según KEGG, durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

En cuanto a los genes reprimidos, solo hubo 2 genes: RN69_11365 (Nitrito reductasa) y RN69_05355 (Glutamina Sintetasa [EC: 6.3.1.2]) que convierte amonio en glutamina. La expresión de los genes se vio reducida en un 40% aproximadamente del control.

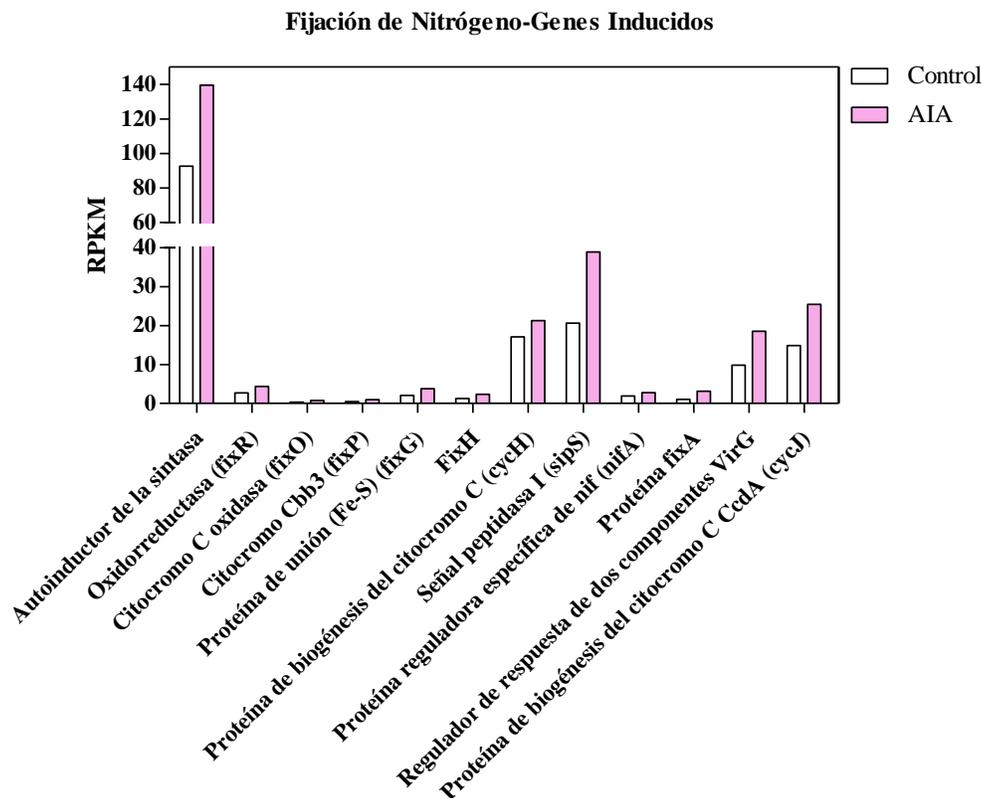


Figura 87. Genes sobreexpresados de la fijación de nitrógeno, durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

Del clúster de la fijación biológica de nitrógeno se indujeron positivamente doce genes: RN69_05315 (Autoinductor de la sintasa), RN69_37945 (*fixR*), RN69_34010 (*fixO*), RN69_34000 (*fixP*), RN69_33995 (*fixG*), RN69_33990 (*fixH*), RN69_32210 (*cycH*), RN69_42000 (*sipS*), RN69_37940 (*nifA*), RN69_37935 (*fixA*), RN69_34460 (Regulador de respuesta de dos componentes VirG) y RN69_32205 (*cycJ*). Podemos resaltar que los genes con mayor expresión positiva fueron *fixO* y *fixP* con 57% y 56% de valores porcentuales respecto al control.

Un solo gen se encontró reprimido, con un valor porcentual 3.6 % menor respecto del control y es el gen RN69_34015 que codifica para *fixN*.

VI.3.3.3 Simbiosis

En la siguiente figura se van a mostrar algunos genes del clúster relacionado con la simbiosis expresados diferencialmente.

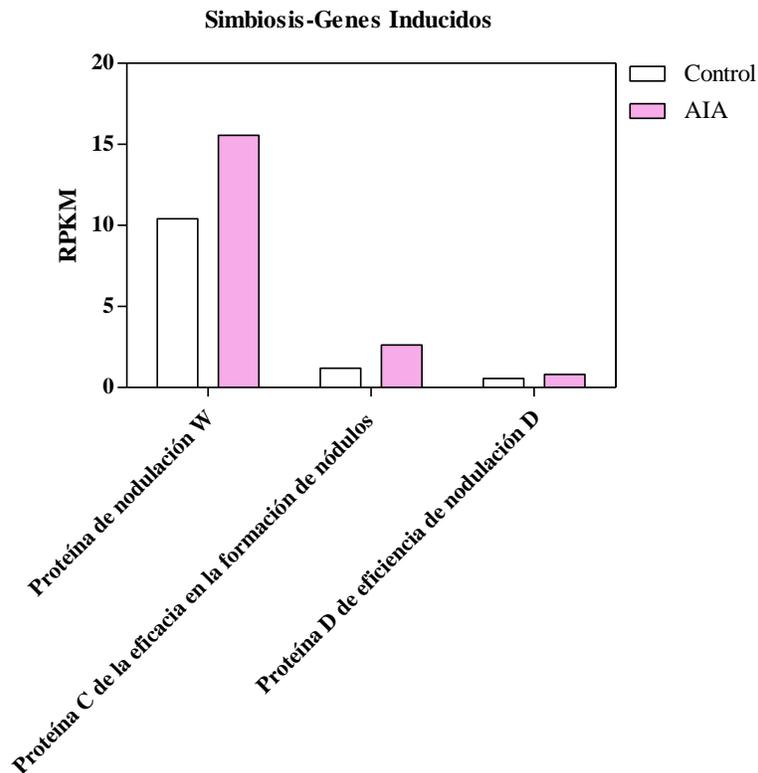


Figura 88. Genes de la simbiosis sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109.

Además de la expresión de genes de la fijación biológica de nitrógeno, también se indujeron positivamente tres genes relacionados con la simbiosis. Estos genes son: RN69_39365 (Proteína de nodulación W), RN69_37810 (Proteína C de la eficacia en la formación de nódulos) y RN69_23080 (Proteína D de eficiencia de nodulación D). La expresión porcentual de estos genes fue 33, 50 y 30% más en referencia a la expresión del tratamiento control sin AIA.

VI.3.3.4 Quimiotaxis y movilidad

En la siguiente figura se observan los genes inducidos en la quimiotaxis en *B. japonicum* E109.

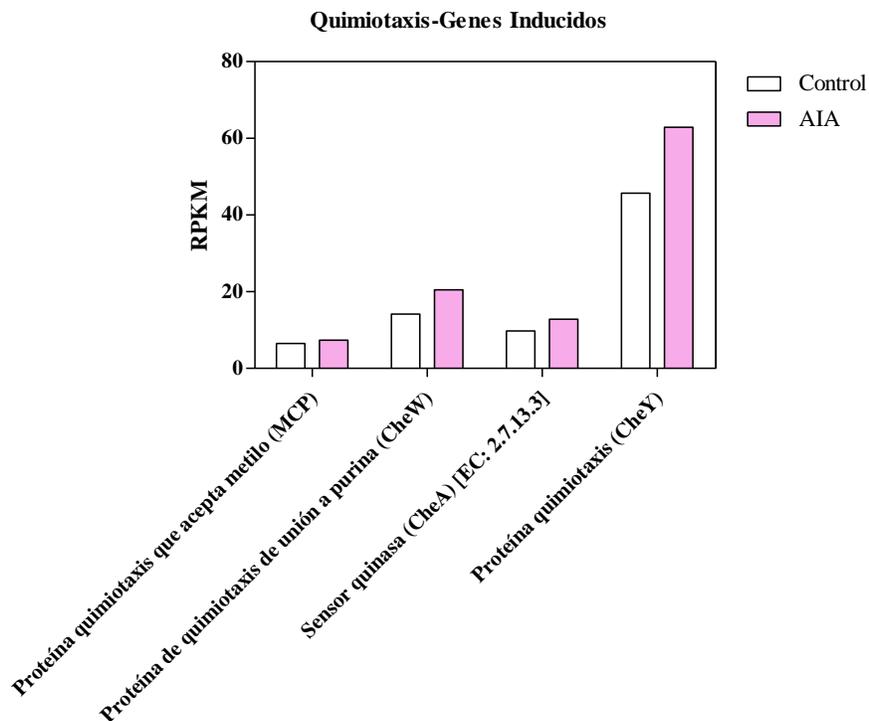


Figura 89. Genes de la quimiotaxis sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109.

En la **Figura 89**, se observan los genes expresados positivamente que codifican para las siguientes proteínas; RN69_10715 (MCP), RN69_01680 (CheW), RN69_36365 (CheA) y RN69_01660 (CheY) con una expresión de 11%, 30%, 23% y 27% respectivamente.

Un solo gen de la quimiotaxis tuvo una inducción negativa, es decir se reprimió cuando se adicionó AIA al medio, el gen RN69_36335 que codifica para la proteína CheB (proteína-glutamato metilesterasa/glutaminasa [EC: 3.1.1.61/3.5.1.44]) con un expresión menor de 6.5%.

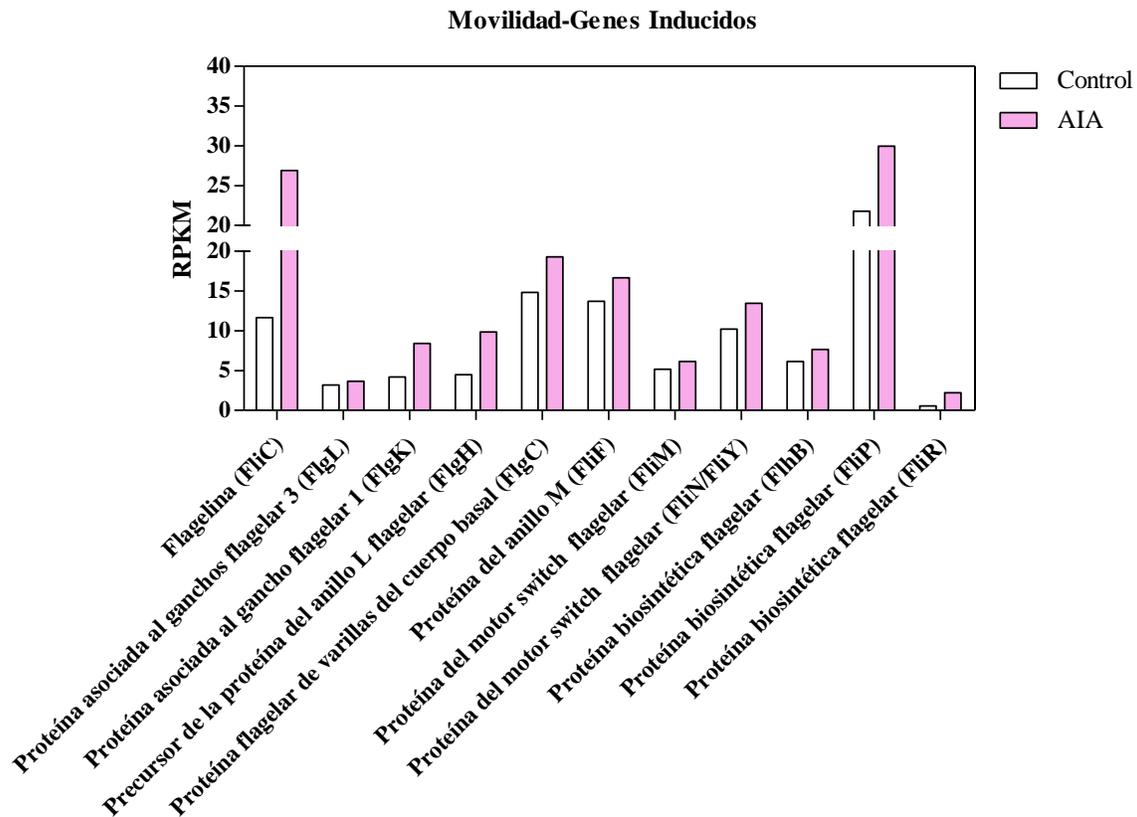


Figura 90. Genes de la movilidad sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109.

En relación a la movilidad bacteriana, se indujeron 11 genes. Estos son RN69_12335 (FliC), RN69_12390 (FlgL), RN69_18695 (FlgK), RN69_12320 (FlgH), RN69_18890 (FlgC), RN69_11755 (FliF), RN69_12260 (FliM), RN69_11740 (FliN/FliY), RN69_18910 (FliH), RN69_18875 (FliP) y RN69_12420 (FliR). A modo de ejemplo, podemos notar que la proteína FliR se indujo 74% más respecto al control sin AIA. Por otra parte, no se reprimió ningún gen vinculado a la movilidad.

VI.3.3.5 Transporte y Sistema de Secreción

A continuación, se muestran los genes inducidos positiva y negativamente pertenecientes a los sistemas de secreción tipo I, II y IV.

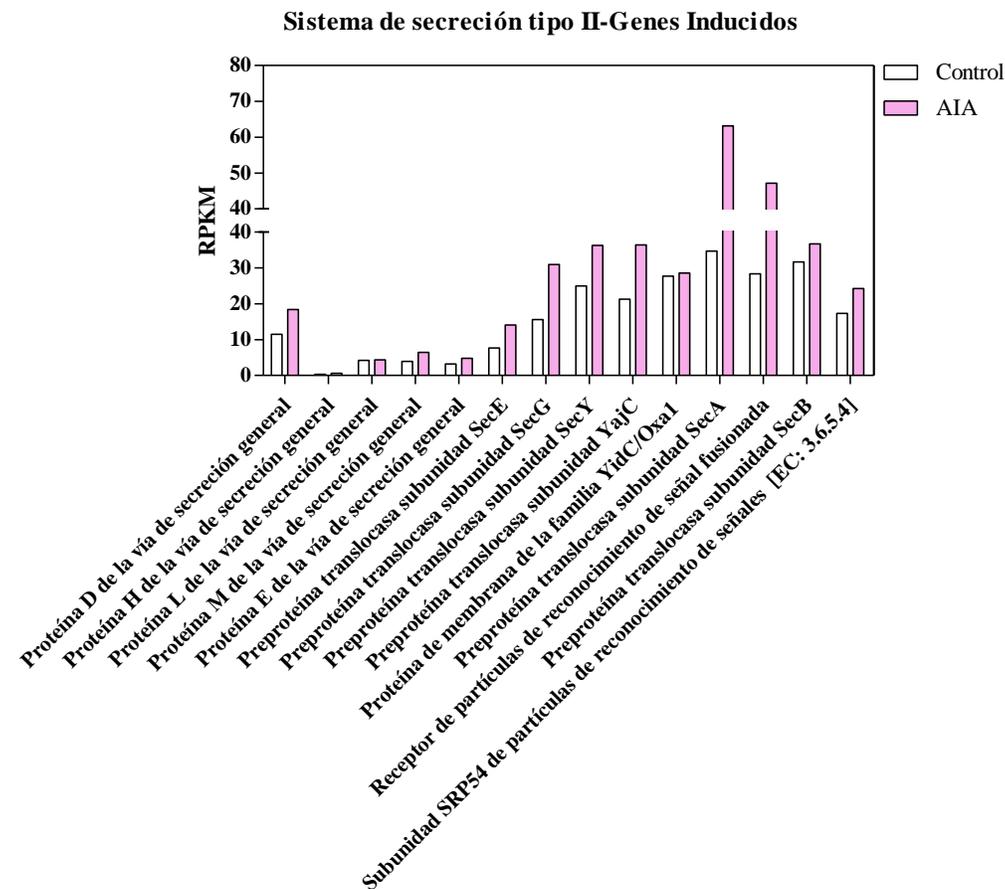


Figura 91. Genes del sistema de secreción tipo II sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109.

Los resultados obtenidos permitieron resaltar la inducción de la expresión de los genes RN69_17835 (proteína D), RN69_17845 (proteína F), RN69_17850 (proteína G), RN69_17855 (proteína H), RN69_17860 (proteína I), RN69_17865 (proteína J), RN69_17870 (proteína K), RN69_17875 (proteína L), RN69_17880 (proteína M), RN69_17840 (proteína E), RN69_21205 (pre-proteína SecE), RN69_23900 (pre-proteína SecG), RN69_21390 (pre-proteína SecY), RN69_24290 (pre-proteína YajC), RN69_05980 (proteína de membrana de la familia YidC/Oxa1), RN69_01025 (pre-proteína SecA), RN69_02145 (receptor de partículas de reconocimiento de señal fusionada), RN69_02990 (pre-proteína SecB) y RN69_02185 (subunidad SRP54). Se apreció la inducción de la expresión de los genes que codifican para la proteína H, pre-proteína SecE, pre-

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

proteína SecG y pre-proteína SecA con una expresión de 48%, 45%, 49% y 45% respectivamente en referencia al control.

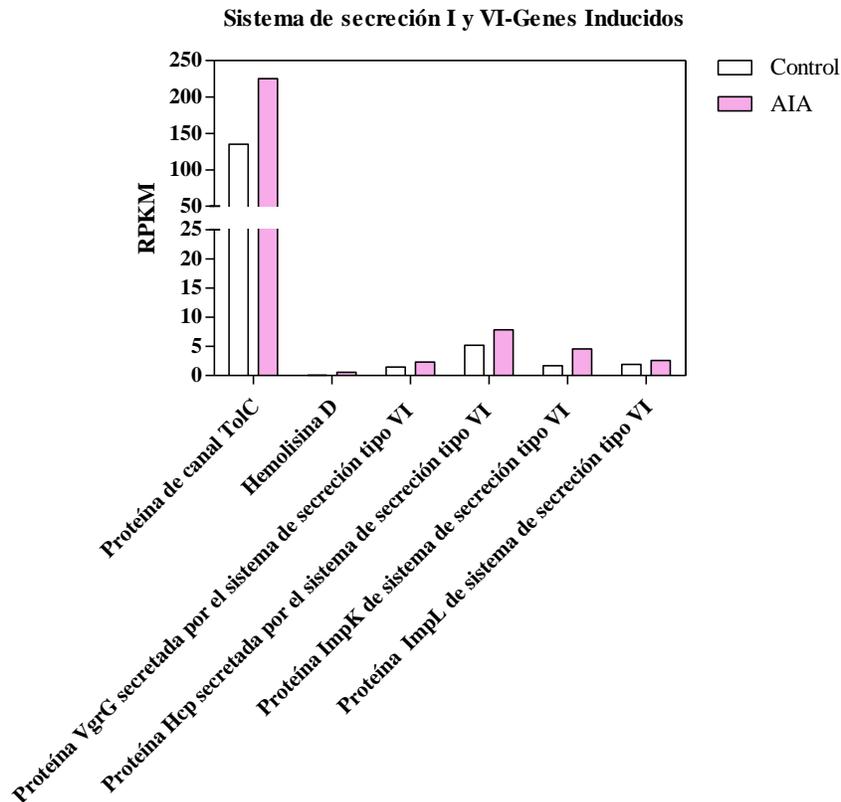


Figura 92. Genes de los sistemas de secreción tipo I y VI sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por E109.

En esta figura se observan los genes del sistema de secreción tipo I y VI. En el caso del T1SS se sobreexpresaron dos genes: RN69_25685 (Proteína de canal TolC) con una expresión del 40% más respecto del control y el gen RN69_27620 (hemolisina D). Si bien la expresión de este último gen es baja, la inducción corresponde a un 80% más del control. De T6SS se observó la expresión de 4 genes que codifican para las proteínas VgrG, Hcp, ImpK e ImpL con una expresión de 36, 33, 63 y 24% respectivamente.

En la siguiente figura se observan los genes reprimidos de los tres sistemas de secreción.

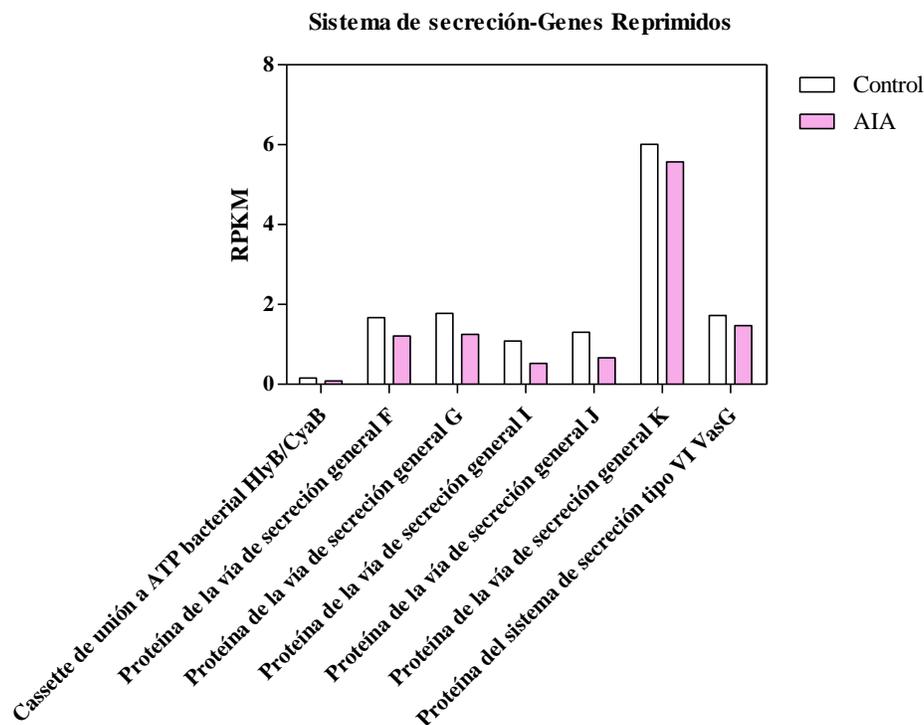


Figura 93. Genes de los sistemas de secreción tipo I, II y VI reprimidos durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

Del T1SS se reprimió el gen RN69_27625 (Cassette de unión a ATP bacterial HlyB/CyaB) con una expresión 47% menos del control. Del T2SS se reprimieron los genes que codifican para las proteínas F, G, I, J y K donde se destaca la expresión del gen RN69_17860 (proteína I) que se reprimió un 51% respecto al control. Finalmente, del T6SS se indujo negativamente el gen RN69_16275 que codifica para la proteína VasG con valor de represión de 15%.

VI.3.3.6 Biosíntesis de AIA

Uno de los mecanismos estudiados en esta tesis, fue la producción de fitohormonas, especialmente referidas a AIA. A continuación se muestran los genes afectados durante el catabolismo de AIA para la biosíntesis de AIA.

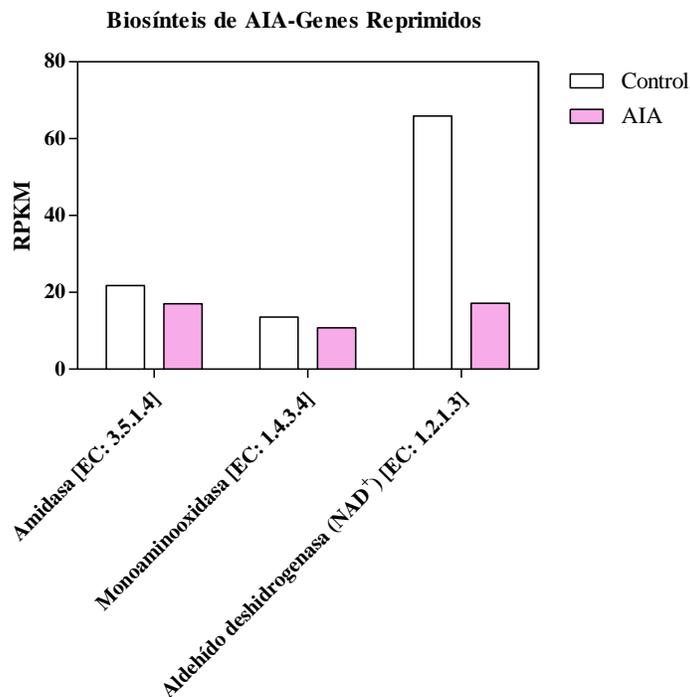


Figura 94. Genes de la biosíntesis de AIA reprimidos durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

En la **Figura 94** observamos que se reprimieron 3 de los 5 genes que tiene E109 para la biosíntesis de AIA; el gen RN69_01010 que codifica para la amidasa [EC: 3.5.1.4], RN69_02490 que codifica para la monoaminoxidasa [EC: 1.4.3.4] y el RN69_29485 que codifica para una aldehído deshidrogenasa (NAD⁺) [EC: 1.2.1.3]. Los valores de inducción negativa fueron 21, 20 y 73% respectivamente.

VI.3.3.7 Genes involucrados en la respuesta bacteriana a estrés

VI.3.3.7.1 Biosíntesis de EPS

A continuación, se muestran los genes sobreexpresados de la biosíntesis de exopolisacáridos.

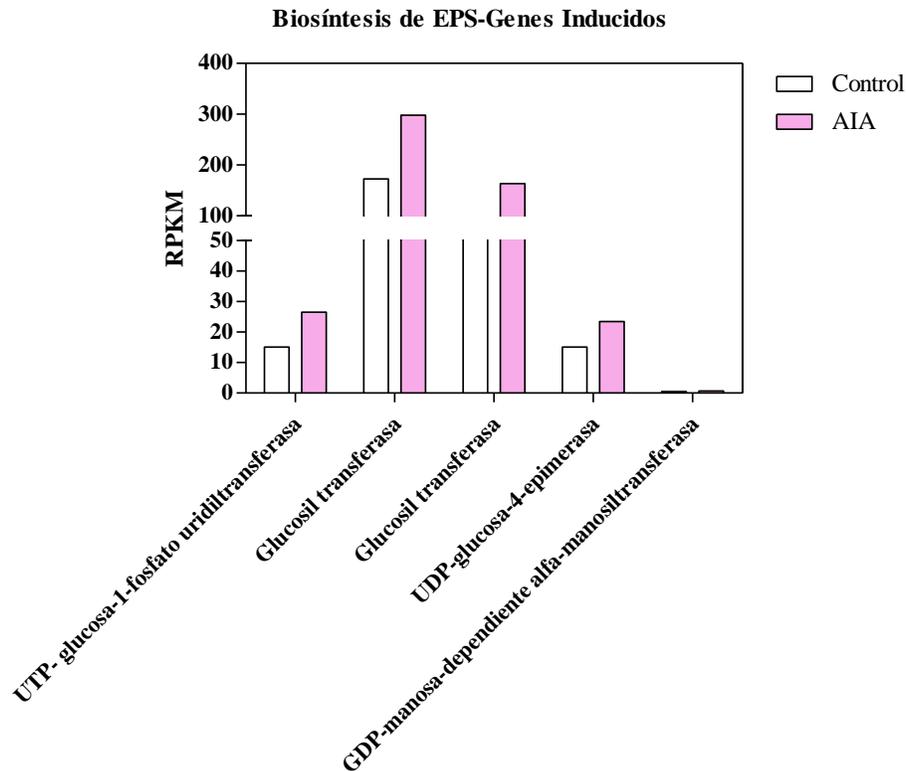


Figura 95. Genes de la biosíntesis de EPS sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

De la biosíntesis de EPS se han inducido diferencialmente cinco genes, estos son: RN69_40315 (UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa), RN69_36275 (glucosil transferasa), RN69_34070 (glucosil transferasa), RN69_08460 (UDP-glucosa-4-epimerasa) y RN69_18470 (GDP-manosa-dependiente alfa-manosiltransferasa) con una expresión de 75, 72, 77, 55 y 53% respectivamente del control sin AIA.

VI.3.3.7.2 Respuesta bacteriana a estrés térmico

En las siguientes figuras se observan los genes inducidos vinculados al estrés por frío y calor.

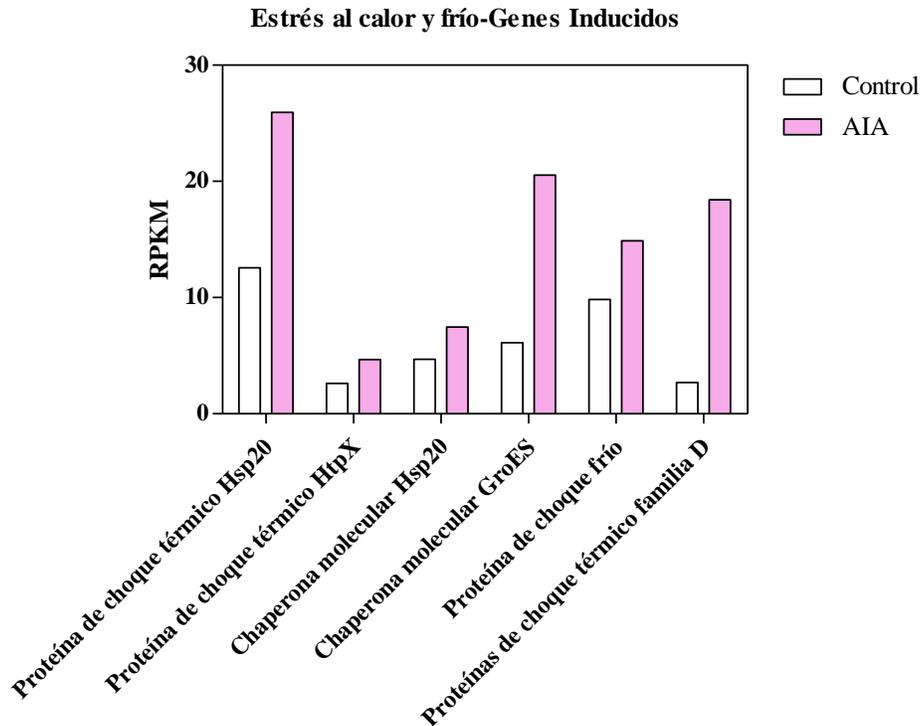


Figura 96. Genes relacionados a la respuesta bacteriana a estrés por calor y frío sobreexpresados durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

En la **Figura 96** se observa la sobreexpresión de seis genes, tres genes que codifican para shock térmico (RN69_03555, RN69_35815 y *groEL*), dos chaperonas moleculares (RN69_09975 y RN69_09960) y un gen que codifica para una proteína de shock frío (RN69_42860). El gen con mayor inducción fue el gen *groEL* que codifica para la proteína de shock térmico de la familia D con un valor porcentual de 85%.

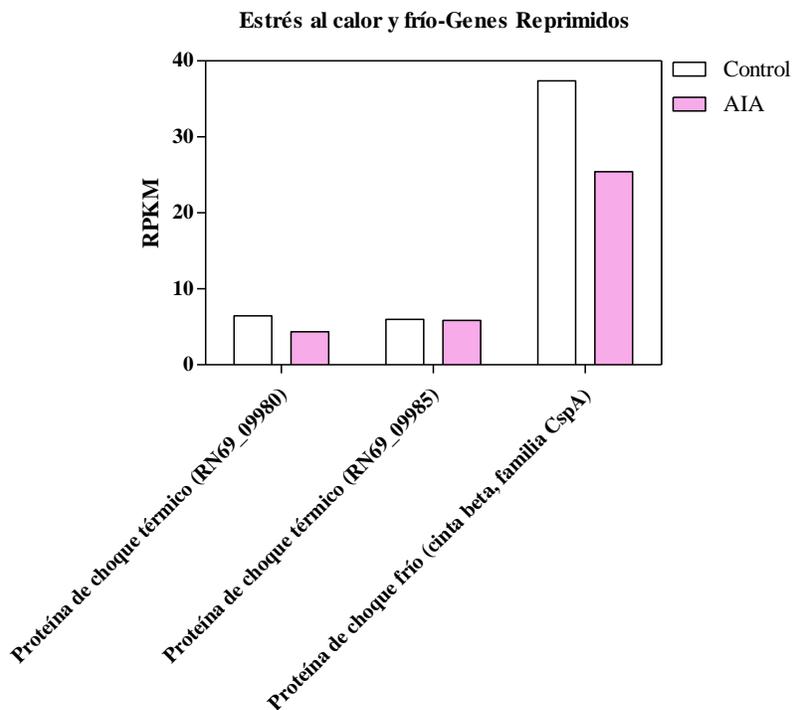


Figura 97. Genes relacionados con la respuesta bacteriana al estrés por calor y frío reprimidos durante el catabolismo de AIA por *B. japonicum* E109.

Se indujeron negativamente tres genes, dos que codifican para proteínas al shock térmico (RN69_09980 y RN69_09985) y una al shock frío (RN69_06955) con una expresión menor 32, 2 y 32% respectivamente a cada gen del control sin la hormona.

VI.3.3.7.3 Estrés oxidativo

Se encontró que la adición de AIA al medio de cultivo indujo no solo la expresión de genes vinculados al estrés como la biosíntesis de EPS, chaperonas, proteínas de shock térmico y frío sino también un gen vinculado al estrés oxidativo. Se sobreexpresó el gen RN69_30095 que codifica para la proteína de resistencia a hidropéroxido orgánico con un valor RPKM de 0.92 expresando un 73% más del tratamiento control.

VI.4 DISCUSIÓN

La secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109 nos permitió estudiar molecularmente los mecanismos PGPR con los que esta rizobacteria promueve el crecimiento de las leguminosas. Además, de la ampliamente estudiada FBN, encontramos que E109 tiene genes que codifican para la síntesis del AIA; sin embargo, observamos que E109 no es capaz de acumular concentraciones cuantificables de este compuesto en medio de cultivo. Este comportamiento, nos llevó a investigar otros procesos del metabolismo de auxinas y hallamos que E109 es capaz de degradar AIA. Esta degradación ocurre rápidamente debido a que la enzima responsable de la degradación es constitutiva y se produce de manera previa a la adición de la hormona en el medio de cultivo. Luego de realizar un análisis *in silico* (bioinformático), así como como de numerosos ensayos *in vitro* e *in vivo* (bioquímicos y moleculares), confirmamos que la enzima responsable de la degradación de AIA en *B. japonicum* E109 es una del tipo 3-fenilpropionato dioxigenasa, codificada por los genes *iacC* y *iacD*.

Uno de los objetivos de esta tesis, fue estudiar el efecto génico global inducido por el catabolismo de AIA en cultivos de E109, mediante el análisis transcriptómico. Este análisis se llevó a cabo con una concentración de 0.5 mM debido a que esa es la concentración máxima que E109 puede degradar en condiciones estándar de cultivo. Existen estudios de RNA-seq con valores de 0.5 mM de AIA en *E. coli* (Bianco et al., 2006a; Bianco et al., 2006b) y en *S. meliloti* (Imperlini et al., 2009); sin embargo ninguna de estas bacterias es capaz de degradar AIA. El estudio de transcriptómica llevado a cabo por Donati et al. (2013) en *B. diazoefficiens* USDA110, la cual puede degradar AIA, fue realizado con una concentración de 1 mM de la hormona adicionado de manera exógena al cultivo.

La adición de 0.5 mM de AIA y la posterior degradación en cultivos por parte de E109, indujo la expresión diferencial de 242 genes de 8621 genes (afectando aproximadamente 2.81% genes del genoma completo), de los cuales 116 genes fueron inducidos (representando 47.93%); mientras que 126 genes se reprimieron (52.07%). Mediante la plataforma KEGG (Kanehisa et al., 2012) pudimos identificar cada uno de los genes inducidos y reprimidos en nuestra cepa de interés, además de agruparlos de acuerdo al clúster metabólico correspondiente. El catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109 afectó la expresión de genes involucrados en transportadores, vías metabólicas, metabolismo microbiano en diversos ambientes, *quorum sensing*, metabolismo de nitrógeno, vías de degradación de compuestos del tipo xenobióticos (aminobenzoato, estireno, ácidos grasos, benzoato, entre otros), metabolismo de aminoácidos (metabolismo de arginina y prolina, metabolismo de fenilalanina, metabolismo de triptófano, metabolismo de glicina, serina y treonina, metabolismo de histidina y metabolismo de alanina, aspartato y glutamato), biosíntesis de

aminoácidos (biosíntesis de valina, leucina e isoleucina y biosíntesis de arginina), degradación de aminoácidos (degradación de valina, leucina e isoleucina y degradación de leucina), traducción, sistema regulatorio por dos componentes, péptido señal, proteínas de membrana, reguladores transcripcionales, vías de biosíntesis (biosíntesis de lipopolisacáridos, biosíntesis de ácidos grasos, y biosíntesis de folato), metabolismo de sulfuro, resistencia a vancomicina, quimiotaxis y otros metabolismos (como metabolismo de carbono, metabolismo de rifloflavina, metabolismo de pirimidina, metabolismo de ácidos grasos, entre otros). Cabe destacar que el 25% aproximadamente del total de los genes inducidos corresponden a proteínas con funciones desconocidas. En E109 la degradación de AIA afectó de manera global el metabolismo de la bacteria.

Para enriquecer los resultados y la discusión de este estudio de transcriptómica durante el catabolismo de AIA en E109, decidimos flexibilizar el análisis para ver como la degradación de AIA afectó a los clústers más importantes del crecimiento bacteriano y los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal. La FBN es el mecanismo ampliamente estudiado, y el ejemplo más estudiado lo constituyen las plantas de la familia de las leguminosas que interactúan con los rizobios (Angelini et al., 2011). Las etapas previas a la simbiosis han sido bien caracterizadas y consisten en la adhesión de los rizobios a la superficie de las raíces, el reconocimiento que ocurre entre la bacteria y la planta simbiótica, la invasión de la raíz, la organogénesis del nódulo y la diferenciación de las bacterias a bacteroides y la fijación de nitrógeno. En relación al metabolismo de nitrógeno se sobreexpresaron y reprimieron genes. Entre los genes sobreexpresados tenemos RN69_33760 (Nrt), RN69_33765 (NrtABCD), ambos transportadores de nitrato/nitrito, RN69_33745 y RN69_33745 (nitrato reductasa) que cataliza la conversión de nitrato a nitrito y RN69_07270 (nitrato monooxigenasa [EC: 1.13.12.16]). Entre los genes reprimidos tenemos RN69_11365 (nitrito reductasa) que convierte nitrito a óxido nítrico y RN69_05355 (glutamina sintetasa [EC: 6.3.1.2]) que codifica para la enzima que cataliza la conversión de amonio en L-glutamina. De los genes de la FBN se vieron inducidos algunos de los genes del operón *fixNOQP* (*fixO* y *fixP*), el gen que codifica para la proteína FixA (RN69_37935), también el gen que codifica para una NifA (RN69_37940) y miembros del operón *fixGHIS* (RN69_33990 que codifica para la proteínas FixH y RN69_33995 que codifica para FixG. Solo se vio reprimido el gen *fixN*. En cuanto a los genes de la simbiosis, como observamos en los resultados, se expresaron tres genes vinculados con la nodulación (RN69_39365) y proteínas de la eficacia y eficiencia en la formación de nódulos (RN69_37810 y RN69_23080). Esto estaría de acuerdo con los experimentos llevados a cabo con cultivos de E109 tratados de manera exógena con AIA previo a su inoculación en semillas de soja, ya que se observó un incremento de todos los parámetros de crecimiento. En el trabajo publicado por Donati et al. (2013) el tratamiento de USDA110 con adición exógena de 1 mM de AIA indujo

la expresión de *nifH* y *nifA*; mientras que reprimió la expresión de genes del operón *fixGHIS* y *fixNOQP* y el pretratamiento de cultivo de la bacteria en las plántulas de soja no indujo los parámetros de crecimiento vegetal, ni la capacidad de nodulación ni la eficiencia.

Otros clústers estudiados fueron los de quimiotaxis y movilidad. El quimiotaxis es un tipo de fenómeno en el cual las bacterias dirigen sus movimientos de acuerdo con la concentración de ciertas sustancias químicas en su medio ambiente. Además, permite que las bacterias encuentren alimento, nadando hacia la mayor concentración de moléculas alimentarias. En E109, el análisis transcriptómico, reveló la inducción de cuatro genes vinculados a la quimiotaxis responsables de la síntesis de las proteínas MCP, CheW, CheA y CheY y once genes vinculados a la movilidad, FliC, FlgL, FlgK, FlgH, FlgC, FliF, FliM, FliN/FliY, FlhB, FliP y FliR. Un solo gen relacionado con la quimiotaxis se vio reprimido, RN69_36335, que codifica para una proteína CheB. Estos resultados indican que ante la adición de AIA al medio de cultivo, la bacteria expresa genes vinculados con la quimiotaxis y a la movilidad. En otros trabajos, USDA110 y *A. brasilense* Sp245 (van Puyvelde et al., 2011; Donati et al., 2013) disminuyeron la expresión de los genes de flagelos y quimiotaxis frente a la exposición a AIA.

Otro resultado obtenido, fue la expresión de genes de los sistemas de secreción I, II y VI. Se indujeron 14 genes para el T2SS (proteína D, F, G, H, I, J, K, L, M y E, pre-proteína SecE, SecA SecG, SecB y SecY, YajC, proteína de membrana de la familia YidC/Oxa1, receptor de partículas de reconocimiento de señal fusionada y subunidad SRP54), dos genes para el T1SS (Proteína de canal TolC y hemolisina D) y cuatro genes para el T6SS (proteínas VgrG, Hcp, ImpK e ImpL). Van Puyvelde et al. (2011) propusieron un modelo en el que la biosíntesis de AIA estaría regulando la expresión del T6SS en *Azospirillum* sp. Con este modelo, ellos sugieren que la presencia de AIA permite un medio de comunicación importante en la interacción con las plantas durante la colonización. En E109 la presencia de AIA en el medio, indujo la expresión de genes de los sistemas de secreción I, II y VI.

Minamisawa y Fukai (1991) observaron que en algunas cepas de *B. japonicum* no se acumulaba AIA en el medio de cultivo e hipotetizaron de que no tenían la capacidad para sintetizar la fitohormona o que lo hacían y la degradaban de manera simultánea. En E109 observamos que cuando se adiciona AIA al medio de cultivo, los genes vinculados a la biosíntesis de AIA (EC: 3.5.1.4, EC: 1.4.1.4 y EC: 1.2.1.3), se reprimieron. Esto indicaría que mientras E109 esta catabolizando la hormona, los genes de síntesis de AIA se reprimen para no inducir la biosíntesis de este compuesto. La exposición de 1 mM de AIA, luego de 3 horas, indujo en USDA110 una respuesta de estrés generalizada, donde: proteínas de shock térmico, shock frío, shock osmótico, biosíntesis de EPS y chaperonas moleculares fueron inducidas. Estas proteínas están asociadas al

mantenimiento de la integridad proteica (Donati et al., 2013). La exposición de 0.5 mM de AIA en *E. coli* K-12, también indujo una expresión de genes relacionados al estrés (Bianco et al., 2006a). En E109, observamos la inducción de genes asociados a la respuesta de estrés generalizada; cinco genes vinculados a la biosíntesis de EPS (UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa, glucosil transferasa, UDP-glucosa-4-epimerasa y GDP-manosa-dependiente alfa-manosiltransferasa), tres genes que codifican para shock térmico, dos chaperonas moleculares, un gen que codifica para una proteína de shock frío y un gen que codifica para el estrés oxidativo. Estos resultados permiten conjeturar sobre una posible ventaja de E109 a condiciones de estrés (calor, frío, salinidad) cuando el cultivo se trata con AIA exógeno. Donati et al. (2013) proponen que la exposición a AIA en USDA110, mejoraría su capacidad para sobrevivir y responder a las perturbaciones en el medio ambiente. Imperlini et al. (2009) demostró que el tratamiento con AIA incrementa la supervivencia a largo plazo en *S. meliloti*.

VI.5 CONCLUSIONES

A partir del análisis transcriptómico relacionado con el catabolismo de AIA en *B. japonicum* E109, podemos concluir que:

- Indujo cambios en la expresión génica, la actividad enzimática y el nivel de metabolitos implicados en las vías metabólicas centrales. Las vías metabólicas expresadas diferencialmente fueron los transportadores, vías metabólicas, actividad de diferentes enzimas y reguladores transcripcionales.
- Indujo cambios positivos y negativos en la expresión de genes vinculados al metabolismo, fijación de nitrógeno como así también de genes de la simbiosis.
- Se sobreexpresaron genes de la quimiotaxis y movilidad.
- Se sobreexpresaron y reprimieron genes vinculados a los sistemas de secreción I, II y VI
- Se reprimieron genes de la biosíntesis de AIA.
- Se indujeron genes de respuesta a calor, frío y estrés oxidativo, chaperonas y síntesis de EPS.

Estos resultados permiten conjeturar que el pretratamiento con AIA exógeno y/o su posterior degradación en condiciones de cultivo proporcionarían algún tipo de ventaja para *B. japonicum* E109 a nivel de su estilo de vida rizosférica, como en interacción con su simbionte natural *Glycine max* L.

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

CAPÍTULO VII: Discusión y Conclusiones Generales

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

VII.1 DISCUSIÓN GENERAL

El cultivo de soja se introdujo en nuestro país en los años 70 y se ha convertido en el principal cultivo del agro argentino debido al precio y la demanda internacional. La expansión del cultivo de soja se extiende más allá de la región pampeana, involucrando provincias del noroeste. Uno de los problemas principales de esta leguminosa, es el desgaste de nitrógeno en los suelos. A partir del desequilibrio ecológico que produce, nació el uso de inoculantes formulados en base a microorganismos capaces de fijar nitrógeno. En la década del 80, INTA-IMYZA recomendó a la cepa E109 para la formulación de inoculantes para cultivos de soja en nuestro país debido a su capacidad simbiótica. De los 18 millones de hectáreas sembradas en el país, el 85% se inocula con E109 (Piccinetti et al. 2013). De los últimos 20 años de uso de esta cepa para la formulación de inoculantes, existen numerosos estudios agronómicos que confirman la capacidad de E109 para mejorar el cultivo de soja. Sin embargo, carecíamos de estudios moleculares que confirmaran esta capacidad de la PGPR. En 2012, nuestro laboratorio en sociedad con laboratorios e instituciones nacionales e internacionales, secuenció el genoma de *B. japonicum* E109.

El primer objetivo de esta tesis doctoral, fue el análisis genómico y funcional de E109. Luego del cierre del genoma, reveló que *B. japonicum* E109 posee un genoma circular de 9.224.208 pb y sin plásmidos (Torres et al., 2015). Se comparó con genomas de la misma especie, y como resultado se obtuvo que USDA6 es la cepa más parecida a E109. El genoma completo consta de 8.233 secuencias que codifican proteínas y contiene dos operones ribosómicos idénticos y completos. Luego de la secuenciación del genoma, llevamos a cabo el análisis del genoma mediante las herramientas bioinformáticas NCBI, RAST (Aziz et al., 2008) y KEGG (Kanehisa et al., 2012). Este análisis nos permitió confirmar que el genoma de E109 contiene genes relacionados a la fijación biológica de nitrógeno, mecanismos de promoción más conocido para la simbiosis rizobacteria-leguminosa, como así también genes involucrados en el sistema de secreción tipo II y IV, vida rizosférica y biosíntesis de fitohormonas, como el AIA.

Sabemos que E109 promueve la FBN a través de la formación de nódulos con su simbionte la soja. El análisis genómico confirmó que E109 es capaz de realizar este proceso a través de las enzimas nitrogenasas cadena β (Mo-Fe), sin embargo la desnitrificación (nitrito a óxido nítrico) es incompleta. El proceso de FBN solo puede ser llevado a cabo por procesos como la quimiotaxis y la movilidad. El análisis genómico demostró que E109 contiene 62 secuencias codificantes para la quimiotaxis y 142 secuencias codificantes de movilidad flagelar. En cuanto a los sistemas de secreción, el análisis de genes puso en evidencia que existen genes para todos los sistemas de secreción descriptos, sin embargo en E109 solo serían funcional el sistema de secreción tipo VI. Otro mecanismo de promoción de crecimiento, es la biosíntesis de fitohormonas. En E109 se

confirmó la presencia de genes involucrados en la síntesis de poliaminas como la putrescina a través de las enzimas agmatinasa y ornitina descarboxilasa. De las seis vías de síntesis para la fitohormona AIA, en E109 se confirmó la presencia de genes involucrados en las vías IAM, IAN e IPyA aunque la síntesis sería llevada a cabo por la vía IAM porque carece de las secuencias que codifican para las enzimas claves de las vías IPyA e IAN. A pesar de este resultado obtenido, no pudimos cuantificar AIA en los medios de cultivos de E109 bajo ninguna condición controlada en el laboratorio. Existe bibliografía que describe la síntesis de AIA para este género (Minamisawa y Fukai, 1991), pero también se describe una actividad catabólica del compuesto en algunas cepas de *Bradyrhizobium*. Entonces, una hipótesis sería que en los cultivos de E109 no se puede detectar AIA porque existe una fuerte actividad de degradación para el compuesto.

A partir de este último resultado, comenzamos a estudiar el metabolismo completo de AIA para E109. Evaluamos la hidrólisis de conjugados de AIA con aminoácidos (fenilalanina, leucina y alanina) y observamos la hidrólisis de AIA-amidas con la posterior degradación del AIA liberado. Esta actividad se llevó a cabo en todas las etapas de la curva de crecimiento, pero la degradación de AIA fue más rápida en la fase exponencial tardía. Esta actividad indujo cambios fisiológicos en la bacteria, incrementando la biomasa y la producción de EPS. Otro análisis llevado a cabo fue la conjugación de AIA con amidas, sin embargo E109 no fue capaz de conjugarse con ambos compuestos adicionados pero degradó rápidamente el AIA agregado e indujo cambios en la biomasa, producción de EPS y recuento de células.

Confirmamos el catabolismo de AIA en cultivos puros y sobrenadantes obtenidos de cultivos puros de E109. La cepa E109 no solo es capaz de catabolizar auxinas naturales, como el AIA, sino también sintéticas como IBA y ANA, aunque con mayor preferencia y velocidad de degradación de AIA. El catabolismo de AIA indujo cambios fisiológicos en los cultivos, incrementando la biomasa y la producción de EPS. Debido a que el catabolismo de esta hormona ocurre muy rápido, deducimos que esta actividad es pre-existente a la presencia de AIA en el medio y es de carácter enzimático porque no se registró actividad catabólica en sobrenadantes desnaturalizados. El catabolismo de AIA ocurre en todas las fases de crecimiento, con preferencia en la fase exponencial tardía, tiene una cinética de saturación (puede degradar como máximo 0.5 mM de AIA) y un cultivo pre-tratado con AIA incrementa los parámetros de crecimiento en un cultivo de soja. Este comportamiento de catabolismo de AIA se ha descrito para otras cepas como *B. diazoefficiens* USDA110 (Minamisawa y Fukai, 1991).

Debido a que la actividad de degradación de AIA ocurría en un tiempo considerablemente rápido y que en sobrenadantes desnaturalizados se perdía la actividad catabólica, deducimos que era llevada a cabo por una enzima que ya se encontraba en el medio de E109. Con la disposición del genoma,

iniciamos la búsqueda de posibles genes candidatos a llevar a cabo esta actividad. En primera instancia, evaluamos a las peroxidasas debido a que controlan el nivel de auxinas en plantas (Savitsky et al., 1999; Mathesius, 2001). Encontramos en el genoma una peroxidasa candidata, y luego de crear una mutante deficiente en la enzima peroxidasa (E109 Δ *per12*) concluimos que esta enzima no está involucrada en el catabolismo de AIA para E109 porque no fue capaz de detener la actividad de degradación.

Este resultado nos inclinó a realizar una búsqueda en otros modelos biológicos previamente estudiados y así comenzamos a analizar el clúster *iac* de *P. putida* 1290, que consta de 10 genes responsables de la asimilación de AIA (Leveau y Gerards, 2008). La primera enzima en atacar el anillo indol de la molécula de AIA, es la acil-CoA deshidrogenasa codificada por el gen *iacA*. El gen similar para USDA110 es el gen *ngrC* y la mutante deficiente para dicho gen se denomina 8620; al evaluar el catabolismo de AIA, observamos que la degradación continuaba, es decir el gen *iacA*, tampoco era responsable del catabolismo de AIA. Otro gen que encontramos candidato, fue el gen *iacC*. Este gen se reportó responsable de la degradación de AIA en *B. phytofirmans* (Zúñiga et al., 2013). En los cultivos de E109 inducidos con AIA, se detectó la presencia de la enzima 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa, la cual es codificada por el gen *iacC*. La mutación en el gen *iacC* en E109 demostró que no es capaz de catabolizar AIA más allá de 96 horas de cultivo. Confirmamos que la enzima 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad es la responsable de la degradación de AIA.

En la búsqueda de genes candidatos del catabolismo de AIA, encontramos que el gen *iacA* se reportó responsable de la degradación de indol (Lin et al., 2012). Debido a que este gen se encuentra en el genoma de E109, evaluamos la degradación de indol. Llevamos a cabo experimentos similares al catabolismo de AIA y nos encontramos que; E109 es capaz de degradar indol y lo hace rápidamente, que la actividad también se encuentra en el sobrenadante y que tiene una cinética de saturación (análogo a la degradación de AIA). Con estos resultados, hipotetizamos en una vía común entre la degradación de AIA e indol por E109, sin embargo los resultados obtenidos a partir de la evaluación del catabolismo de indol en las mutantes *iacA* e *iacC* revelaron que ninguno de las dos enzimas están involucradas en la degradación de indol. Esto abre una puerta a la investigación del rol del catabolismo de indol en E109 y en la interacción con la planta.

El análisis transcriptómico del catabolismo de 0.5 mM de AIA en cultivos de E109 indujo una expresión génica global. La expresión diferencial de genes afectó las categorías de transportadores, vías metabólicas, proteínas hipotéticas, enzimas, reguladores transcripcionales, vías de biosíntesis, vías de degradación, *quorum sensing*, traducción, transcripción, proteínas de membrana, etc. La expresión diferencial afectó 2.81% de los genes del genoma completo, de los cuales el 47.93%

fueron inducidos y el 52.07% se reprimieron. La flexibilización del análisis nos permitió ver como el catabolismo indujo o reprimió los clústers más importantes del crecimiento bacteriano y los mecanismos de promoción del crecimiento vegetal.

Uno de los mecanismos PGPR más importantes es la FBN, y observamos que hubo sobreexpresión como represión de algunos de los genes de este metabolismo. Se sobreexpresaron las proteínas Nrt, NrtABCD, nitrato reductasa y nitronato monooxigenasa [EC: 1.13.12.16] y se reprimieron las enzimas nitrito reductasa y glutamina sintetasa [EC: 6.3.1.2]. De la FBN propiamente dicha se expresaron positivamente las proteínas FixA, NifA, FixH y FixG mientras que solo se reprimió el gen que codifica para FixN. Además, se indujeron tres genes vinculados a la nodulación. Nuestros ensayos en semillas de soja con cultivos de E109 más la adición de 0.1 mM de AIA produjo un incremento en todos los parámetros de crecimiento, con lo cual estaría de acuerdo a los genes expresados en la transcriptómica. Con respecto a la quimiotaxis y movilidad, se sobreexpresaron cuatro y once genes, respectivamente, y solo se vio reprimida la proteína CheB. Esto estaría indicando que la bacteria está dirigiendo sus movimientos frente al cambio ambiental en el medio circundante. El análisis de genes de los sistemas de secreción, evidenció la expresión positiva de los sistemas de secreción I, II y VI: dos para T1SS, catorce genes para T2SS y cuatro genes para T6SS. Un metabolismo de especial interés, era la biosíntesis de AIA. Quisimos evaluar como la adición exógena de AIA con la posterior degradación afectaba este metabolismo. Encontramos que las enzimas amidasa, monoaminoxidasa [EC: 1.4.3.4] y aldehído deshidrogenasa (NAD⁺) [EC: 1.2.1.3] fueron reprimidas, indicando que mientras se está catabolizando la hormona adicionada se reprimen los genes de síntesis. Algunos de los estudios de referencia, como por ejemplo el catabolismo de AIA en USDA110 (Donati et al., 2013), indicaban que cuando a un cultivo se le adiciona AIA al medio se induce una respuesta generalizada al estrés. En E109, encontramos que hubo una expresión diferencial con genes asociados a la biosíntesis de EPS, chaperonas, shock térmico, shock frío y estrés oxidativo. Esto podría indicar una ventaja ecológica cuando al cultivo de E109 se adiciona AIA al medio.

VII.2 CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones más importante de esta Tesis doctoral, que lleva como título: “**Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina**” se resumen a continuación:

1. El genoma de *B. japonicum* E109 consiste de un solo replicón de 9.2 Mpb
2. Los mecanismos de promoción de crecimiento predominantes en E109 serían la fijación biológica de nitrógeno y la biosíntesis de fitohormonas
3. *B. japonicum* E109 contiene genes la biosíntesis de AIA, y esa síntesis sería por la vía del indol acetamida; sin embargo, no hemos podido cuantificar el compuesto en los cultivos de la bacteria.
4. E109 tiene la capacidad de hidrolizar AIA-amidas, con la posterior degradación de AIA y lo realiza en todas las fases de crecimiento de la bacteria
5. E109 no puede conjugar AIA con amidas
6. E109 tiene la capacidad de catabolizar AIA:
 - i. El catabolismo es preexistente a la presencia de AIA en el cultivo
 - ii. Es de carácter enzimático y es llevado a cabo por la enzima IacC o 3-fenilpropionato dioxigenasa subunidad alfa
 - iii. Degrada AIA en todas las fases de crecimiento, con mayor velocidad en la fase exponencial tardía
 - iv. Puede catabolizar auxinas naturales y sintéticas
 - v. El catabolismo induce cambios fisiológicos en la bacterias
 - vi. El cultivo de E109, pre-inducido con AIA, incrementa los parámetros de crecimiento de la soja
 - vii. Puede catabolizar hasta 0.5 mM de AIA
7. E109 tiene la capacidad de degradar indol, la actividad de degradación es constitutiva y tiene cinética de saturación
8. El análisis transcriptómico del catabolismo de AIA:
 - i. Indujo cambios en la expresión génica global
 - ii. Se sobreexpresaron y reprimieron genes del metabolismo del nitrógeno (fijación de nitrógeno y simbiosis) y de los sistemas de secreción I, II y IV
 - iii. Se sobreexpresaron genes de quimiotaxis y movilidad
 - iv. Se reprimieron genes de la biosíntesis de AIA

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

- v. Se indujo la expresión generalizada a estrés (calor, frío, oxidativo, chaperonas y biosíntesis de EPS).

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.D., Dubnick, M., Kerlavage, A.R., Moreno, R., Kelley, J.M., Utterback, T.R., Nagle, J.W., Fields, C., Venter, J.C., 1992. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature* 355, 632–634. doi:10.1038/355632a0
- Adiconis, X., Borges-Rivera, D., Satija, R., Deluca, D.S., Busby, M.A., Berlin, A.M., Sivachenko, A., Thompson, D.A., Wysoker, A., Fennell, T., Gnirke, A., Pochet, N., Regev, A., Levin, J.Z., 2013. Comparative analysis of RNA sequencing methods for degraded or low-input samples. *Nat. Methods* 10, 623–629. doi:10.1038/nmeth.2483
- Ahnia, H., Bourebaba, Y., Durán, D., Boulila, F., Palacios, J.M., Rey, L., Ruiz-Argüeso, T., Boulila, A., Imperial, J., 2018. *Bradyrhizobium algeriense* sp. nov., a novel species isolated from effective nodules of *Retama sphaerocarpa* from Northeastern Algeria. *Syst. Appl. Microbiol.* doi:10.1016/j.syapm.2018.03.004
- Albanesi A., Benintende S., Cassán F., Peticari A., 2013. Manual de procedimientos microbiológicos para la evaluación de inoculantes. Publicación de la Red Nacional de Control de Inoculantes de la División Agrícola y Ambiental de la Asociación Argentina de Microbiología. ISBN: 978-987-26716-4-8. Buenos Aires. Argentina.
- Alemayehu, D., Gordon, L.M., O'Mahony, M.M., O'Leary, N.D., Dobson, A.D.W., 2004. Cloning and functional analysis by gene disruption of a novel gene involved in indigo production and fluoranthene metabolism in *Pseudomonas alcaligenes* PA-10. *FEMS Microbiol. Lett.* 239, 285–93. doi:10.1016/j.femsle.2004.08.046
- Allen, C.C.R., Boyd, D.R., Larkin, M.J., Reid, K.A., Sharma, N.D., Wilson, K., 1997. Metabolism of naphthalene, 1-naphthol, indene, and indole by *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 151–155.
- Angelini, J., Ibáñez, F., Taurian, T., Tonelli, M.L., Valetti, L., Fabra, A., 2011. A study on the prevalence of bacteria that occupy nodules within single peanut plants. *Curr. Microbiol.* 62, 1752–1759. doi:10.1007/s00284-011-9924-2
- Angiuoli, S. V., Gussman, A., Klimke, W., Cochrane, G., Field, D., Garrity, G.M., Kodira, C.D., Kyrpides, N., Madupu, R., Markowitz, V., Tatusova, T., Thomson, N., White, O., 2008. Toward an Online Repository of Standard Operating Procedures (SOPs) for (Meta) genomic Annotation. *OMICS* 12, 137–141. doi:10.1089/omi.2008.0017
- Ansonge, W.J., 2009. Next-generation DNA sequencing techniques. *N. Biotechnol.* doi:10.1016/j.nbt.2008.12.009

- Apweiler R., Martin M. J., O'Donovan C., Magrane M., Alam-Faruque Y., Alpi E., Antunes R., Arganiska J., Casanova E. B. Bely B. 2013. Update on activities at the Universal Protein Resource (UniProt) in 2013. *Nucleic Acids Res.*, 41, D43–D47.
- Araújo, J., Flores-Félix, J.D., Igual, J.M., Peix, A., González-Andrés, F., Díaz-Alcántara, C.A., Velázquez, E., 2017. *Bradyrhizobium cajani* sp. Nov. isolated from nodules of *Cajanus cajan*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2236–2241. doi:10.1099/ijsem.0.001932
- Arora P. K., Bae, 2014. Identification of new metabolites of bacterial transformation of indole by gas chromatography-mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Int J Anal Chem* 2014, 1–6.
- Aziz, A., Martin-Tanguy, J., Larher, F., 1997. Plasticity of polyamine metabolism associated with high osmotic stress in rape leaf discs and with ethylene treatment. *Plant Growth Regul.* 21, 153–163. doi:10.1023/A:1005730509433
- 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
- Bansal, T., Alaniz, R.C., Wood, T.K., Jayaraman, A., 2009. The bacterial signal indole increases epithelial-cell tight-junction resistance and attenuates indicators of inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 228–233. doi:10.1073/pnas.0906112107
- Bandurski, R. S., 1980. Homeostatic control of concentrations of indole-3-acetic acid. In *Plant growth substances 1979* (pp. 37-49). Springer Berlin Heidelberg.
- Bandurski, R. S., Cohen, J. D., Slovin, J. P., Reinecke, D. M., 1995. Auxin biosynthesis and metabolism. In *Plant hormones* (pp. 39-65). Springer, Dordrecht.
- Bashan, Y., Holguin, 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.* doi:10.1016/S0038-0717(97)00187-9
- 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
- Bentley, D.R., Balasubramanian, S., Swerdlow, H.P., Smith, G.P., Milton, J., Brown, C.G., Hall, K.P., Evers, D.J., Barnes, C.L., Bignell, H.R., Boutell, J.M., Bryant, J., Carter, R.J., Keira Cheatham, R., Cox, A.J., Ellis, D.J., Flatbush, M.R., Gormley, N.A., Humphray, S.J., Irving, L.J., Karbelashvili, M.S., Kirk, S.M., Li, H., Liu, X., Maisinger, K.S., Murray, L.J.,

- Obradovic, B., Ost, T., Parkinson, M.L., Pratt, M.R., Rasolonjatovo, I.M.J., Reed, M.T., Rigatti, R., Rodighiero, C., Ross, M.T., Sabot, A., Sankar, S. V., Scally, A., Schroth, G.P., Smith, M.E., Smith, V.P., Spiridou, A., Torrance, P.E., Tzonev, S.S., Vermaas, E.H., Walter, K., Wu, X., Zhang, L., Alam, M.D., Anastasi, C., Aniebo, I.C., Bailey, D.M.D., Bancarz, I.R., Banerjee, S., Barbour, S.G., Baybayan, P.A., Benoit, V.A., Benson, K.F., Bevis, C., Black, P.J., Boodhun, A., Brennan, J.S., Bridgham, J.A., Brown, R.C., Brown, A.A., Buermann, D.H., Bundu, A.A., Burrows, J.C., Carter, N.P., Castillo, N., Catenazzi, M.C.E., Chang, S., Neil Cooley, R., Crake, N.R., Dada, O.O., Diakoumakos, K.D., Dominguez-Fernandez, B., Earnshaw, D.J., Egbujor, U.C., Elmore, D.W., Etchin, S.S., Ewan, M.R., Fedurco, M., Fraser, L.J., Fuentes Fajardo, K. V., Scott Furey, W., George, D., Gietzen, K.J., Goddard, C.P., Golda, G.S., Granieri, P.A., Green, D.E., Gustafson, D.L., Hansen, N.F., Harnish, K., Haudenschild, C.D., Heyer, N.I., Hims, M.M., Ho, J.T., Horgan, A.M., Hoschler, K., Hurwitz, S., Ivanov, D. V., Johnson, M.Q., James, T., Huw Jones, T.A., Kang, G.D., Kerelska, T.H., Kersey, A.D., Khrebtukova, I., Kindwall, A.P., Kingsbury, Z., Kokko-Gonzales, P.I., Kumar, A., Laurent, M.A., Lawley, C.T., Lee, S.E., Lee, X., Liao, A.K., Loch, J.A., Lok, M., Luo, S., Mammen, R.M., Martin, J.W., McCauley, P.G., McNitt, P., Mehta, P., Moon, K.W., Mullens, J.W., Newington, T., Ning, Z., Ling Ng, B., Novo, S.M., O'Neill, M.J., Osborne, M.A., Osnowski, A., Ostadan, O., Paraschos, L.L., Pickering, L., Pike, A.C., Pike, A.C., Chris Pinkard, D., Pliskin, D.P., Podhasky, J., Quijano, V.J., Raczy, C., Rae, V.H., Rawlings, S.R., Chiva Rodriguez, A., Roe, P.M., Rogers, J., Rogert Bacigalupo, M.C., Romanov, N., Romieu, A., Roth, R.K., Rourke, N.J., Ruediger, S.T., Rusman, E., Sanches-Kuiper, R.M., Schenker, M.R., Seoane, J.M., Shaw, R.J., Shiver, M.K., Short, S.W., Sizto, N.L., Sluis, J.P., Smith, M.A., Ernest Sohna Sohna, J., Spence, E.J., Stevens, K., Sutton, N., Szajkowski, L., Tregidgo, C.L., Turcatti, G., Vandevondele, S., Verhovskiy, Y., Virk, S.M., Wakelin, S., Walcott, G.C., Wang, J., Worsley, G.J., Yan, J., Yau, L., Zuerlein, M., Rogers, J., Mullikin, J.C., Hurles, M.E., McCooke, N.J., West, J.S., Oaks, F.L., Lundberg, P.L., Klenerman, D., Durbin, R., Smith, A.J., 2008. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. *Nature* 456, 53–59. doi:10.1038/nature07517
- Bergmaier, D., Lacroix, C., Guadalupe Macedo, M., Champagne, C.P., 2001. New method for exopolysaccharide determination in culture broth using stirred ultrafiltration cells. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 57, 401–406. doi:10.1007/s002530100764
- 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.
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Amoresano, A., Carpentieri, A., Pucci, P.,

- Defez, R., 2006a. Indole-3-acetic acid improves *Escherichia coli*'s defences to stress. Arch. Microbiol. 185, 373–382. doi:10.1007/s00203-006-0103-y
- Bianco, C., Imperlini, E., Calogero, R., Senatore, B., Pucci, P., Defez, R., 2006b. Indole-3-acetic acid regulates the central metabolic pathways in *Escherichia coli*. Microbiology 152, 2421–2431. doi:10.1099/mic.0.28765-0
- Biswas, J.C., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., Yanni, Y.G., Rolfe, B.G., 2000. Rhizobial inoculation influences seedling vigor and yield of rice, in: Agronomy Journal. pp. 880–886. doi:10.2134/agronj2000.925880x
- Boiero L., Masciarelli O., Peticari A., Cassán F., Luna V., 2005. Caracterización de la capacidad promotora y biocontroladora de *Bradyrhizobium japonicum* E109, la cepa más usada en la formulación de inoculantes para soja en argentina. Biología de Suelos. 2005- CD ROM-PGPR; ISBN 950-721-237-1
- Boiero, L., Perrig, D., Masciarelli, O., Penna, C., Cassán, F., Luna, V., 2007. Phytohormone production by three strains of *Bradyrhizobium japonicum* and possible physiological and technological implications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 74, 874–880. doi:10.1007/s00253-006-0731-9
- Bottini, R., Fulchieri, M., Pearce, D., Pharis, R.P., 1989. Identification of Gibberellins A(1), A(3), and Iso-A(3) in Cultures of *Azospirillum lipoferum*. Plant Physiol. 90, 45–47. doi:10.1104/pp.90.1.45
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Burg, S.P., Burg, E.A., 1966. The interaction between auxin and ethylene and its role in plant growth. Proc. Natl. Acad. Sci. 55, 262–269. doi:10.1073/pnas.55.2.262
- Burton, J. Martinez, C., Curley, R., 1972. Methods of testing and suggested standards for legume inoculants and pre- inoculated seed, Nitragin Corporation, U.S.A
- Caetano-Anollés, G., Lagares, A., Favelukes, G., 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: Dependence on divalent cations and pH. Plant Soil 117, 67–74. doi:10.1007/BF02206258
- Canese, K., Jentsch, J., Myers, C., 2002. 2. PubMed: The Bibliographic Database. in The NCBI Handbook. NCBI Handb. 0.
- Carlson, R.W., Sanjuan, J., Bhat, U.R., Glushka, J., Spaink, H.P., Wijfjes, A.H.M., Van Brussel, A.A.N., Stokkermans, T.J.W., Peters, N.K., Stacey, G., 1993. The structures and biological activities of the lipo-oligosaccharide nodulation signals produced by type I and II strains of

Bradyrhizobium japonicum. J. Biol. Chem. 268, 18372–18381.

- Cassán F., Paz R., Maiale S., Masciarelli O., Vidal A., Luna V., Ruíz O., 2005. Producción de cadaverina por *Azospirillum brasilense* Az39. Un nuevo mecanismo de promoción del crecimiento vegetal. En la XV Reunión de la Sociedad de Biología de Córdoba. Agosto 2005. Córdoba. Argentina.
- Cassán, F., Perrig, D., Sgroy, V., Masciarelli, O., Penna, C., Luna, V., 2009. *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). Eur. J. Soil Biol. 45, 28–35. doi:10.1016/j.ejsobi.2008.08.005
- Cassán, F., Spaepen, S., Pierantonelli, B., Molina, R., Vanderleyden, J., 2011. Hydrolysis and catabolism of Indole-3-acetic-amino acids (IAA-aa) and other related auxins by *Bradyrhizobium japonicum*. XXV Reunión Latinoamericana de Rizobiología (XXV RELAR) y I Congreso Nacional de Microorganismos Promotores del Crecimiento Vegetal (I MIPCV).
- Chabot, R., Antoun, H., Cescas, M.P., 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli*. Plant Soil. doi:10.1007/BF00010460
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J., 2011. *Bradyrhizobium cytisi* sp. nov., isolated from effective nodules of *Cytisus villosus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 2922–2927. doi:10.1099/ijs.0.027649-0
- Chahboune, R., Carro, L., Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Barrijal, S., Velázquez, E., Bedmar, E.J., 2012. *Bradyrhizobium rifense* sp. nov. isolated from effective nodules of *Cytisus villosus* grown in the Moroccan Rif. Syst. Appl. Microbiol. 35, 302–305. doi:10.1016/j.syapm.2012.06.001
- Chang, W.-S., Franck, W.L., Cytryn, E., Jeong, S., Joshi, T., Emerich, D.W., Sadowsky, M.J., Xu, D., Stacey, G., 2007. An oligonucleotide microarray resource for transcriptional profiling of *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant. Microbe. Interact. 20, 1298–1307. doi:10.1094/MPMI-20-10-1298
- Chang, W., Halverson, L.J., 2003. Reduced water availability influences the dynamics, development, and ultrastructural properties of *Pseudomonas putida* biofilms. J. Bacteriol. 185, 6199–204. doi:10.1128/JB.185.20.6199
- Chang, W.S., Van De Mortel, M., Nielsen, L., De Guzman, G.N., Li, X., Halverson, L.J., 2007. Alginate production by *Pseudomonas putida* creates a hydrated microenvironment and contributes to biofilm architecture and stress tolerance under water-limiting conditions, in: Journal of Bacteriology. pp. 8290–8299. doi:10.1128/JB.00727-07
- Chang, Y.L., Yu Wang, J., Tao Wang, E., Can Liu, H., Sui, X.H., Chen, W.X., 2011.

- Bradyrhizobium lablabi* sp. nov., isolated from effective nodules of lablab purpureus and *Arachis hypogaea*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 61, 2496–2502. doi:10.1099/ijs.0.027110-0
- Chekireb, D., Crovadore, J., Brachmann, A., Chablais, R., Cochard, B., Lefort, F., 2017. Whole-Genome Sequences of 14 Strains of *Bradyrhizobium canariense* and 1 Strain of *Bradyrhizobium japonicum* Isolated from *Lupinus* spp. in Algeria. Genome Announc. 5, e00676-17. doi:10.1128/genomeA.00676-17
- Chou, J.C., Huang, Y.B., 2005. Induction and characterization of an indole-3-acetyl-L-alanine hydrolase from *Arthrobacter ilicis*. J. Plant Growth Regul. 24, 11–18. doi:DOI 10.1007/s00344-005-0013-2
- Chou, J.C., Kuleck, G.A., Cohen, J.D., Mulbry, W.W., 1996. Partial Purification and Characterization of an Inducible Indole-3-Acetyl-L-Aspartic Acid Hydrolase from *Enterobacter agglomerans*. Plant Physiol. 112, 1281–1287.
- Claus, G., Kutzner, H.J., 1983. Degradation of indole by *Alcaligenes* spec. Syst. Appl. Microbiol. 4, 169–80. doi:10.1016/S0723-2020(83)80046-0
- Cohen, A.C., Bottini, R., Piccoli, P.N., 2008. *Azospirillum brasilense* Sp245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in *arabidopsis* plants. Plant Growth Regul. 54, 97–103. doi:10.1007/s10725-007-9232-9
- Cohen, J.D., Bandurski, R.S., 1982. Chemistry and physiology of the bound auxins. Annu. Rev. Plant Physiol. 33, 403–430. doi:10.1016/S1876-0813(08)60299-7
- Cohen, J. D., Slovin, J. P., 2000. Recent research advances concerning indole-3-acetic acid metabolism. Mechanism of Action of Plant Hormones.
- Comai, L., Kosuge, T., 1983. The genetics of indoleacetic acid production and virulence in *Pseudomonas savastanoi*.
- Cook, D., Dreyer, D., Bonnet, D., Howell, M., Nony, E., VandenBosch, K., 1995. Transient induction of a peroxidase gene in *Medicago truncatula* precedes infection by *Rhizobium meliloti*. Plant Cell 7, 43–55. doi:10.1105/tpc.7.1.43
- Cooneyac, T.P., Simpsona, R., 1993. The Route, Control and Compartmentation of Auxin Synthesis. Aust. J. Plant Physiol 20, 527–39. doi:10.1071/PP9930527
- Costacurta, A., Vanderleyden, J., 1995. Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. Crit. Rev. Microbiol. 21, 1–18. doi:10.3109/10408419509113531
- Costanzo, M.E., Andrade, A., Del Carmen Tordable, M., Cassán, F., Abdala, G., 2012. Production and function of jasmonates in nodulated roots of soybean plants inoculated with *Bradyrhizobium japonicum*. Arch. Microbiol. 194, 837–845. doi:10.1007/s00203-012-0817-y

- Crozier, A., Turnbull, C. G. N., Malcolm, J. M., Graebe, J. E., 1991. Gibberellin metabolism in cell-free preparations from *Phaseolus coccineus*. In *Gibberellins* (pp. 83-93). Springer, New York, NY.
- Cytryn, E.J., Sangurdekar, D.P., Streeter, J.G., Franck, W.L., Chang, W.S., Stacey, G., Emerich, D.W., Joshi, T., Xu, D., Sadowsky, M.J., 2007. Transcriptional and physiological responses of *Bradyrhizobium japonicum* to desiccation-induced stress. *J. Bacteriol.* 189, 6751–6762. doi:10.1128/JB.00533-07
- da Silva, K., De Meyer, S.E., Rouws, L.F.M., Farias, E.N.C., dos Santos, M. a O., O’Hara, G., Ardley, J.K., Willems, A., Pitard, R.M., Zilli, J.E., 2014. *Bradyrhizobium ingae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Inga laurina* grown in Cerrado soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 3395–401. doi:10.1099/ijss.0.063727-0
- Davidson, A.L., Dassa, E., Orelle, C., Chen, J., 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 72, 317–64, table of contents. doi:10.1128/MMBR.00031-07
- Davies, P.J., 2010. Plant Hormones, Plant Hormones. doi:10.1016/B978-1-4832-2850-1.50010-6
- 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
- de Matos, G.F., Zilli, J.E., de Araújo, J.L.S., Parma, M.M., Melo, I.S., Radl, V., Baldani, J.I., Rouws, L.F.M., 2017. *Bradyrhizobium sacchari* sp. nov., a legume nodulating bacterium isolated from sugarcane roots. *Arch. Microbiol.* 199, 1251–1258. doi:10.1007/s00203-017-1398-6
- Deakin, W.J., Broughton, W.J., 2009. Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* doi:10.1038/nrmicro2091
- Defez, R., Esposito, R., Angelini, C., Bianco, C., 2016. Overproduction of indole-3-acetic acid in free-living rhizobia induces transcriptional changes resembling those occurring in nodule bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 29, 484–495. doi:http://dx.doi.org/10.1094/MPMI-01-16-0010-R
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Araújo, J.L.S., Rouws, L.F.M., Zilli, J.É., Parma, M.M., Melo, I.S., Hungria, M., 2016. *Bradyrhizobium stylosanthis* sp. nov., comprising nitrogen-fixing symbionts isolated from nodules of the tropical forage legume *Stylosanthes* spp. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 3078–3087. doi:10.1099/ijsem.0.001148
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Parma, M.M., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M., 2015. *Bradyrhizobium tropiciagri* sp. nov. and *Bradyrhizobium embrapense*

- sp. nov nitrogen fixing symbionts of tropical forage legumes. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4424–4433. doi:10.1099/ijsem.0.000592
- Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Melo, I.S., Martínez-Romero, E., Hungria, M., 2013. Polyphasic evidence supporting the reclassification of *Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 3342–3351. doi:10.1099/ijs.0.049130-0
- Dénarié, J., Debelle, F., Rosenberg, C., 1992. Signaling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* 46, 497–531. doi:10.1146/annurev.micro.46.1.497
- 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
- Devron J., 1983. Various organisms that fix nitrogen. In: *Technical Handbook on Symbiotic Nitrogen Fixation, Legume/Rhizobium*. FAO, The United Nations. 1 Biol. 2: 1-4.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., and Robledo. C.W (2011). InfoStat version 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [http:// www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Dixon, R., Kahn, D., 2004. Genetic regulation of biological nitrogen fixation. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 621–631. doi:10.1038/nrmicro954
- Döbereiner J., Pedroza F., 1987. Nitrogen-fixing bacteria in non leguminous crop plants. *Sci. Tech. Publishers/Springer Verlag, Madison, Wis. USA.*
- Donati, A.J., Lee, H.I., Leveau, J.H.J., Chang, W.S., 2013. Effects of Indole-3-Acetic Acid on the Transcriptional Activities and Stress Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum*. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0076559
- Douzi, B., Filloux, A., Voulhoux, R., 2012. On the path to uncover the bacterial type II secretion system. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367, 1059–72. doi:10.1098/rstb.2011.0204
- Dressman, D., Yan, H., Traverso, G., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 2003. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 8817–8822. doi:10.1073/pnas.1133470100
- DuBois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F., 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Anal. Chem.* 28, 350–356. doi:10.1021/ac60111a017
- Dullaart, J., 1970. The bioproduction of indole-3-acetic acid and related compounds in root nodules and roots of *Lupinus luteus* L. and by its rhizobial symbiont. *Acta botanica neerlandica*, 19(5), 573-615.

- Durán, D., Rey, L., Mayo, J., Zúñiga-Dávila, D., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., Martínez-Romero, E., Ormeño-Orrillo, E., 2014a. *Bradyrhizobium paxllaeri* sp. nov. and *Bradyrhizobium icense* sp. nov., nitrogen-fixing rhizobial symbionts of Lima bean (*Phaseolus lunatus* L.) in Peru. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2072–2078. doi:10.1099/ijms.0.060426-0
- Durán, D., Rey, L., Navarro, A., Busquets, A., Imperial, J., Ruiz-Argüeso, T., 2014b. *Bradyrhizobium valentinum* sp. nov., isolated from effective nodules of *Lupinus mariae-josephae*, a lupine endemic of basic-lime soils in Eastern Spain. *Syst. Appl. Microbiol.* 37, 336–341. doi:10.1016/j.syapm.2014.05.002
- Eaton, R.W., Chapman, P.J., 1995. Formation of indigo and related compounds from indolecarboxylic acids by aromatic acid-degrading bacteria: Chromogenic reactions for cloning genes encoding dioxygenases that act on aromatic acids. *J. Bacteriol.* 177, 6983–6988.
- Egebo, L. a., Nielsen, S.V.S., Jochimsen, B.U., 1991. Oxygen-dependent catabolism of indole-3-acetic acid in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 173, 4897–4901.
- Ensley, B.D., Ratzkin, B.J., Osslund, T.D., Simon, M.J., Wackett, L.P., Gibson, D.T., 1983. Expression of naphthalene oxidation genes in *Escherichia coli* results in the biosynthesis of indigo. *Science (80-.)*. 222, 167–169. doi:10.1126/science.6353574
- Ernstsen, A., Sandberg, G., Crozier, A., Wheeler, C.T., 1987. Endogenous indoles and the biosynthesis and metabolism of indole-3-acetic acid in cultures of *Rhizobium phaseoli*. *Planta* 171, 422–428. doi:10.1007/BF00398689
- Euzéby, J., 2006. Notification that new names and new combinations have appeared in volume 56, part 4, of the IJSEM. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 1461–1462. doi:10.1099/ijms.0.64481-0
- Farrer, R.A., Kemen, E., Jones, J.D.G., Studholme, D.J., 2009. De novo assembly of the *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B728a genome using Illumina/Solexa short sequence reads: RESEARCH LETTER. *FEMS Microbiol. Lett.* 291, 103–111. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01441.x
- 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
- Ferguson, B.J., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M.H., Lin, Y.H., Reid, D.E., Gresshoff, P.M., 2010. Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *J. Integr. Plant Biol.* doi:10.1111/j.1744-7909.2010.00899.x
- Flusberg, B.A., Webster, D.R., Lee, J.H., Travers, K.J., Olivares, E.C., Clark, T.A., Korlach, J., Turner, S.W., 2010. Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. *Nat. Methods* 7, 461–465. doi:10.1038/nmeth.1459
- Frugier, F., Kosuta, S., Murray, J.D., Crespi, M., Szczyglowski, K., 2008. Cytokinin: secret agent of

symbiosis. Trends Plant Sci. 13, 115–120. doi:10.1016/j.tplants.2008.01.003

- Fujioka, M., Wada, H., 1968. The bacterial oxidation of indole. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 158(1), 70-78.
- Fukuoka, K., Tanaka, K., Ozeki, Y., Kanaly, R.A., 2015. Biotransformation of indole by *Cupriavidus* sp. strain KK10 proceeds through N-heterocyclic- and carbocyclic-aromatic ring cleavage and production of indigoids. Int. Biodeterior. Biodegrad. 97, 13–24. doi:10.1016/j.ibiod.2014.11.007
- Gárate A., Bonilla I., 2000. Nutrición mineral y producción vegetal. Fundamentos de fisiología vegetal. Eds. Azcón-Bieto and Talón E. pp 113-130. McGraw-Hill Interam. Madrid.
- Garg, N., Geetanjali, 2007. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. Agron. Sustain. Dev. 27, 59–68. doi:10.1051/agro:2006030
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T., 2005. Family VII. *Bradyrhizobiaceae* fam. nov. In: Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds). Bergey's manual of systematic bacteriology, volume two the proteobacteria, part C the alpha-, beta-, delta-, and epsilonproteobacteria. Springer, New York, pp 438–476.
- Gaworzewska, E.T., Carlile, M.J., 1982. Positive Chemotaxis of *Rhizobium leguminosarum* and other Bacteria towards Root Exudates from Legumes and other Plants. Microbiology 128, 1179–1188. doi:10.1099/00221287-128-6-1179
- Gazaryan, I.G., Lagrimini, L.M., Ashby, G. a, Thorneley, R.N., 1996. Mechanism of indole-3-acetic acid oxidation by plant peroxidases: anaerobic stopped-flow spectrophotometric studies on horseradish and tobacco peroxidases. Biochem. J. 313 (Pt 3, 841–847.
- Ghosh, S., Basu, P.S., 2006. Production and metabolism of indole acetic acid in roots and root nodules of *Phaseolus mungo*. Microbiol. Res. 161, 362–366. doi:10.1016/j.micres.2006.01.001
- Glass, N.L., Kosuge, T., 1986. Cloning of the gene for indoleacetic acid-lysine synthetase from *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi*. J. Bacteriol. 166, 598–603.
- Glick, B., Patten, C., Holguin, G., Penrose, D., 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press. London. England.
- Grambow H. J and Langenbeck-Schwich, 1977. The relationship between oxidase activity, peroxidase activity, hydrogen peroxide, and phenolic compounds in the degradation of indole-3-acetic acid in vitro 96, 6–11.
- Grant, J.R., Arantes, A.S., Stothard, P., 2012. Comparing thousands of circular genomes using the CGView Comparison Tool. BMC Genomics 13, 202. doi:10.1186/1471-2164-13-202
- Grönemeyer, J.L., Bunger, W., Reinhold-Hurek, B., 2017. *Bradyrhizobium namibiense* sp. nov., a

- symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of *Lablab purpureus*, hyacinth bean, in Namibia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* doi:10.1099/ijsem.0.002039
- Grönemeyer, J.L., Hurek, T., Bünger, W., Reinhold-Hurek, B., 2016. *Bradyrhizobium vignae* sp. nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from effective nodules of *Vigna* and *Arachis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 62–69. doi:10.1099/ijsem.0.000674
- Grönemeyer, J.L., Hurek, T., Reinhold-Hurek, B., 2015. *Bradyrhizobium kavangense* sp. Nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of traditional namibian pulses. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4886–4894. doi:10.1099/ijsem.0.000666
- Grönemeyer, J.L., Chimwamurombe, P., Reinhold-Hurek, B., 2015. *Bradyrhizobium subterraneum* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium from root nodules of groundnuts. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 3241–3247. doi:10.1099/ijsem.0.000403
- Guerrouj, K., Ruíz-Díez, B., Chahboune, R., Ramírez-Bahena, M.H., Abdelmoumen, H., Quiñones, M.A., El Idrissi, M.M., Velázquez, E., Fernández-Pascual, M., Bedmar, E.J., Peix, A., 2013. Definition of a novel symbiovar (sv. *retamae*) within *Bradyrhizobium retamae* sp. nov., nodulating *Retama sphaerocarpa* and *Retama monosperma*. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 218–223. doi:10.1016/j.syapm.2013.03.001
- Halder, A.K., Mishra, A.K., Chakraborty, P.K., 1991. Solubilization of inorganic phosphates by *Bradyrhizobium*. *Indian J. Exp. Biol.* 29, 28–31.
- Hamana, K., Minamisawa, K., Matsuzaki, S., 1990. Polyamines in *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* and *Argobacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 71, 71–76. doi:10.1016/0378-1097(90)90034-N
- Han, X., Wang, W., Xiao, X., 2008. Microbial Biosynthesis and Biotransformation of Indigo and Indigo-like Pigments. *Chin. J. Biotechnol.* 24, 921–926. doi:10.1016/S1872-2075(08)60043-6
- Han, Y., Gao, S., Muegge, K., Zhang, W., Zhou, B., 2015. Advanced applications of RNA sequencing and challenges. *Bioinform. Biol. Insights* 9, 29–46. doi:10.4137/BBI.S28991
- Hause, B., Schaarschmidt, S., 2009. The role of jasmonates in mutualistic symbioses between plants and soil-born microorganisms. *Phytochemistry*. doi:10.1016/j.phytochem.2009.07.003
- Hedden, P., Phillips, A.L., 2000. Gibberellin metabolism: New insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci.* doi:10.1016/S1360-1385(00)01790-8
- Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Hungria, M., 2017. *Bradyrhizobium mercantei* sp. Nov., a nitrogen-fixing symbiont isolated from nodules of *Deguelia costata* (syn. *Lonchocarpus costatus*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1827–1834. doi:10.1099/ijsem.0.001870
- Helene, L.C.F., Delamuta, J.R.M., Ribeiro, R.A., Ormeño-Orrillo, E., Roge, M.A., Martínez-

- Romero, E., Hungria, M., 2015. *Bradyrhizobium viridifuturi* sp. nov., encompassing nitrogen-fixing symbionts of legumes used for green manure and environmental services. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4441–4448. doi:10.1099/ijsem.0.000591
- Hemmerich, C., Buechlein, A., Podicheti, R., Revanna, K. V., Dong, Q., 2010. An Ergatis-based prokaryotic genome annotation web server. *Bioinformatics* 26, 1122–1124. doi:10.1093/bioinformatics/btq090
- Henry, C.S., Dejongh, M., Best, A.A., Frybarger, P.M., Linsay, B., Stevens, R.L., 2010. High-throughput generation, optimization and analysis of genome-scale metabolic models. *Nat. Biotechnol.* 28, 977–982. doi:10.1038/nbt.1672
- Hinman, R. L., Lang, J., 1965. Peroxidase-catalyzed oxidation of indole-3-acetic acid. *Biochemistry*, 4(1), 144-158.
- Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., Matsui, H., 2001. A large family of class III plant peroxidases. *Plant Cell Physiol.* 42, 462–468. doi:10.1093/pcp/pce061
- Hoagland, D.R., Broyer, T.C., 1936. General Nature of the Process of Salt Accumulation By Roots With Description of Experimental Methods1. *Plant Physiol.* 11, 471–507. doi:10.1104/pp.11.3.471
- Höflich, G., Wiehe, W., Hecht-Buchholz, C., 1995. Rhizosphere colonization of different crops with growth promoting *Pseudomonas* and *Rhizobium* bacteria. *Microbiol. Res.* 150, 139–147. doi:10.1016/S0944-5013(11)80048-0
- Hrdlickova, R., Toloue, M., Tian, B., 2017. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*. doi:10.1002/wrna.1364
- Hunter, W.J., 1989. Indole-3-acetic acid production by bacteroids from soybean root nodules. *Physiol. Plant.* 76, 31–36. doi:10.1111/j.1399-3054.1989.tb05448.x
- Hunter, W.J., 1987. Influence of 5-Methyltryptophan-Resistant *Bradyrhizobium japonicum* on Soybean Root Nodule Indole-3-Acetic Acid Content. *Appl. Envir. Microbiol.* 53, 1051–1055.
- Hutzinger, O., Kosuge, T., 1968. Microbial synthesis and degradation of indole-3-acetic acid. III. The isolation and characterization of indole-3-acetyl- ϵ -L-lysine. *Biochemistry* 7, 601–605.
- Imperlini, E., Bianco, C., Lonardo, E., Camerini, S., Cermola, M., Moschetti, G., Defez, R., 2009. Effects of indole-3-acetic acid on *Sinorhizobium meliloti* survival and on symbiotic nitrogen fixation and stem dry weight production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 727–738. doi:10.1007/s00253-009-1974-z
- Iosipenko, A., Ignatov, V., 1995. Physiological aspects of phytohormone production by *Azospirillum brasilense* Sp 7. In *Azospirillum VI and Related Microorganisms* (pp. 307-312). Springer, Berlin, Heidelberg.

- Islam, M.S., Kawasaki, H., Muramatsu, Y., Nakagawa, Y., Seki, T., 2008. *Bradyrhizobium iriomotense* sp. nov., isolated from a tumor-like root of the legume *Entada koshunensis* from Iriomote Island in Japan. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1416–29. doi:10.1271/bbb.70739
- Jaiswal, V., Rizvi, S. J. H., Mukerji, D., Mathur, S. N., 1982. Nitrogenase activity in root nodules of *Vigna mungo*: the role of nodular cytokinins [mung beans]. *Angewandte Botanik*.
- Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona, R., Vega-Hernandez, M., Trujillo, J., Leon-Barrios, M., 1998. Indole-3-acetic acid catabolism by bacteria belonging to the *Bradyrhizobium* genus. In *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century* (pp. 484-484). Springer Netherlands.
- Jarvie, T., Harkins, T., 2008. De Novo assembly and genomic structural variation analysis with genome sequencer FLX 3K long-tag paired end reads. *Biotechniques* 44, 829–831. doi:10.2144/000112894
- Jensen, J.B., Egsgaard, H., Onckelen, H. Van, Jochimsen, B.U., 1995. Catabolism of Indole-3-Acetic Acid and 4-and 5-Chloroindole- 3-Acetic Acid in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 177, 5762–5766.
- Jiang, J., Li, J., Kwan, H.S., Au, C.H., Wan Law, P.T., Li, L., Kam, K.M., Lun Ling, J.M., Leung, F.C., 2012. A cost-effective and universal strategy for complete prokaryotic genomic sequencing proposed by computer simulation. *BMC Res. Notes* 5, 80. doi:10.1186/1756-0500-5-80
- Jordan, D.C., 1982. Notes: Transfer of *Rhizobium japonicum* Buchanan 1980 to *Bradyrhizobium* gen. nov., a Genus of Slow-Growing, Root Nodule Bacteria from Leguminous Plants. *Int. J. Syst. Bacteriol.* doi:10.1099/00207713-32-1-136
- Kamath, A. V., Vaidyanathan, C.S., 1990. New pathway for the biodegradation of indole in *Aspergillus niger*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 275–280.
- Kanbe, M., Yagasaki, J., Zehner, S., Göttfert, M., Aizawa, S.I., 2007. Characterization of two sets of subpolar flagella in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* 189, 1083–1089. doi:10.1128/JB.01405-06
- Kanehara, K., Minamisawa, K. 2017. Complete Genome Sequence of *Bradyrhizobium japonicum* J5, Isolated from a Soybean Nodule in Hokkaido, Japan. *Genome announcements*, 5(6), e01619-16.
- 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

- Kaneko, T., Maita, H., Hirakawa, H., Uchiike, N., Minamisawa, K., Watanabe, A., Sato, S., 2011. Complete genome sequence of the soybean symbiont *Bradyrhizobium japonicum* strain USDA6 T. Genes (Basel). 2, 763–787. doi:10.3390/genes2040763
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Minamisawa, K., Uchiumi, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Iriguchi, M., Kawashima, K., Kohara, M., Matsumoto, M., Shimpo, S., Tsuruoka, H., Wada, T., Yamada, M., Tabata, S., 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. DNA Res. 9, 189–197. doi:10.1093/dnares/9.6.189
- Kaneshiro, T., Kwolek, W.F., 1985. Stimulated nodulation of soybeans by *Rhizobium japonicum* mutant (B-14075) that catabolizes the conversion of tryptophan to indol-3yl-acetic acid. Plant Sci. 42, 141–146. doi:http://dx.doi.org/10.1016/0168-9452(85)90119-0
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P., Drummond, A., 2012. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. Bioinformatics 28, 1647–1649. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- Kende, H., Zeevaart, J., 1997. The Five “Classical” Plant Hormones. Plant Cell 9, 1197–1210. doi:10.1105/tpc.9.7.1197
- Kim, D., Sitepu, I.R., Hashidoko, Y., 2013. Induction of biofilm formation in the betaproteobacterium *Burkholderia unamae* CK43B exposed to exogenous indole and gallic acid. Appl. Environ. Microbiol. 79, 4845–4852. doi:10.1128/AEM.01209-13
- 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.W., Lifshitz, R., Zablutowicz, R.M., 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Trends Biotechnol. doi:10.1016/0167-7799(89)90057-7
- Kloepper, J.W., Metting Jr., F.B., 1992. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents, in: Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management. p. 255–274; Books in Soils, Plants, and the Environme.
- Kohlmeier, M. G., Yudistira, H., Zhang, X. L., Fristensky, B., Levin, D. B., Sparling, R., Oresnik, I. J., 2015. Draft genome sequence of the bacteriocin-producing *Bradyrhizobium japonicum* strain FN1. Genome announcements, 3(4), e00812-15.

- 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
- Kolb, W., 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.
- Kuykendall, L., 2005. *Bradyrhizobium* Jordan 1982, 137 VP. Bergey's Manual® Syst. Bacteriol.
- Kuykendall, L.D., Saxena, B., Devine, T.E., Udell, S.E., 1991. Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp-nov, in: 13th North American Conf on Symbiotic Nitrogen Fixation. pp. 501–505.
- Kuykendall L.D., 1987. Isolation and identification of genetically marked strains of nitrogen-fixation microsymbionts of soybeans. In: *Elkan GH (ed) Symbiotic nitrogen fixation technology*. Marcel Dekker, New York, pp 205–220.
- Kuykendall, L.D., Roy, M.A., O'Neil, J.J., Devine, T.E., 1988. Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *Int J Syst Bacteriol* 38:358–361
- Lambrecht, M., Okon, Y., Vande Broek, A., Vanderleyden, J., 2000. Indole-3-acetic acid: A reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends Microbiol.* 8, 298–300. doi:10.1016/S0966-842X(00)01732-7
- Lee, H., Tang, H., 2012. Next-generation sequencing technologies and fragment assembly algorithms. *Methods Mol. Biol.* 855, 155–174. doi:10.1007/978-1-61779-582-4_5
- Lee, H.H., Molla, M.N., Cantor, C.R., Collins, J.J., 2010. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature* 467, 82–85. doi:10.1038/nature09354
- Lee, J., Jayaraman, A., Wood, T.K., 2007. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol.* 7, 42. doi:10.1186/1471-2180-7-42
- Lee, J.H., Cho, H.S., Kim, Y., Kim, J.A., Banskota, S., Cho, M.H., Lee, J., 2013. Indole and 7-benzyloxyindole attenuate the virulence of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4543–4552. doi:10.1007/s00253-012-4674-z
- Lee, J.H., Cho, M.H., Lee, J., 2011. 3-Indolylacetonitrile Decreases *Escherichia coli* O157:H7 Biofilm Formation and *Pseudomonas aeruginosa* Virulence. *Environ. Microbiol.* 13, 62–73. doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02308.x
- Lee, J.H., Kim, Y.G., Baek, K.H., Cho, M.H., Lee, J., 2014. The multifaceted roles of the interspecies signalling molecule indole in *Agrobacterium tumefaciens*. *Environ. Microbiol.* 17, 1234–1244. doi:10.1111/1462-2920.12560

- Lee, J.H., Lee, J., 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol. Rev.* 34, 426–444. doi:10.1111/j.1574-6976.2009.00204.x
- Lee, V.T., Schneewind, O., 2001. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev.* doi:10.1101/gad.896801
- Letham, D. S., 1963. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life sciences*, 2(8), 569-573.
- Leveau, J.H.J., Gerards, S., 2008. Discovery of a bacterial gene cluster for catabolism of the plant hormone indole 3-acetic acid. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65, 238–250. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00436.x
- Leveau, J.H.J., Lindow, S.E., 2005. Utilization of the plant hormone indole-3-acetic acid for growth by *Pseudomonas putida* strain 1290. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 2365–2371. doi:10.1128/AEM.71.5.2365-2371.2005
- 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
- Li, S., Tighe, S.W., Nicolet, C.M., Grove, D., Levy, S., Farmerie, W., Viale, A., Wright, C., Schweitzer, P.A., Gao, Y., Kim, D., Boland, J., Hicks, B., Kim, R., Chhangawala, S., Jafari, N., Raghavachari, N., Gandara, J., Garcia-Reyero, N., Hendrickson, C., Roberson, D., Rosenfeld, J.A., Smith, T., Underwood, J.G., Wang, M., Zumbo, P., Baldwin, D.A., Grills, G.S., Mason, C.E., 2014. Multi-platform assessment of transcriptome profiling using RNA-seq in the ABRF next-generation sequencing study. *Nat. Biotechnol.* 32, 915–925. doi:10.1038/nbt.2972
- Li, Y.H., Wang, R., Zhang, X.X., Young, J.P.W., Wang, E.T., Sui, X.H., Chen, W.X., 2015. *Bradyrhizobium guangdongense* sp. nov. and *Bradyrhizobium guangxiense* sp. nov., isolated from effective nodules of peanut. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 4655–4661. doi:10.1099/ijsem.0.000629
- 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
- Libault, M., Farmer, A., Brechenmacher, L., Drnevich, J., Langley, R.J., Bilgin, D.D., Radwan, O., Neece, D.J., Clough, S.J., May, G.D., Stacey, G., 2010. Complete Transcriptome of the Soybean Root Hair Cell, a Single-Cell Model, and Its Alteration in Response to *Bradyrhizobium japonicum* Infection. *PLANT Physiol.* 152, 541–552.

doi:10.1104/pp.109.148379

- Lin, G.-H., Chen, H.-P., Huang, J.-H., Liu, T.-T., Lin, T.-K., Wang, S.-J., Tseng, C.-H., Shu, H.-Y., 2012. Identification and characterization of an indigo-producing oxygenase involved in indole 3-acetic acid utilization by *Acinetobacter baumannii*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 101, 881–890. doi:10.1007/s10482-012-9704-4
- Linhartová, I., Bumba, L., Mašín, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., HejnováHolubová, J., Sadílková, L., Morová, J., Šebo, P., 2010. RTX proteins: A highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00231.x
- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., Law, M., 2012. Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* doi:10.1155/2012/251364
- Liu, Y., Jiang, X., Guan, D., Zhou, W., Ma, M., Zhao, B., Cao, F., Li, L., Li, J., 2017. Transcriptional analysis of genes involved in competitive nodulation in *Bradyrhizobium diazoefficiens* at the presence of soybean root exudates. *Sci. Rep.* 7. doi:10.1038/s41598-017-11372-0
- Lockhart, D.J., Dong, H., Byrne, M.C., Follettie, M.T., Gallo, M. V., Chee, M.S., Mittmann, M., Wang, C., Kobayashi, M., Horton, H., Brown, E.L., 1996. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat. Biotechnol.* 14, 1675–1680. doi:10.1038/nbt1296-1675
- Loh, J.T., Stacey, G., 2001. Feedback regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Mol Microbiol* 41, 1357–1364. doi:2603 [pii]
- Lu, J.K., Dou, Y.J., Zhu, Y.J., Wang, S.K., Sui, X.H., Kang, L.H., 2014. *Bradyrhizobium ganzhouense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from *Acacia melanoxylon* R. Br. nodules. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 1900–1905. doi:10.1099/ij.s.0.056564-0
- Ludwig-Müller, J., 2011. Auxin conjugates: Their role for plant development and in the evolution of land plants. *J. Exp. Bot.* 62, 1757–1773. doi:10.1093/jxb/erq412
- 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
- Malamy, J.E., Benfey, P.N., 1997. Down and out in *Arabidopsis*: The formation of lateral roots. *Trends Plant Sci.* doi:10.1016/S1360-1385(97)01118-7
- 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
- Marcondes de Souza, J. A., Carrareto Alves, L. M., de Mello Varani, A., de Macedo Lemos, E. G., 2014. The Family *Bradyrhizobiaceae*. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 135-154.
- Mardis, E.R., 2008. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 9, 387–402. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164359
- 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., He, W., Helgesen, S., Ho, C.H., Irzyk, G.P., Jando, S.C., Maria, L.I., Jarvie, T.P., Jirage, K.B., Kim, J., Knight, J.R., Lanza, R., Leamon, J.H., Lefkowitz, S.M., Lei, M., Li, J., Kenton, L., Lu, H., Makhijani, V.B., Mcdade, K.E., Mckenna, M.P., Myers, W., Nickerson, E., Nobile, J.R., Plant, R., Puc, B.P., Ronan, T., Roth, G.T., Sarkis, G.J., Simons, J.F., Simpson, J.W., Srinivasan, M., Tartaro, K.R., Tomasz, A., Vogt, K.A., Greg, A., Wang, S.H., Wang, Y., Weiner, M.P., Yu, P., Richard, F., Rothberg, J.M., 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
- Martins da Costa, E., Azarias Guimarães, A., Pereira Vicentin, R., de Almeida Ribeiro, P.R., Ribas Leão, A.C., Balsanelli, E., Lebbe, L., Aerts, M., Willems, A., de Souza Moreira, F.M., 2017. *Bradyrhizobium brasilense* sp. nov., a symbiotic nitrogen-fixing bacterium isolated from Brazilian tropical soils. *Arch. Microbiol.* 199, 1211–1221. doi:10.1007/s00203-017-1390-1
- Martins da Costa, E., Azarias Guimarães, A., Soares de Carvalho, T., Louzada Rodrigues, T., de Almeida Ribeiro, P.R., Lebbe, L., Willems, A., de Souza Moreira, F.M., 2018. *Bradyrhizobium forestalis* sp. nov., an efficient nitrogen-fixing bacterium isolated from nodules of forest legume species in the Amazon. *Arch. Microbiol.* 1–10. doi:10.1007/s00203-018-1486-2
- Mathesius, U., 2001. Flavonoids induced in cells undergoing nodule organogenesis in white clover are regulators of auxin breakdown by peroxidase. *J. Exp. Bot.* 52, 419–426. doi:10.1093/jexbot/52.suppl_1.419
- Mathesius, U., Schlaman, H.R.M., Spaink, H.P., Sautter, C., Rolfe, B.G., Djordjevic, M.A., 1998. Auxin transport inhibition precedes root nodule formation in white clover roots and is

- regulated by flavonoids and derivatives of chitin oligosaccharides. *Plant J.* 14, 23–34. doi:10.1046/j.1365-313X.1998.00090.x
- Mavingui, P., Flores, M., Guo, X., Dávila, G., Perret, X., Broughton, W.J., Palacios, R., 2002. Dynamics of genome architecture in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J. Bacteriol.* 184, 171–176. doi:10.1128/JB.184.1.171-176.2002
- Maxam, a 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
- Maynaud, G., Willems, A., Soussou, S., Vidal, C., Mauré, L., Moulin, L., Cleyet-Marel, J.C., Brunel, B., 2012. Molecular and phenotypic characterization of strains nodulating *Anthyllis vulneraria* in mine tailings, and proposal of *Aminobacter anthyllidis* sp. nov., the first definition of *Aminobacter* as legume-nodulating bacteria. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 65–72. doi:10.1016/j.syapm.2011.11.002
- Merriman, B., Torrent, I., Rothberg, J.M., 2012. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. *Electrophoresis.* doi:10.1002/elps.201200424
- 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
- Michel, D.C., Passos, S.R., Simões-Araujo, J.L., Baraúna, A.C., da Silva, K., Parma, M.M., Melo, I.S., De Meyer, S.E., O'Hara, G., Zilli, J.E., 2017. *Bradyrhizobium centrolobii* and *Bradyrhizobium macuxiense* sp. nov. isolated from *Centrolobium paraense* grown in soil of Amazonia, Brazil. *Arch. Microbiol.* 199, 657–664. doi:10.1007/s00203-017-1340-y
- Miller, J.R., Koren, S., Sutton, G., 2010. Assembly algorithms for next-generation sequencing data. *Genomics.* doi:10.1016/j.ygeno.2010.03.001
- Minamisawa, K., Fukai, K., 1991. Production of Indole-3-Acetic Acid by *Bradyrhizobium japonicum* . A Correlation with Genotype Grouping and Rhizobitoxine Production. *Plant Cell* 32, 1–9.
- Mino, Y., 1970. Studies on the destruction of indole-3-acetic acid by a species of *Arthrobacter* IV. Decomposition products. *Plant and cell physiology*, 11(1), 129-138.
- Mohammed, N., Onodera, R., Or-Rashid, M.M., 2003. Degradation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal bacteria, protozoa and their mixture in vitro. *Amino Acids* 24, 73–80. doi:10.1007/s00726-002-0330-8
- Mongiardini, E.J., Parisi, G.D., Quelas, J.I., Lodeiro, A.R., 2016. The tight-adhesion proteins TadGEF of *Bradyrhizobium diazoefficiens* USDA 110 are involved in cell adhesion and infectivity on soybean roots. *Microbiol. Res.* 182, 80–88. doi:10.1016/j.micres.2015.10.001

- Monteiro, A.M., Crozier, A., Sandberg, G., 1988. The biosynthesis and conjugation of indole-3-acetic acid in germinating seed and seedlings of *Dalbergia dolichopetala*. *Planta* 174, 561–568. doi:10.1007/BF00634487
- Morris, R. O., 1995. Genes specifying auxin and cytokinin biosynthesis in prokaryotes. In *Plant Hormones* (pp. 318-339). Springer Netherlands.
- Morrone, D., Chambers, J., Lowry, L., Kim, G., Anterola, A., Bender, K., Peters, R.J., 2009. Gibberellin biosynthesis in bacteria: Separate ent-copalyl diphosphate and ent-kaurene synthases in *Bradyrhizobium japonicum*. *FEBS Lett.* 583, 475–480. doi:10.1016/j.febslet.2008.12.052
- 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
- Mueller, R.S., Beyhan, S., Saini, S.G., Yildiz, F.H., Bartlett, D.H., 2009. Indole acts as an extracellular cue regulating gene expression in *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 191, 3504–3516. doi:10.1128/JB.01240-08
- Mylona, P., Pawlowski, K., Bisseling, T., 1995. Symbiotic Nitrogen Fixation. *Plant Cell* 7, 869–885. doi:10.1097/00010694-199511000-00009
- 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
- Nagarajan, N., Pop, M., 2013. Sequence assembly demystified. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg3367
- Newman, J.R., Fuqua, C., 1999. Broad-host-range expression vectors that carry the L-arabinose-inducible *Escherichia coli* araBAD promoter and the *araC* regulator. *Gene* 227, 197–203. doi:10.1016/S0378-1119(98)00601-5
- Ng, P., Tan, J.J.S., Ooi, H.S., Lee, Y.L., Chiu, K.P., Fullwood, M.J., Srinivasan, K.G., Perbost, C., Du, L., Sung, W.K., Wei, C.L., Ruan, Y., 2006. Multiplex sequencing of paired-end ditags (MS-PET): A strategy for the ultra-high-throughput analysis of transcriptomes and genomes. *Nucleic Acids Res.* 34. doi:10.1093/nar/gkl444
- Nielsen, S.V.S., Egebo, L.A., Jochimsen, B., 1988. *Bradyrhizobial* indoleacetic acid metabolism and its significance for root nodule development.
- Niemi, K., Häggman, H., Sarjala, T., 2002. Effects of exogenous diamines on the interaction between ectomycorrhizal fungi and adventitious root formation in Scots pine in vitro. *Tree Physiol.* 22, 373–81. doi:10.1093/treephys/22.6.373
- Nienaber, A., Huber, A., Göttfert, M., Hennecke, H., Fischer, H.M., 2000. Three new NifA-

- regulated genes in the *Bradyrhizobium japonicum* symbiotic gene region discovered by competitive DNA-RNA hybridization. *J. Bacteriol.* 182, 1472–80. doi:10.1128/JB.182.6.1472-1480.2000.Updated
- 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
- Noel, T.C., Sheng, C., Yost, C.K., Pharis, R.P., Hynes, M.F., 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can. J. Microbiol.* 42, 279–283. doi:10.1139/m96-040
- Nonhebel, H.M., Kruse, L.I., Bandurski, R.S., 1985. Indole-3-acetic acid catabolism in *Zea mays* seedlings. Metabolic conversion of oxindole-3-acetic acid to 7-hydroxy-2-oxindole-3-acetic acid 7'-O-β-D-glucopyranoside. *J. Biol. Chem.* 260, 12685–12689.
- Nonhebel, H. M., Bandurski, R. S., 1984. Oxidation of Indole-3-acetic Acid and Oxindole-3-acetic Acid to 2, 3-Dihydro-7-hydroxy-2-oxo-1H Indole-3-acetic Acid-7'-O-β-d-Glucopyranoside in *Zea mays* Seedlings. *Plant physiology*, 76(4), 979-983.
- Nookaew, I., Papini, M., Pornputtapong, N., Scalcinati, G., Fagerberg, L., Uhlén, M., Nielsen, J., 2012. A comprehensive comparison of RNA-Seq-based transcriptome analysis from reads to differential gene expression and cross-comparison with microarrays: A case study in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 40, 10084–10097. doi:10.1093/nar/gks804
- Novák, O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T., Ljung, K., 2012. Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *Plant J.* 72, 523–536. doi:10.1111/j.1365-313X.2012.05085.x
- Oh, S., Go, G.W., Mylonakis, E., Kim, Y., 2012. The bacterial signalling molecule indole attenuates the virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *J. Appl. Microbiol.* 113, 622–628. doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05372.x
- Okon, Y., Labandera-Gonzalez, C.A., 1994. Agronomic applications of *Azospirillum*: An evaluation of 20 years worldwide field inoculation. *Soil Biol. Biochem.* doi:10.1016/0038-0717(94)90311-5
- Olesen, M.R., Jochimsen, B.U., 1996. Identification of enzymes involved in indole-3-acetic acid degradation. *Plant Soil* 186, 143–149.
- Oresnik, I.J., Twelker, S., Hynes, M.F., 1999. Cloning and characterization of a *Rhizobium leguminosarum* gene encoding a bacteriocin with similarities to RTX toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2833–2840.
- Overbeek, R., Begley, T., Butler, R.M., Choudhuri, J. V., Chuang, H.Y., Cohoon, M., de Crécy-

- Lagard, V., Diaz, N., Disz, T., Edwards, R., Fonstein, M., Frank, E.D., Gerdes, S., Glass, E.M., Goesmann, A., Hanson, A., Iwata-Reuyl, D., Jensen, R., Jamshidi, N., Krause, L., Kubal, M., Larsen, N., Linke, B., McHardy, A.C., Meyer, F., Neuweger, H., Olsen, G., Olson, R., Osterman, A., Portnoy, V., Pusch, G.D., Rodionov, D.A., Rülckert, C., Steiner, J., Stevens, R., Thiele, I., Vassieva, O., Ye, Y., Zagnitko, O., Vonstein, V., 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., Platt, A.R., Jones, D.R., Reifenger, J.G., Sass, L.E., McInerney, P., Thompson, J.F., Bowers, J., Jarosz, M., Milos, P.M., 2009. Direct RNA sequencing. *Nature* 461, 814–818. doi:10.1038/nature08390
- Pan, B., Bai, Y.M., Leibovitch, S., Smith, D.L., 1999. Plant-growth-promoting rhizobacteria and kinetin as ways to promote corn growth and yield in a short-growing-season area. *Eur. J. Agron.* 11, 179–186. doi:10.1016/S1161-0301(99)00029-5
- Patten, C.L., Glick, B.R., 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Can. J. Microbiol.* 42, 207–220. doi:10.1139/m96-032
- Pawlowski, K., Bisseling, T., 1996. Rhizobial and Actinorhizal Symbioses: What Are the Shared Features? *Plant Cell* 8, 1899–1913. doi:10.1105/tpc.8.10.1899
- Pedrosa, F.O., Monteiro, R.A., Wasseem, R., Cruz, L.M., Ayub, R.A., Colauto, N.B., Fernandez, M.A., Fungaro, M.H.P., Grisard, E.C., Hungria, M., Madeira, H.M.F., Nodari, R.O., Osaku, C.A., Petzl-Erler, M.L., Terenzi, H., Vieira, L.G.E., Steffens, M.B.R., Weiss, V.A., Pereira, L.F.P., Almeida, M.I.M., Alves, L.R., Marin, A., Araujo, L.M., Balsanelli, E., Baura, V.A., Chubatsu, L.S., Faoro, H., Favetti, A., Friedermann, G., Glienke, C., Karp, S., Kava-Cordeiro, V., Raittz, R.T., Ramos, H.J.O., Ribeiro, E.M.S.F., Rigo, L.U., Rocha, S.N., Schwab, S., Silva, A.G., Souza, E.M., Tadra-Sfeir, M.Z., Torres, R.A., Dabul, A.N.G., Soares, M.A.M., Gasques, L.S., Gimenes, C.C.T., Valle, J.S., Ciferri, R.R., Correa, L.C., Murace, N.K., Pamphile, J.A., Patussi, E.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A., Rocha, C.L.M.S.C., Arantes, O.M.N., Furlaneto, M.C., Godoy, L.P., Oliveira, C.E.C., Satori, D., Vilas-Boas, L.A., Watanabe, M.A.E., Dambros, B.P., Guerra, M.P., Mathioni, S.M., Santos, K.L., Steindel, M., Vernal, J., Barcellos, F.G., Campo, R.J., Chueire, L.M.O., Nicol??s, M.F., Pereira-Ferrari, L., da Concei????o Silva, J.L., Gioppo, N.M.R., Margarido, V.P., Menck-Soares, M.A., Pinto, F.G.S., de Sim??o, R.C.G., Takahashi, E.K., Yates, M.G., Souza, E.M., 2011. Genome of herbaspirillum seropedicae strain SmR1, a specialized diazotrophic endophyte of tropical grasses. *PLoS Genet.* 7. doi:10.1371/journal.pgen.1002064
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Flores-Félix, J.D., de la Vega, P.A., Rivas, R., Mateos, P.F.,

- Igual, J.M., Martínez-Molina, E., Trujillo, M.E., Velázquez, E., 2015. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium lupini* and reclassification as *Bradyrhizobium lupini* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1213–1219. doi:10.1099/ijms.0.000082
- Pena-Cabriales, J. J., Alexander, M., 1983. Growth of *Rhizobium* in Soil Amended with Organic Matter 1. *Soil Science Society of America Journal*, 47(2), 241-245.
- Penmetsa, R.V., Frugoli, J.A., Smith, L.S., Long, S.R., Cook, D.R., 2003. Dual genetic pathways controlling nodule number in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 131, 998–1008. doi:10.1104/pp.015677
- Penna, C., Massa, R., Olivieri, F., Gutkind, G., Cassán, F., 2011. A simple method to evaluate the number of Bradyrhizobia on soybean seeds and its implication on inoculant quality control. *AMB Express* 1, 21. doi:10.1186/2191-0855-1-25
- Perticari A., Parra R., Balatti P., Fiqueni M., E. Rodriguez Caceres., 1996. Selección de cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *Bradyrhizobium elkanii* y *Sinorhizobium fredii* para la inoculación de soja. *Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología*. Santa Cruz de La Sierra. Bolivia, pp. 103-104.
- Pevzner, P.A., Tang, H., Waterman, M.S., 2001. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 9748–9753. doi:10.1073/pnas.171285098
- Piccinetti C, Arias N, Ventimiglia L, Díaz Zorita M, Murua L, Sánchez H, Ferraris G, Mousegne F, Fontanetto H, Sá Pereira E, Capurro J, Enrico JM, López C, Carrizo AS, Salvagiotti F, Collino D, Perticari A., 2013. Positive effects of inoculation of soybean on nodulation BNF and the parameters of crop production, p 283–297. In: Albanesi AS (ed), *Microbiología agrícola: un aporte de la investigación en Argentina*, 2nd ed. Magna Publicaciones, Tucumán, Argentina.
- Pierantonelli M.B., Molina R., Torres D., Spaepen S., Vanderleyden J., Cassán F., 2013. Evaluation of indole-3-acetic acid homeostasis in *Bradyrhizobium japonicum* E109. 21 Conferencia de la Asociación Internacional de Sustancias Reguladores del Crecimiento de Plantas (IPGSA).
- Pierantonelli, M. B., 2012. Factores bióticos y abióticos que regulan el catabolismo del ácido indol-3-acético en *Bradyrhizobium japonicum* cepa E109. Tesis para la obtención del título de grado.
- Prinsen, E., Costacurta, A., Michiels, K., Vanderleyden, J., Vanonckelen, H., 1993. *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6, 609–615. doi:10.1094/MPMI-6-609
- Proctor, M.H., 1958. Bacterial dissimilation of indoleacetic acid: A new route of breakdown of the indole nucleus [26]. *Nature*. doi:10.1038/1811345a0
- Qu, Y., Xu, B., Zhang, X., Ma, Q., Zhou, H., Kong, C., Zhang, Z., Zhou, J., 2013. Biotransformation of indole by whole cells of recombinant biphenyl dioxygenase and

- biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase. *Biochem. Eng. J.* 72, 54–60. doi:10.1016/j.bej.2012.12.021
- Quelas, J.I., Mongiardini, E.J., Casabuono, A., López-García, S.L., Althabegoiti, M.J., Covelli, J.M., Pérez-Giménez, J., Couto, A., Lodeiro, A.R., 2010. Lack of Galactose or Galacturonic Acid in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 Exopolysaccharide Leads to Different Symbiotic Responses in Soybean. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23, 1592–1604. doi:10.1094/MPMI-05-10-0122
- Quelas, J.I., Mongiardini, E.J., Pérez-Giménez, J., Parisi, G., Lodeiro, A.R., 2013. Analysis of two polyhydroxyalkanoate synthases in *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110. *J. Bacteriol.* 195, 3145–3155. doi:10.1128/JB.02203-12
- Qingyuan, H., Hongyan, Y., Ping, W., Zhengpeng, L., Songhua, W., Changwei, Z. 2015. Transcriptomic Characterization of Soybean Roots in Response to *Bradyrhizobium* Infection by RNA Sequencing. bioRxiv, 024224.
- Rademacher, W., 1994. Gibberellin formation in microorganisms. *Plant Growth Regul.* 15, 303–314. doi:10.1007/BF00029903
- Ramírez-Bahena, M.H., Chahboune, R., Peix, A., Velázquez, E., 2013. Reclassification of *Agromonas oligotrophica* into the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium oligotrophicum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 1013–1016. doi:10.1099/ijs.0.041897-0
- Ramírez-Bahena, M.H., Flores-Félix, J.D., Chahboune, R., Toro, M., Velázquez, E., Peix, A., 2016. *Bradyrhizobium centrosemae* (symbiovar *centrosemae*) sp. nov., *Bradyrhizobium americanum* (symbiovar *phaseolarum*) sp. nov. and a new symbiovar (*tropici*) of *Bradyrhizobium viridifuturi* establish symbiosis with *Centrosema* species native to America. *Syst. Appl. Microbiol.* 39, 378–383. doi:10.1016/j.syapm.2016.06.001
- Ramírez-Bahena, M.H., Peix, A., Rivas, R., Camacho, M., Rodríguez-Navarro, D.N., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Willems, A., Velázquez, E., 2009. *Bradyrhizobium pachyrhizi* sp. nov. and *Bradyrhizobium jicamae* sp. nov., isolated from effective nodules of *Pachyrhizus erosus*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 1929–1934. doi:10.1099/ijs.0.006320-0
- Read, R.R., Costerton, J.W., 1987. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* 33, 1080–90. doi:10.1139/m87-189
- Records, A.R., 2011. The Type VI Secretion System: A Multipurpose Delivery System with a Phage-Like Machinery. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24, 751–757. doi:10.1094/MPMI-11-10-0262
- Reinecke, D.M., Bandurski, R.S., 1983. Oxindole-3-acetic Acid, an Indole-3-acetic Acid Catabolite

in *Zea mays*. *Plant Physiol.* 71, 211–213. doi:10.1104/pp.71.1.211

- Ribaudo, C.M., Krumpholz, E.M., Cassán, F.D., Bottini, R., Cantore, M.L., Curá, J.A., 2006. *Azospirillum* sp. Promotes root hair development in tomato plants through a mechanism that involves ethylene. *J. Plant Growth Regul.* 25, 175–185. doi:10.1007/s00344-005-0128-5
- Rivas, R., Willems, A., Palomo, J.L., García-Benavides, P., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E., Gillis, M., Velázquez, E., 2004. *Bradyrhizobium betae* sp. nov., isolated from roots of *Beta vulgaris* affected by tumour-like deformations. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1271–1275. doi:10.1099/ijs.0.02971-0
- 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
- Ronen, R., Boucher, C., Chitsaz, H., Pevzner, P., 2012. sEQuel: Improving the accuracy of genome assemblies. *Bioinformatics* 28. doi:10.1093/bioinformatics/bts219
- Rosas, S., Soria, R., Correa, N., Abdala, G., 1998. Jasmonic acid stimulates the expression of nod genes in *Rhizobium*. *Plant Mol. Biol.* 38, 1161–1168. doi:10.1023/A:1006064807870
- Ross, J.J., O'Neill, D.P., Smith, J.J., Kerckhoffs, L.H.J., Elliott, R.C., 2000. Evidence that auxin promotes gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant J.* 21, 547–552. doi:10.1046/j.1365-313X.2000.00702.x
- Sakamoto, Y., Uchida, M., Ichihara, K., 1953. The bacterial decomposition of indole. I. Studies on its metabolic pathway by successive adaptation. *Medical Journal of Osaka University*, 3, 477-486.
- Sakata, T., Kanesaki, Y., Yoshikawa, H., Tsurumaru, H., Yamakawa, T., 2015. Draft Genome Sequence of *Bradyrhizobium japonicum* Is-1, Which Is Incompatible with Rj2 Genotype Soybeans. *Genome Announc.* 3, e01219-15. doi:10.1128/genomeA.01219-15
- Salkowski, E., 1885. Ueber das verhalten der skatolcarbonsäure im organismus. *Zeitschrift für physiologische Chemie*, 9(1), 23-33.
- Salyers, A. A., Whitt, D. D. 2002. A molecular approach (pp. 53-100). *Bacterial pathogenesis*, 2nd edn. Washington, DC: ASM Press.
- Salzwedel, J.L., Dazzo, F.B., 1993. pSYM nod gene influence on elicitation of peroxidase-activity from white clover and pea roots by *Rhizobia* and their cell-free supernatants. *Mol Plant-Microbe Interact* 6, 127–134.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold

Spring Harbor laboratory press, New York. doi:574.873224 1/1989

- Sandberg, G., Crozier, A., & Ernstsén, A. (1987). *The Principles and Practice of Plant Hormone Analysis*.
- 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
- Savitsky, P.A., Gazaryan, I.G., Tishkov, V.I., Lagrimini, L.M., Ruzgas, T., Gorton, L., 1999a. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochem. J.* 340 (Pt 3, 579–83. doi:10.1042/0264-6021:3400579
- Savitsky, P.A., Gazaryan, I.G., Tishkov, V.I., Lagrimini, L.M., Ruzgas, T., Gorton, L., 1999b. Oxidation of indole-3-acetic acid by dioxygen catalysed by plant peroxidases: specificity for the enzyme structure. *Biochem. J.* 340 (Pt 3, 579–83. doi:10.1042/0264-6021:3400579
- Schadt, E.E., Turner, S., Kasarskis, A., 2010. A window into third-generation sequencing. *Hum. Mol. Genet.* 19. doi:10.1093/hmg/ddq416
- Schäfer, A., Tauch, A., Jäger, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., Pühler, A., 1994. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene* 145, 69–73. doi:10.1016/0378-1119(94)90324-7
- Schell, M.A., Ulrich, R.L., Ribot, W.J., Brueggemann, E.E., Hines, H.B., Chen, D., Lipscomb, L., Kim, H.S., Mrázek, J., Nierman, W.C., DeShazer, D., 2007. Type VI secretion is a major virulence determinant in *Burkholderia mallei*. *Mol. Microbiol.* 64, 1466–1485. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05734.x
- 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
- Schmieder, R., Edwards, R., 2011. Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 27, 863–864. doi:10.1093/bioinformatics/btr026
- Seemann, T., 2014. Prokka: Rapid prokaryotic genome annotation. *Bioinformatics* 30, 2068–2069. doi:10.1093/bioinformatics/btu153
- Shendure, J., Ji, H., 2008. Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* doi:10.1038/nbt1486
- Silva, F. V., De Meyer, S.E., Simões-Araújo, J.L., Barbé, T. da C., Xavier, G.R., O'Hara, G., Ardley, J.K., Rumjanek, N.G., Willems, A., Zilli, J.E., 2014. *Bradyrhizobium manausense* sp. nov., isolated from effective nodules of *Vigna unguiculata* grown in Brazilian Amazonian

- rainforest soils. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 64, 2358–2363. doi:10.1099/ijs.0.061259-0
- Simon, R., Quandt, J., Klipp, W., 1989. New derivatives of transposon tn5 suitable for mobilization of replicons, generation of operon fusions and induction of genes in Gram-negative bacteria. *Gene* 80, 161–169. doi:10.1016/0378-1119(89)90262-X
- Simpson, J.T., Durbin, R., 2012. Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures. *Genome Res.* 22, 549–556. doi:10.1101/gr.126953.111
- Siqueira, A., Ormeño-Orrillo, E., Souza, R., Rodrigues, E., Almeida, L.G., Barcellos, F., Batista, J.S., Nakatani, A., Martínez-Romero, E., Vasconcelos, A.T., Hungria, M., 2014. Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. *BMC Genomics* 15, 420. doi:10.1186/1471-2164-15-420
- Siqueira, A.F., Ormeño-Orrillo, E., Souza, R.C., Rodrigues, E.P., Almeida, L.G.P., Barcellos, F.G., Batista, J.S.S., Nakatani, A.S., Martínez-Romero, E., Vasconcelos, A.T.R., Hungria, M., 2014. Comparative genomics of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15 and *Bradyrhizobium diazoefficiens* CPAC 7: elite model strains for understanding symbiotic performance with soybean. *BMC Genomics* 15, 420. doi:10.1186/1471-2164-15-420
- 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, L.M., Sanders, J.Z., Kaiser, R.J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C.R., Heiner, C., Kent, S.B., Hood, L.E., 1986. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321, 674–679. doi:10.1038/321674a0
- Sorek, R., Cossart, P., 2010. Prokaryotic transcriptomics: A new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat. Rev. Genet.* doi:10.1038/nrg2695
- Spaepen, S., Vanderleyden, J., 2011. Auxin and plant-microbe interactions. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, 1–13. doi:10.1101/cshperspect.a001438
- Spena, A., Prinsen, E., Fladung, M., Schulze, S.C., Van Onckelen, H., 1991. The indoleacetic acid-lysine synthetase gene of *Pseudomonas syringae* subsp. *savastanoi* induces developmental alterations in transgenic tobacco and potato plants. *Mol. Gen. Genet.* 227, 205–212.
- Stacey, G., Sanjuan, J., Luka, S., Dockendorff, T., Carlson, R.W., 1995. Signal exchange in the *Bradyrhizobium*-soybean symbiosis. *Soil Biol. Biochem.* doi:10.1016/0038-0717(95)98622-U
- Stamm, I., Lottspeich, F., Plaga, W., 2005. The pyruvate kinase of *Stigmatella aurantiaca* is an indole binding protein and essential for development. *Mol. Microbiol.* 56, 1386–1395. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04640.x
- Strzelczyk, E., Kampert, M., Li, C.Y., 2004. Cytokinin-like substances and ethylene production by

- Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiol. Res.* 149, 55–60. doi:10.1016/S0944-5013(11)80136-9
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K.I., Uchiumi, T., Higashi, S., Han, S.Y., Yoshida, S., Asami, T., Abe, M., 2004. Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol.* 45, 914–922. doi:10.1093/pcp/pch107
- Suzuki, Y., Takeuchi, S., Kawarada, A., Kinashi, H., 1976. Possible metabolic intermediates from iaa to β -acid in rice bran. *Agric. Biol. Chem.* 40, 2465–2470. doi:10.1080/00021369.1976.10862405
- Swain, M.T., Tsai, I.J., Assefa, S.A., Newbold, C., Berriman, M., Otto, T.D., 2012. A post-assembly genome-improvement toolkit (PAGIT) to obtain annotated genomes from contigs. *Nat. Protoc.* 7, 1260–1284. doi:10.1038/nprot.2012.068
- Swerdlow, H., Wu, S.L., Harke, H., Dovichi, N.J., 1990. Capillary gel electrophoresis for DNA sequencing. Laser-induced fluorescence detection with the sheath flow cuvette. *J. Chromatogr.* 516, 61–7.
- Taller, B., Sturtevant, D., 1989. Modification of cytokinin production in *Bradyrhizobium* cultures. *J Cell Biochem Suppl*, 12(Part C), 274.
- Tamaru, Y., Takani, Y., Yoshida, T., Sakamoto, T., 2005. Crucial role of extracellular polysaccharides in desiccation and freezing tolerance in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc commune*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 7327–33. doi:10.1128/AEM.71.11.7327-7333.2005
- Terouchi, N., Syōno, K., 1990. *Rhizobium* attachment and curling in asparagus, rice and oat plants. *Plant Cell Physiol.* 31, 119–127. doi:10.1093/oxfordjournals.pcp.a077868
- Thanassi, D.G., Stathopoulos, C., Karkal, A., Li, H., 2005. Protein secretion in the absence of ATP: The autotransporter, two-partner secretion and chaperone/usher pathways of Gram-negative bacteria. *Mol. Membr. Biol.* doi:10.1080/09687860500063290
- Thimann, K. V. 1936. On the physiology of the formation of nodules on legume roots. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 22(8), 511.
- Tian, C.F., Zhou, Y.J., Zhang, Y.M., Li, Q.Q., Zhang, Y.Z., Li, D.F., Wang, S., Wang, J., Gilbert, L.B., Li, Y.R., Chen, W.X., 2012. Comparative genomics of rhizobia nodulating soybean suggests extensive recruitment of lineage-specific genes in adaptations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109, 8629–8634. doi:10.1073/pnas.1120436109
- Tien, T.M., Gaskins, M.H., Hubbell, D.H., 1979. Plant Growth Substances Produced by *Azospirillum brasilense* and Their Effect on the Growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L.). *Appl. Environ. Microbiol.* 37, 1016–24.

- Torres, D., Peticari, A., Revale, S., Vazquez, M., Cassán, F., 2013. Análisis genómico de *Bradyrhizobium japonicum* E109, una cepa simbiótica de soja que muestra un amplio repertorio PGPR. Argentina. Santiago del Estero. IX Reunión científico técnica de Biología de suelos. REBIOS.
- Torres, D., Revale, S., Obando, M., Maroniche, G., Paris, G., Peticari, A., Vazquez, M., Wisniewski-dyé, F., Martínez-abarca, F., 2015. Genome Sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109 , One of the Most Agronomically Used Nitrogen-Fixing Rhizobacteria in Argentina. Genome Announc. 3, 1–2. doi:10.1128/genomeA.01566-14. Copyright
- Tsubokura, S., Sakamoto, Y., Ichihara, K., 1961. The bacterial decomposition of indoleacetic acid. The Journal of Biochemistry, 49(1), 38-42.
- Tsurumaru, H., Kanesaki, Y., Hashimoto, S., Okizaki, K., Yoshikawa, H., Yamakawa, T., 2014. Draft Genome Sequence of *Bradyrhizobium japonicum* Is-34, Which Is Incompatible with Rj4 Genotype Soybeans. Genome Announc. 2. doi:10.1128/genomeA.01316-14
- Tsurumi, S., Wada, S. 1986. Dioxindole-3-acetic acid conjugates formation from indole-3-acetylaspatic acid in Vicia seedlings. Plant and cell physiology, 27(8), 1513-1522.
- Tuominen, H., Ostin, A., Sandberg, G., Sundberg, B., 1994. A Novel Metabolic Pathway for Indole-3-Acetic Acid in Apical Shoots of *Populus tremula* (L.) x *Populus tremuloides* (Michx.). Plant Physiol. 106, 1511–1520.
- Turner, S.L., Young, J.P., 2000. The glutamine synthetases of rhizobia: phylogenetics and evolutionary implications. Mol. Biol. Evol. 17, 309–319.
- Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J.A., Costa, G., McKernan, K., Sidow, A., Fire, A., Johnson, S.M., 2008. A high-resolution, nucleosome position map of *C. elegans* reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. Genome Res. 18, 1051–1063. doi:10.1101/gr.076463.108
- Van Berkum, P., Leibold, J.M., Eardly, B.D., 2006. Proposal for combining *Bradyrhizobium* spp. (*Aeschynomene indica*) with *Blastobacter denitrificans* and to transfer *Blastobacter denitrificans* (Hirsch and Muller, 1985) to the genus *Bradyrhizobium* as *Bradyrhizobium denitrificans* (comb. nov.). Syst. Appl. Microbiol. 29, 207–215. doi:10.1016/j.syapm.2005.07.014
- Van Dijk, E.L., Jaszczyszyn, Y., Thermes, C., 2014. Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. Exp. Cell Res. doi:10.1016/j.yexcr.2014.01.008
- van Puyvelde, S., Cloots, L., Engelen, K., Das, F., Marchal, K., Vanderleyden, J., Spaepen, S., 2011. Transcriptome Analysis of the Rhizosphere Bacterium *Azospirillum brasilense* Reveals an Extensive Auxin Response. Microb. Ecol. 61, 723–728. doi:10.1007/s00248-011-9819-6

- van Rhijn, P., 1998. Lotus corniculatus Nodulation Specificity Is Changed by the Presence of a Soybean Lectin Gene. Plant cell online 10, 1233–1250. doi:10.1105/tpc.10.8.1233
- Velculescu, V.E., Zhang, L., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., 1995. Serial Analysis of Gene Expression. Science (80-.). 270, 484–487. doi:10.1126/science.270.5235.484
- Vincent, J., 1970. A Manual for the Practical Study of Root-nodul Bacteria. Int. Biol. Program. Handb. 15, 164.
- Vinuesa, P., León-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Pérez-Galdona, R., Werner, D., Martínez-Romero, E., 2005. *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and Brady. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55, 569–575. doi:10.1099/ijs.0.63292-0
- Wang, J.Y., Wang, R., Zhang, Y.M., Liu, H.C., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Chen, W.X., 2013. *Bradyrhizobium daqingense* sp. nov., isolated from soybean nodules. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 63, 616–624. doi:10.1099/ijs.0.034280-0
- Wang, R., Chang, Y.L., Zheng, W.T., Zhang, D., Zhang, X.X., Sui, X.H., Wang, E.T., Hu, J.Q., Zhang, L.Y., Chen, W.X., 2013. *Bradyrhizobium arachidis* sp. nov., isolated from effective nodules of *Arachis hypogaea* grown in China. Syst. Appl. Microbiol. 36, 101–105. doi:10.1016/j.syapm.2012.10.009
- Wang, Z., Gerstein, M., Snyder, M., 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. Nat. Rev. Genet. 10, 57–63. doi:10.1038/nrg2484
- Weir B. S., 2016. The current taxonomy of rhizobia. NZ Rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia>. Última actualización: enero 2016.
- Welinder, K. G., 1992. Plant peroxidases: structure-function relationships. In Plant Peroxidases 1980-1990, Topics and Detailed Literature on Molecular, Biochemical, and Physiological Aspects (pp. 1-24).
- Xu, L.M., Ge, C., Cui, Z., Li, J., Fan, H., 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. Int. J. Syst. Bacteriol. 45, 706–711. doi:10.1099/00207713-45-4-706
- Yanni, Y.G., Rizk, R.Y., Corich, V., Squartini, a, Ninke, K., Philip-Hollingsworth, S., Orgambide, G., Bruijn, D., Stoltzfus, J., Buckley, D., Schmidt, T.M., Mateos, P.F., Ladha, J.K., Dazzo, F.B., 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. Plant Soil 194, 99–114. doi:10.1023/a:1004269902246

- Yao, Y., Sui, X.H., Zhang, X.X., Wang, E.T., Chen, W.X., 2015. *Bradyrhizobium erythrophlei* sp. nov. and *Bradyrhizobium ferriligni* sp. nov., isolated from effective nodules of *Erythrophleum fordii*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 65, 1831–1837. doi:10.1099/ijs.0.000183
- Yao, Z.Y., Kan, F.L., Wang, E.T., Wei, G.H., Chen, W.X., 2002. Characterization of rhizobia that nodulate legume species of the genus *Lespedeza* and description of *Bradyrhizobium yuanmingense* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. doi:10.1099/ijs.0.01408-0
- Yokoyama, M.T., Carlson, J.R., 1974. Dissimilation of tryptophan and related indolic compounds by ruminal microorganisms in vitro. Appl. Microbiol. 27, 540–8.
- Yu, X., Cloutier, S., Tambong, J.T., Bromfield, E.S.P., 2014. *Bradyrhizobium ottawaense* sp. nov., A symbiotic nitrogen fixing bacterium from root nodules of soybeans in Canada. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 3202–3207. doi:10.1099/ijs.0.065540-0
- 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 signalling cross-talk and *Agrobacterium*-plant co-evolution. Cell. Microbiol. 10, 2339–2354. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01215.x
- Zhang, Y.M., Li, Y., Chen, W.F., Wang, E.T., Sui, X.H., Li, Q.Q., Zhang, Y.Z., Zhou, Y.G., Chen, W.X., 2012. *Bradyrhizobium huanghuaihaiense* sp. nov., an effective symbiotic bacterium isolated from soybean (*Glycine max* L.) nodules. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 62, 1951–1957. doi:10.1099/ijs.0.034546-0
- Zheng, J., Leung, K.Y., 2007. Dissection of a type VI secretion system in *Edwardsiella tarda*. Mol. Microbiol. 66, 1192–1206. doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05993.x
- Zilli, J.E., Baraúna, A.C., da Silva, K., De Meyer, S.E., Farias, E.N.C., Kaminski, P.E., da Costa, I.B., Ardley, J.K., Willems, A., Camacho, N.N., Dourado, F. dos S., O'Hara, G., 2014. *Bradyrhizobium neotropicale* sp. nov., isolated from effective nodules of *Centropogon paraense*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64, 3950–3957. doi:10.1099/ijs.0.065458-0
- Zúñiga, A., Poupin, M.J., Donoso, R., Ledger, T., Guiliani, N., Gutiérrez, R. A, González, B., 2013. Quorum sensing and indole-3-acetic acid degradation play a role in colonization and plant growth promotion of *Arabidopsis thaliana* by *Burkholderia phytofirmans* PsJN. Mol. Plant-Microbe Interact. 26, 546–53. doi:10.1094/MPMI-10-12-0241-R

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

ANEXOS

Anexo 1. Reporte de la secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109

La información detallada a continuación fue proporcionada por INDEAR, como resultado de la secuenciación de *B. japonicum* E109.

Reporte Corrida N#: 50 (½ placa titanium)

Tipo de muestra: DNA genómico bacteriano

Tipo de Proyecto: WGS

Cuantificación de las muestras

Se realizó la cuantificación del ADN genómico utilizando el Kit Quant-iT™ PicoGreen® DNA Reagent (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones detalladas por el fabricante (high range curve – half area plate).

Bj: *Bradyrhizobium japonicum* cepa E109

| Picogreen High Range Half Area | | | |
|--------------------------------|------------------------|--------------------|--------------------------|
| Muestra | Concentracion ng/ul | Vol. para 500ng | Vol. TE1X para 100 ul |
| BJ1 | 38,265 | 13,1 | 86,9 |
| BJ2 | 38,8 | 12,9 | 87,1 |

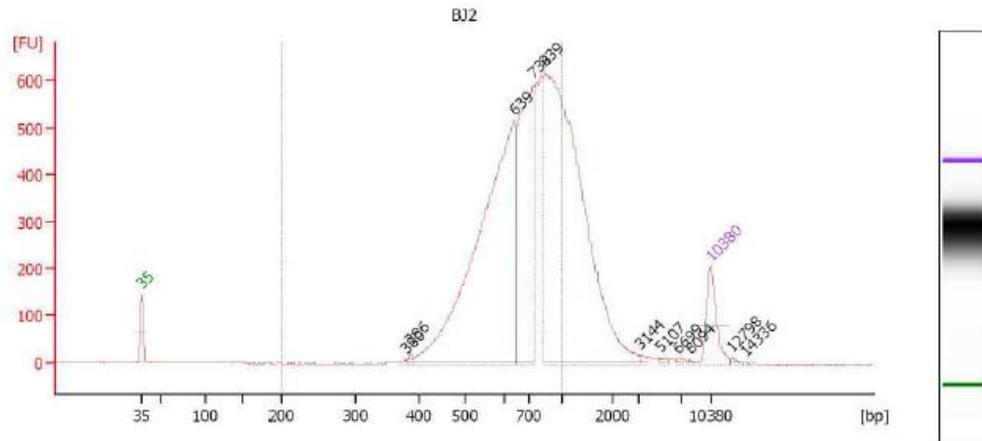
Preparación de las bibliotecas RL (Roche)

Se partió de 500 ng de ADN purificado. Se realizaron las etapas de fragmentación del ADN por nebulización, reparación y fosforilación de los extremos, ligación de adaptadores y purificación con AMPure XP (Beckman Coulter) de los fragmentos de la biblioteca de acuerdo a los lineamientos detallados en Rapid Library Preparation Method Manual.

AGILENT 2100 Bioanalyzer (High Sensitivity DNA Kit)

Se corrió 1 µl de cada biblioteca en un High Sensitivity ADN chip (Agilent Bioanalyzer 2100) para evaluar la calidad de la misma. Se detalla el reporte:

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina



Overall Results for sample 8 : BJ2

Number of peaks found: 11 Corr. Area 1: 6,952.6
 Noise: 0.8

Peak table for sample 8 : BJ2

| Peak | Size [bp] | Conc. [pg/µl] | Molarity [pmol/l] | Observations |
|------|-----------|---------------|-------------------|--------------|
| 1 | 35 | 125.00 | 5,411.3 | Lower Marker |
| 2 | 380 | 3.18 | 12.7 | |
| 3 | 386 | 5.03 | 19.7 | |
| 4 | 639 | 1,151.53 | 2,728.4 | |
| 5 | 734 | 539.11 | 1,113.3 | |
| 6 | 839 | 1,355.16 | 2,446.1 | |
| 7 | 3,144 | 5.42 | 2.6 | |
| 8 | 5,107 | 3.80 | 1.1 | |
| 9 | 6,699 | 2.10 | 0.5 | |
| 10 | 8,094 | 1.71 | 0.3 | |
| 11 | 10,380 | 75.00 | 10.9 | Upper Marker |
| 12 | 12,798 | 0.00 | 0.0 | |
| 13 | 14,336 | 0.00 | 0.0 | |

Region table for sample 8 : BJ2

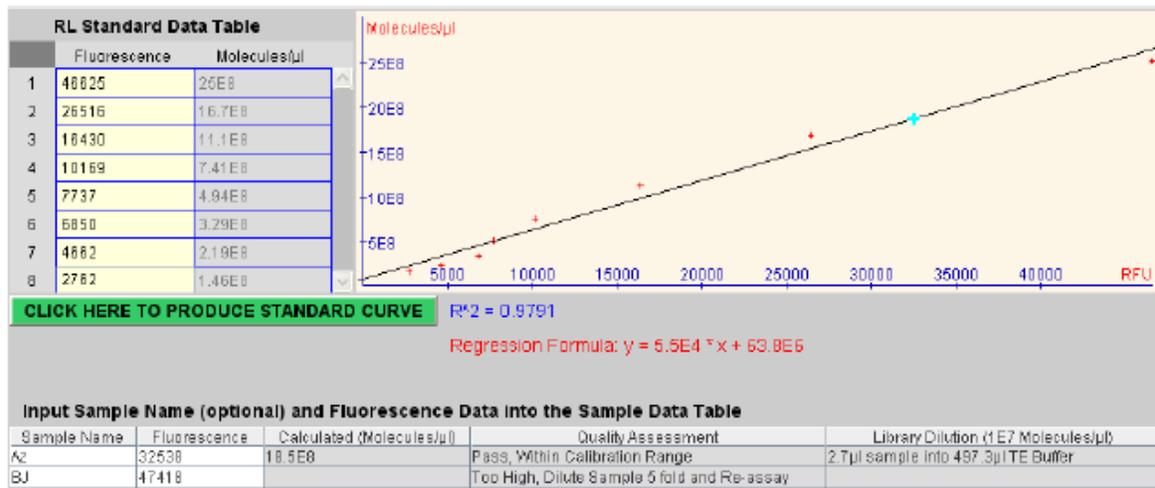
| From [bp] | To [bp] | Corr. Area | % of Total | Average Size [bp] | Size distribution in CV [%] | Conc. [pg/µl] | Molarity [pmol/l] | Color |
|-----------|---------|------------|------------|-------------------|-----------------------------|---------------|-------------------|-------|
| 200 | 1,000 | 6,952.6 | 75 | 692 | 21.8 | 2,546.24 | 5,922.7 | Blue |

Cuantificación de las bibliotecas

Se realizó la cuantificación de las bibliotecas por fluorescencia de acuerdo al protocolo descrito en Rapid Library Preparation Method Manual.

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

FAM:

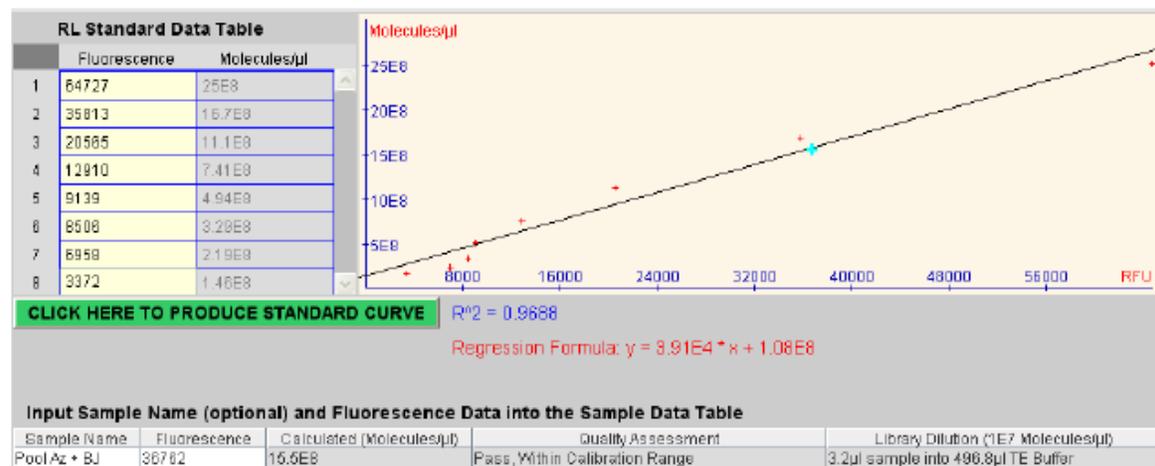


Picogreen- Armado del pool equimolar:

| Library | Concentracion en ng/ul | Vol para 35 ng | Masa total ng | Vol total en ul | Concentracion pool en ng/ul |
|---------|------------------------|----------------|---------------|-----------------|-----------------------------|
| BJ2 | 2,24 | 15,61 | | | |
| TE1X | | 20 | | | |

Cuantificación del pool y preparación de WS 1e7 moléculas/ul:

FAM:



Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

Picogreen:

| | Concentracion en ng/ul |
|------------|------------------------|
| Pool Az+BJ | 1,19 |

Titulación

Se realizó una PCR en emulsión de escala pequeña (SV-emPCR) utilizando el GS Titanium SV-emPCR Kit Lib-L v2 (Roche) siguiendo el protocolo detallado en emPCR Amplification Method Manual – Lib L SV. Se ensayaron 3 concentraciones del pool equimolar de las bibliotecas: 2 – 4 – 8 copies per beads (cpb). En base a los resultados se seleccionó una concentración para continuar con la PCR en emulsión de gran escala (LV-emPCR) esperando un porcentaje total de enriquecimiento (% enrichment) comprendido entre 5-20%.

| No. | Sample name | Copies per Bead | Concentration beads recovered [x 10 ⁶ /ml] | Volume beads recovered [μl] | Concentration beads enriched [x 10 ⁶ /ml] | Volume beads enriched [μl] | Total beads recovered | Total beads recovered [%] | Total beads enriched | Total beads enriched [%] | Expected total bead enrichment for large run [%] |
|-----|-------------------------------|-----------------|--|--------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|--|
| 2 | Pool Az+BJ Fabricio Cassan | 2 | 11,670 | 178 | 1,217 | 132 | 2077260 | 86,553 | 160644 | 6,69 | 6,57 |
| 2 | Pool Az+BJ Fabricio Cassan | 4 | 10,198 | 165 | 1,803 | 120 | 1682670 | 70,111 | 216360 | 9,02 | 10,93 |
| 2 | Pool Az+BJ Fabricio Cassan | 8 | 11,040 | 178 | 2,990 | 122 | 1959600 | 81,650 | 364719 | 15,20 | 15,82 |

Choose this copies/bead ratio with the expected total bead enrichment of 8% for the large run

Good sequencing results will be achieved with enrichments of 5 - 20% (new Titanium kits)

| Sample name | Copies per bead used | ul per library per | ul library MV |
|---------------------|----------------------|--------------------|---------------|
| Pool Az+BJ Fabricio | 2,5 | 8,75 | 1,7 |

LV emPCR

Se realizó una PCR en emulsión de gran escala (LV-emPCR) utilizando el GS Titanium LV-emPCR Kit Lib-L v2 (Roche) siguiendo el protocolo detallado en emPCR Amplification Method Manual – Lib L MV.

| No. | Sample name | Copies per Bead | Concentration beads recovered [x 10 ⁶ /ml] | Volume beads recovered [μl] | Concentration beads enriched [x 10 ⁶ /ml] | Volume beads enriched [μl] | Total beads recovered | Total beads recovered [%] | Total beads enriched | Total beads enriched [%] | Volume for 2,000,000 beads [μl] |
|-----|-------------------------------|-----------------|--|--------------------------------|---|-------------------------------|-----------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------------|
| 2 | Pool Az+BJ Fabricio Cassan | 2,5 | 14,870 | 870 | 2,975 | 765 | 12936900 | 69,761 | 2275875 | 6,50 | 672,26891 |
| 2 | Pool Az+BJ Fabricio Cassan | 2,5 | 13,045 | 880 | | | 11479600 | | | | |

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

En la tabla se muestra que el porcentaje de enriquecimiento obtenido está dentro del rango aceptable (5-20%) y se corresponde con los valores esperados a partir de la titulación de la biblioteca (SV-emPCR). Además se detalla el volumen de producto enriquecido que se siembra en una de las 2 regiones de la placa de secuenciación.

Métricas y Gráficos de la corrida

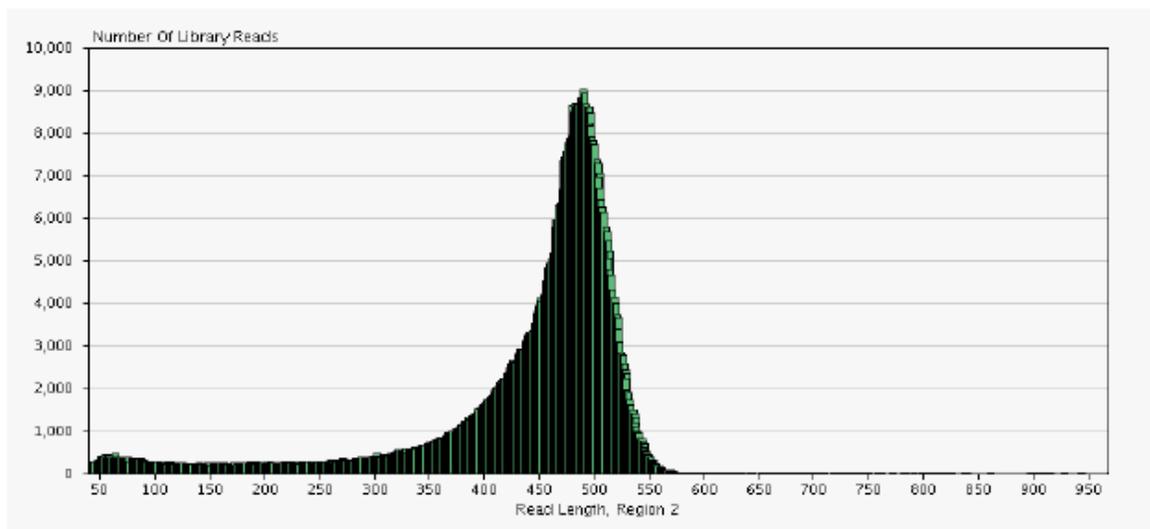
Se realizó la secuenciación de la biblioteca en ½ placa titanium de acuerdo al protocolo detallado en Sequencing Method Manual Roche. Los resultados se detallan a continuación:

Placa dividida en 2 regiones.

Región 2: Pool 2 bacterias Az+Bj.

| GACT (Library) | Region | Total |
|----------------------------|--------------------|--------------------|
| | 2 | |
| Raw Wells | 1.027.103 | 2.075.563 |
| Key Pass Wells | 981.983 | 1.997.734 |
| Failed | | |
| Dot | 7.908 | 27.362 |
| Mixed | 49.387 | 115.907 |
| Short Quality | 111.048 | 266.065 |
| Short Primer | 1.817 | 1.951 |
| Passed Filter Wells | 807.616 | 1.581.553 |
| % Dot + Mixed | 5,83 | 7,17 |
| % Short | 11,49 | 13,42 |
| % Passed Filter | 82,24 | 79,17 |
| GACT (Library) | | |
| Raw Wells | 1.027.103 | 2.075.563 |
| Key Pass Wells | 981.983 | 1.997.734 |
| Passed Filter Wells | 807.616 | 1.581.553 |
| Total Bases | 352.955.338 | 656.265.741 |
| Length Average | 437,03 | 414,95 |
| Length Std Deviation | 100,79 | |
| Longest Reads Length | 968 | 1.179 |
| Shortest Reads Length | 40 | 40 |
| Median Reads Length | 471 | 457 |

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina



Anexo 2. Métricas de la secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109 mediante WGS a partir del software PRINSEQ.

Las tablas y figuras que se muestran a continuación, es información proporcionada por INDEAR.

Tabla 1. Información de entrada de la cepa E109 al software PRINSEQ por el método WGS

| Información de entrada | |
|-------------------------------|---|
| Archivo de entrada | Bradyrhizobium_japonicum_E109.reads.fastq |
| Formato de entrada | FASTQ |
| # Secuencias | 515,712 |
| Bases totales | 264,354,663 |

| Información de entrada | |
|-------------------------------|---|
| Archivo de entrada | Bradyrhizobium_japonicum_E109.reads.fastq |
| Formato de entrada | FASTQ |
| # Secuencias | 515,712 |
| Bases totales | 264,354,663 |

| Distribución de Longitud | |
|--|-------------------|
| Promedio longitud de la secuencia | 502.85 ± 50.28 pb |
| Longitud Mínima | 55 pb |
| Longitud Máxima | 1,201 pb |
| Rango de longitud | 1,147 pb |

Tabla 2. Información de la distribución de longitud de las secuencias de la cepa E109 por el método WGS

| Distribución de Longitud | |
|--|-----------------------------|
| Promedio longitud de la secuencia | 502.85 ± 50.28 pb |
| Longitud Mínima | 55 pb |
| Longitud Máxima | 1,201 pb |
| Rango de longitud | 1,147 pb |
| Modalidad de longitud | 502 pb con 9,970 secuencias |

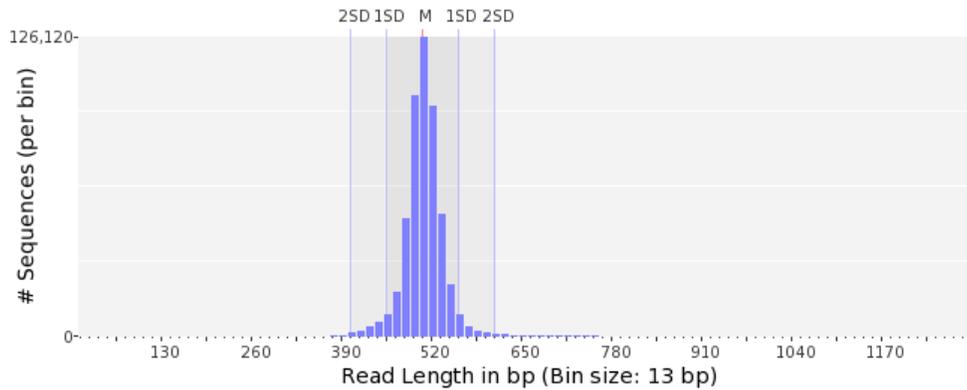


Figura 1. Longitud de los reads de las secuencias de E109 por el método WGS

Tabla 3. Información de la distribución del contenido GC de la cepa E109 por el método WGS

| Distribución del contenido GC | |
|--------------------------------------|----------------------------|
| Promedio de contenido GC | 62.40 ± 3.79 % |
| Mínimo contenido GC | 14% |
| Máximo contenido GC | 88% |
| Rango contenido GC | 75% |
| Modalidad contenido GC | 64 % con 60,041 secuencias |

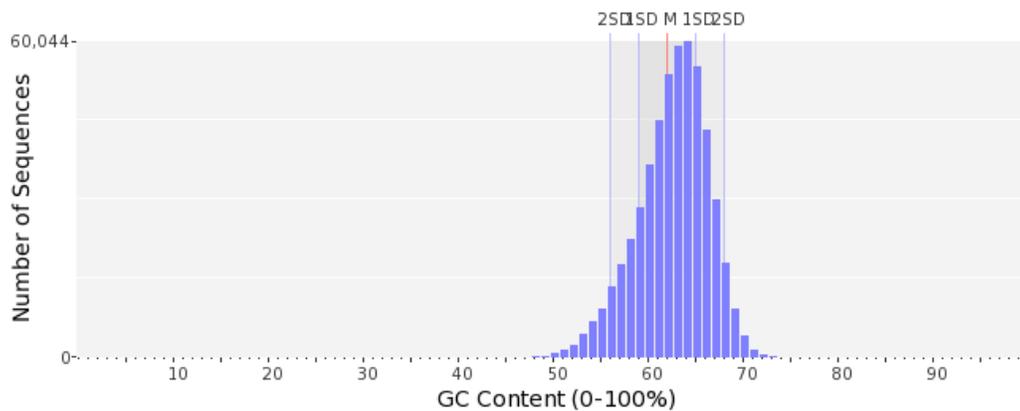


Figura 2. Contenido GC de las secuencias de E109 por el método WGS

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

Base Quality Distribution

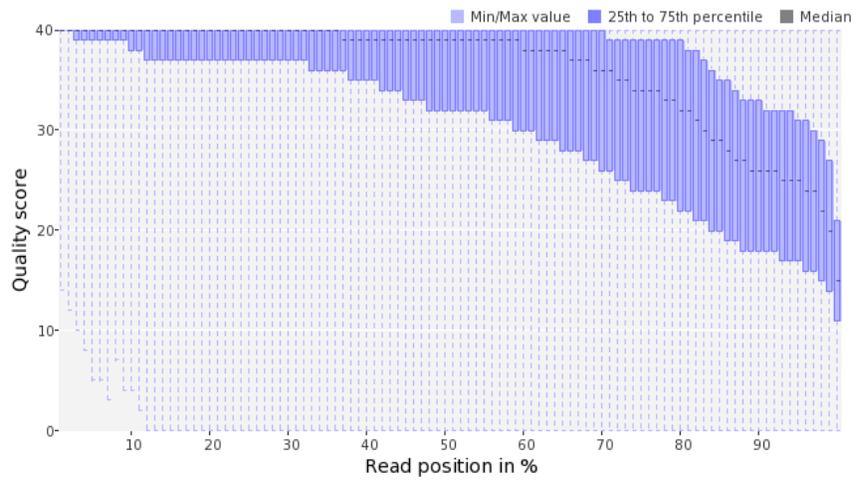


Figura 3. Distribución de la calidad de las bases de las secuencias de E109 por el método WGS

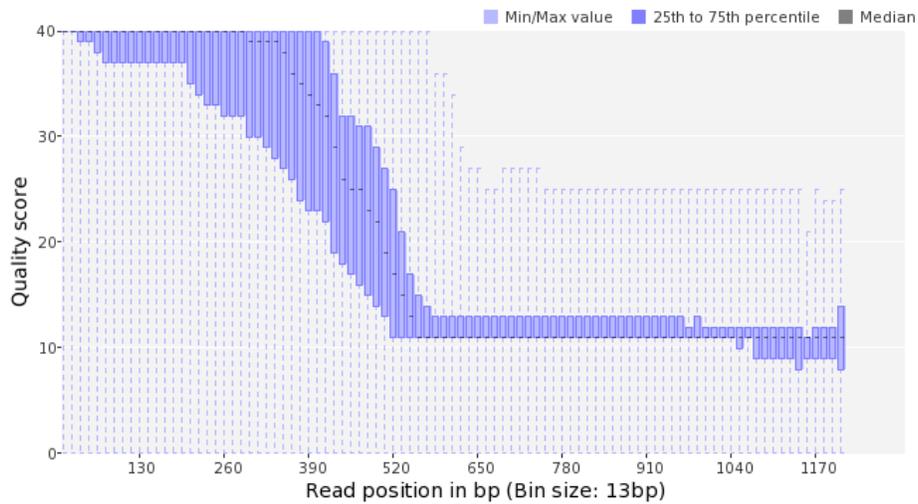


Figura 4. Distribución de la calidad de los reads de las secuencias de E109 por el método WGS

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

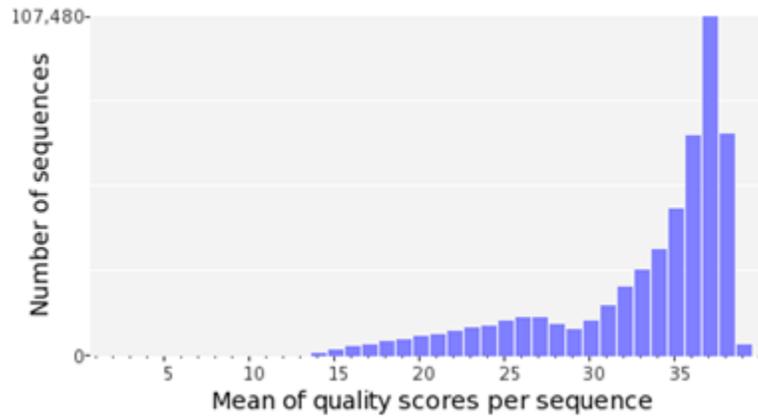


Figura 5. Promedio del puntaje de calidad por secuencia de E109 por el método WGS

Tabla 4. Información de la ocurrencia de N de la cepa E109 por el método WGS

| Ocurrencia de N | |
|--|-------------------|
| Secuencias con N | 192,752 (36.66 %) |
| Porcentaje máx. de Ns por secuencia | 71% |

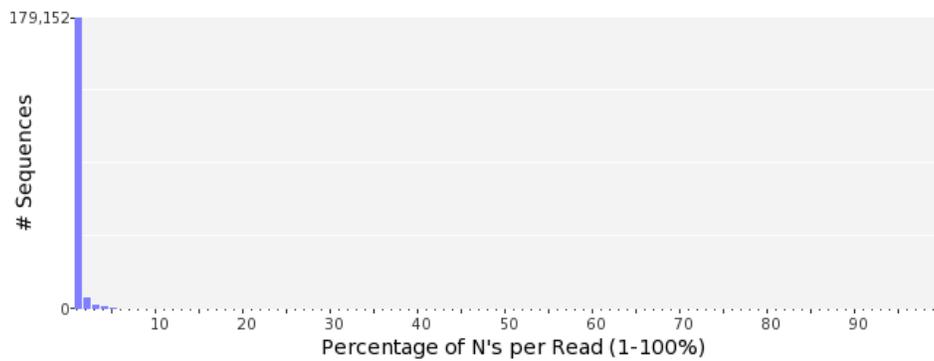


Figura 6. Porcentaje de N por reads de las secuencias de E109 por el método WGS

Tabla 5. Información de la cola poli A/T en la cepa E109 por el método WGS

| Cola poli-A/T | | |
|------------------------------|-------------|-------------|
| | 5' terminal | 3' terminal |
| Secuencias con cola | 0 | 13 (0.00 %) |
| Longitud máx. de cola | 0 | 6 |

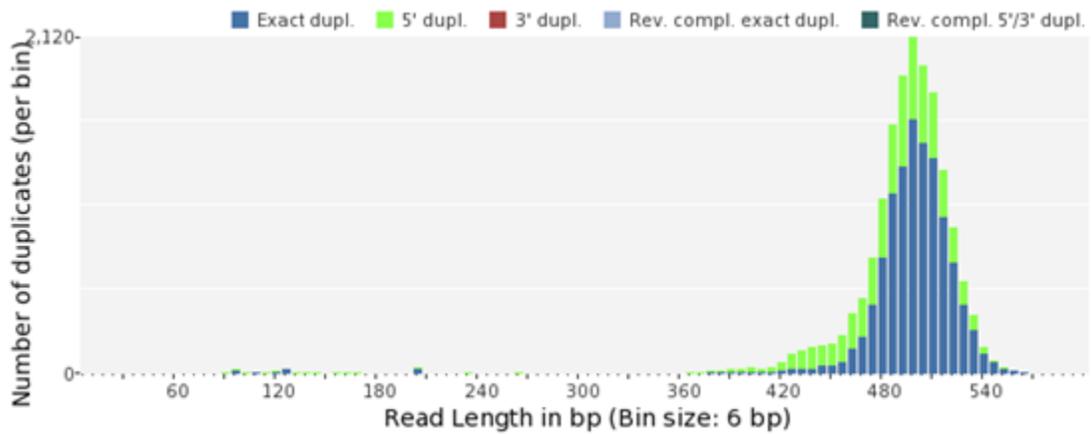


Figura 9. Número de duplicados en la longitud de los reads en las secuencias de E109 por el método WGS

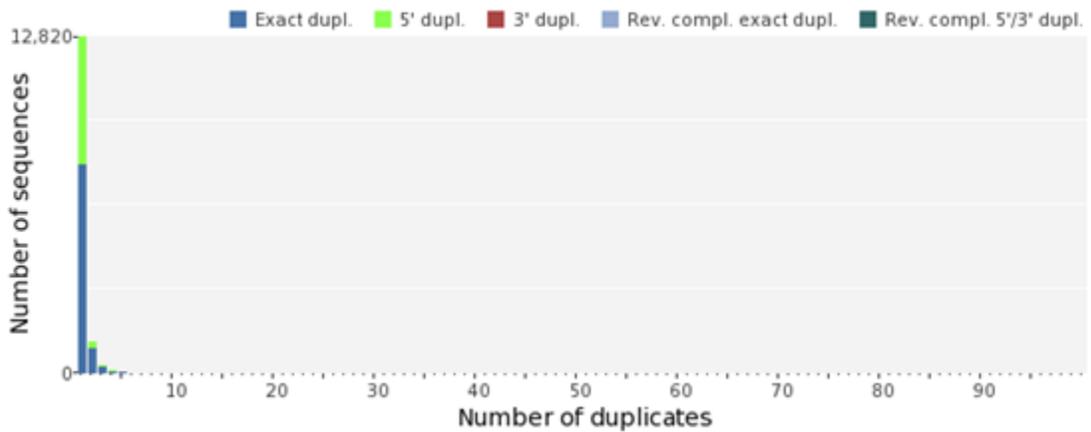


Figura 10. Número de secuencias en los duplicados de E109 por el método WGS

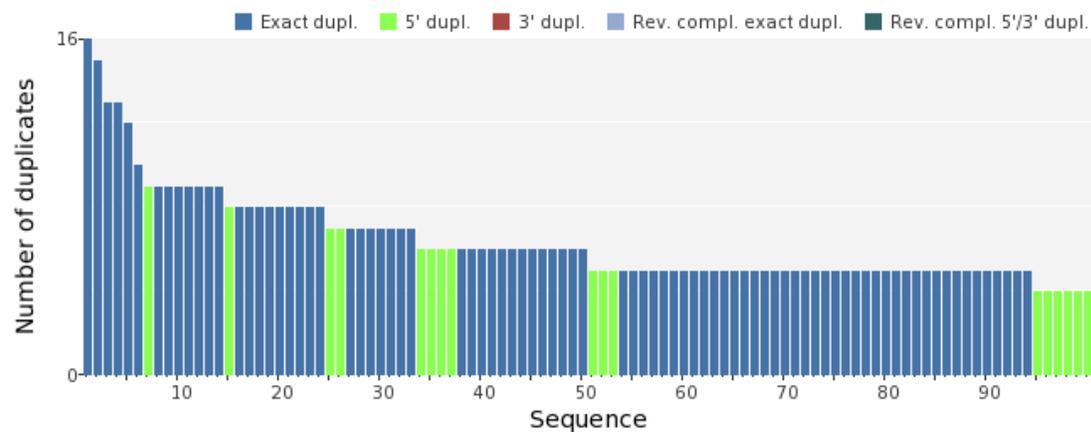


Figura 11. Número de duplicados en las secuencias de E109 por el método WGS

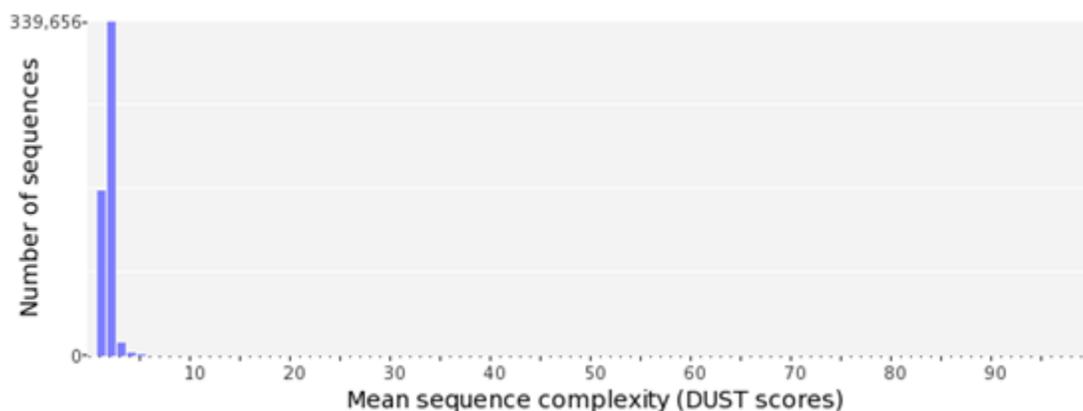


Figura 12. Promedio de la complejidad de la secuencias (Puntaje DUST) de E109 por el método WGS

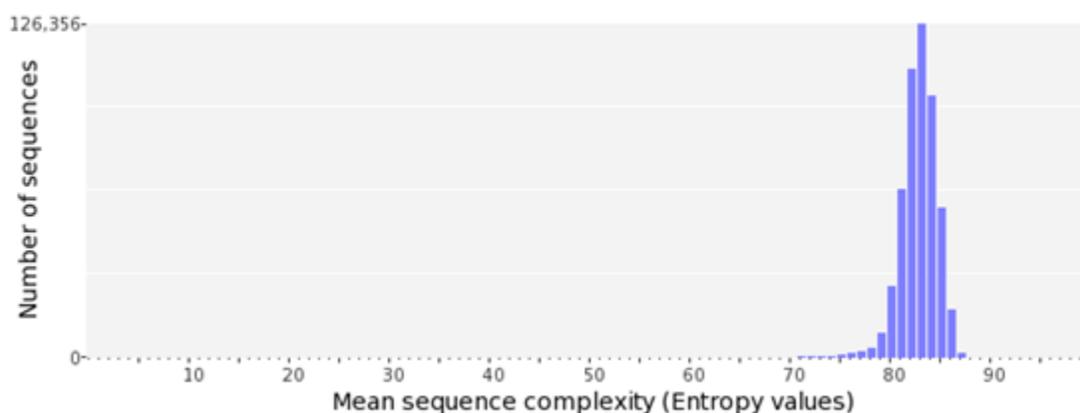


Figura 13. Promedio de la complejidad de la secuencias (Valor de Entropía) de E109 por el método WGS

Tabla 8. Información de los dinucleótidos odds ratio en las secuencias en la cepa E109 por el método WGS

| Dinucleótidos Odds Ratio | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|--------------|--------------|--------------|-----------|--------------|--------------|-----------|--------------|-----------|-----------|
| | AA/TT | AC/GT | AG/CT | AT | CA/TG | CC/GG | CG | GA/TC | GC | TA |
| Odds ratio | 10.213 | 0.9238 | 0.8696 | 13.499 | 0.9793 | 0.7726 | 13.104 | 12.371 | 11.325 | 0.6092 |

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

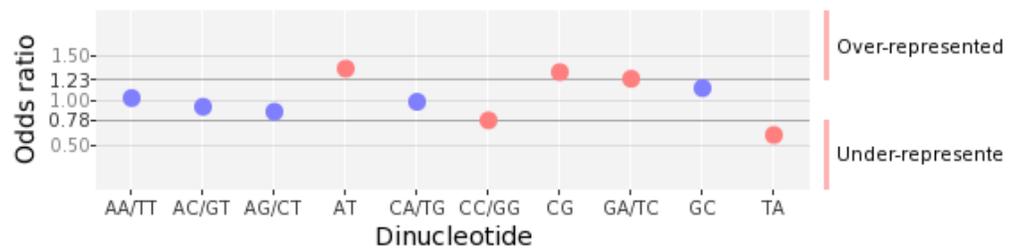


Figura 14. Valor de odds ratio en los dinucleótidos de E109 por el método WGS

Anexo 3. Métricas de la secuenciación del genoma de *B. japonicum* E109 mediante paired-end a partir del software PRINSEQ.

Las tablas y figuras que se muestran a continuación, es información proporcionada por INDEAR.

Tabla 1. Información de entrada de la cepa E109 al software PRINSEQ por el método paired-end

| Información de entrada | |
|------------------------|--|
| Archivo de entrada | bradyrhizobium_japonicum_E109.reads.pe.fastq |
| Formato de entrada | FASTQ |
| # Secuencias | 129,306 |
| Bases totales | 33,976,975 |

Tabla 2. Información de la distribución de longitud de las secuencias de la cepa E109 por el método paired-end

| Distribución de Longitud | |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Promedio longitud de la secuencia | 262.76 ± 162.09 pb |
| Longitud Mínima | 4 pb |
| Longitud Máxima | 1,200 pb |
| Rango de longitud | 1,197 pb |
| Modalidad de longitud | 17 pb con 1,781 secuencias |

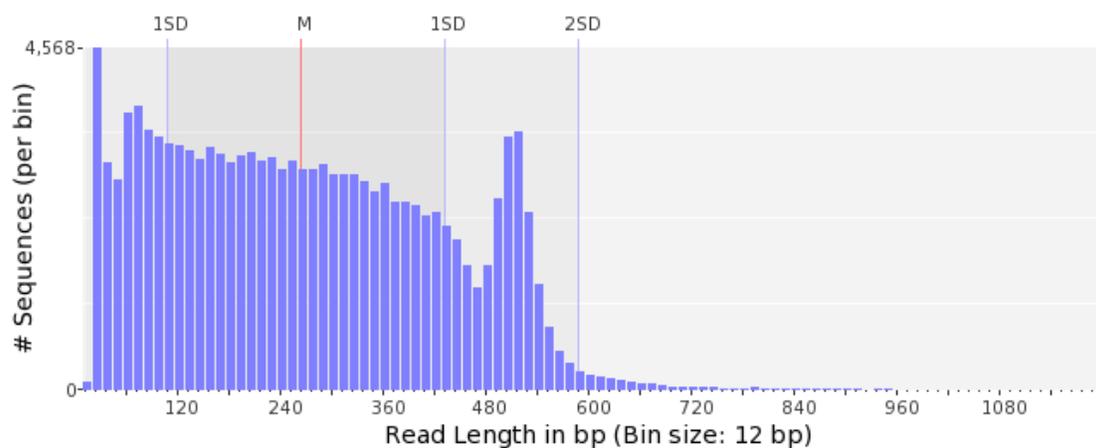


Figura 1. Longitud de los reads de las secuencias de E109 por el método paired-end

Tabla 3. Información de la distribución del contenido GC de la cepa E109 por el método paired-end

| Distribución del contenido GC | |
|--------------------------------------|---------------------------|
| Promedio de contenido GC | 58.14 ± 6.42 % |
| Mínimo contenido GC | 15% |
| Máximo contenido GC | 88% |
| Rango contenido GC | 74% |
| Modalidad contenido GC | 60 % con 9,765 secuencias |

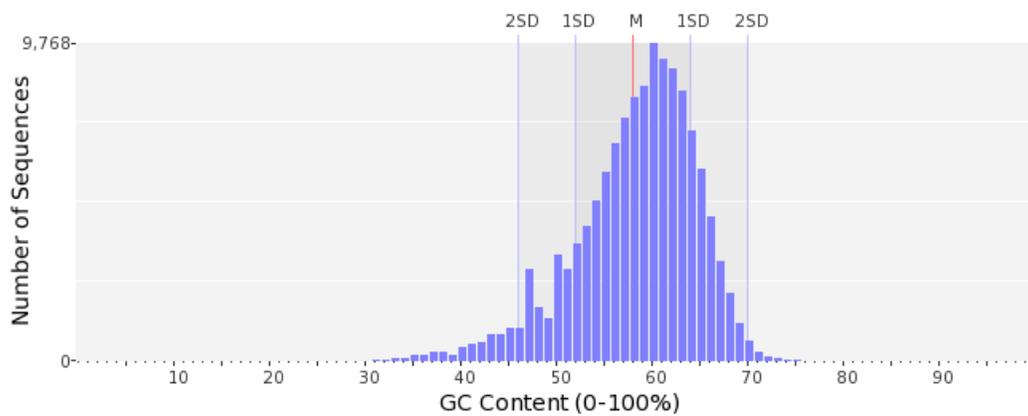


Figura 2. Contenido GC de las secuencias de E109 por el método paired-end

Base Quality Distribution



Figura 3. Distribución de la calidad de las bases de las secuencias de E109 por el método paired-end

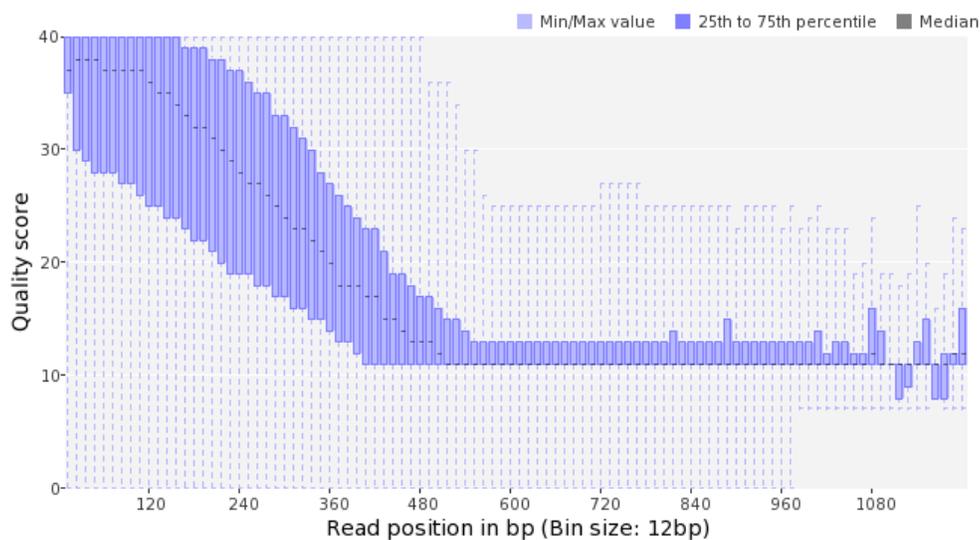


Figura 4. Distribución de la calidad de los reads de las secuencias de E109 por el método paired-end

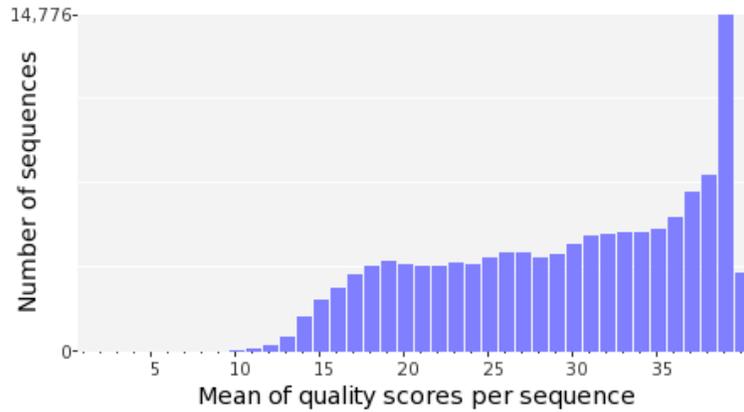


Figura 5. Promedio del puntaje de calidad por secuencia de E109 por el método paired-end

Tabla 4. Información de la ocurrencia de N de la cepa E109 por el método paired-end

| Ocurrencia de N | |
|--|------------------|
| Secuencias con N | 55,429 (42.87 %) |
| Porcentaje máx. de Ns por secuencia | 76% |

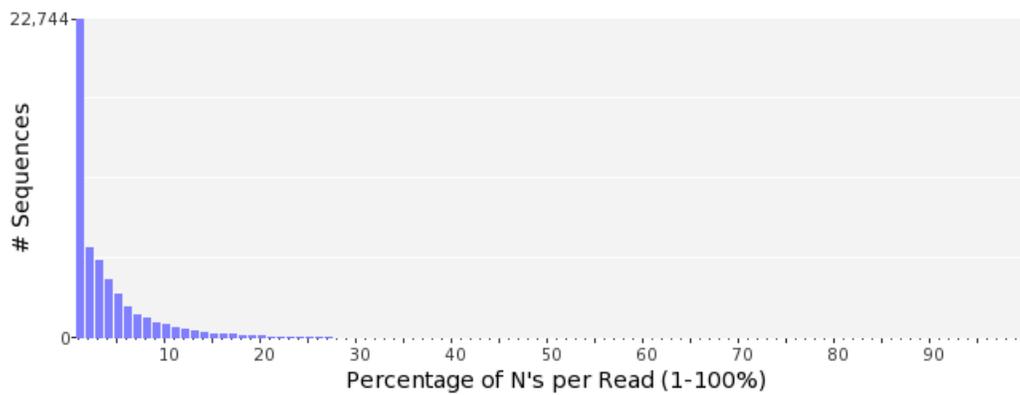


Figura 6. Porcentaje de N por reads de las secuencias de E109 por el método paired-end

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

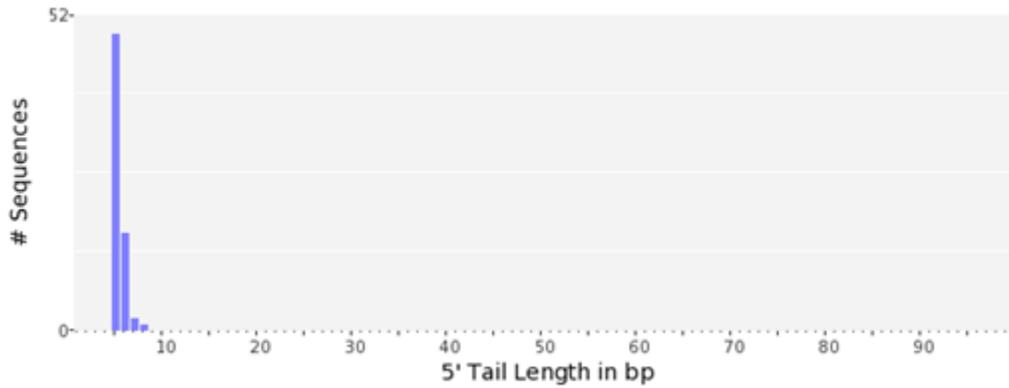


Figura 7. Longitud de la cola 5' en las secuencias de E109 por el método paired-end

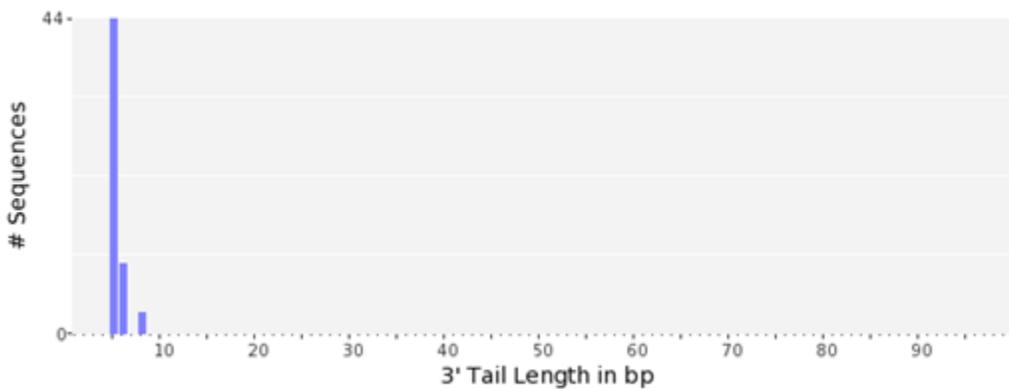


Figura 8. Longitud de la cola 3' en las secuencias de E109 por el método paired-end

Tabla 5. Información de la verificación de la secuencia Tag en la cepa E109 por el método paired-end

| Verificación de la secuencia Tag | | |
|----------------------------------|-------------|-------------|
| | 5' terminal | 3' terminal |
| Probabilidad de Tag | 58% | 1% |
| GSMIDs o RLMIDs | ACACGTAGTAT | |

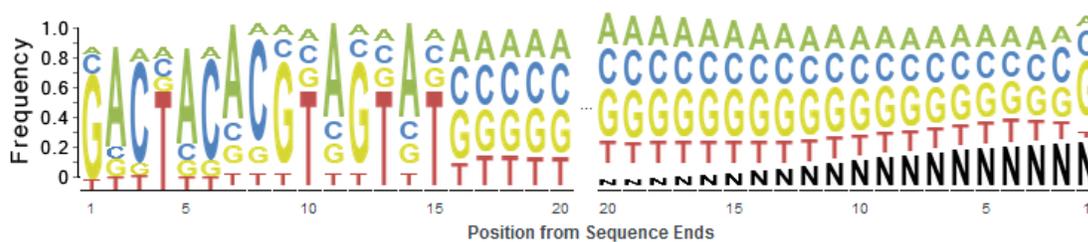


Figura 8. Frecuencias de los nucleótidos en las secuencias terminales en E109 por el método paired-end

Tabla 6. Información de las secuencias duplicadas en la cepa E109 por el método paired-end

| Secuencias | | |
|---|----------------|-----------------|
| | # Secuencias | Duplicados máx. |
| Duplicados exactos | 3,836 (2.97 %) | 946 |
| Duplicados exactos con complementos reversos | 0 | 0 |
| Duplicados 5' | 1,992 (1.54 %) | 8 |
| Duplicados 3' | 352 (0.27 %) | 4 |
| Duplicados con complementos reversos 5'/3' | 14 (0.01 %) | 1 |
| Total | 6,194 (4.79 %) | - |

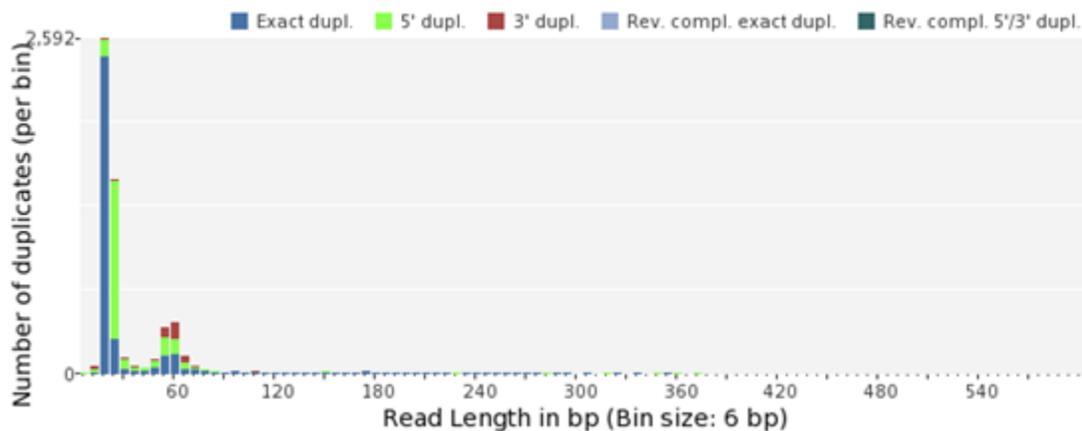


Figura 9. Número de duplicados en la longitud de los reads en las secuencias de E109 por el método paired-end

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

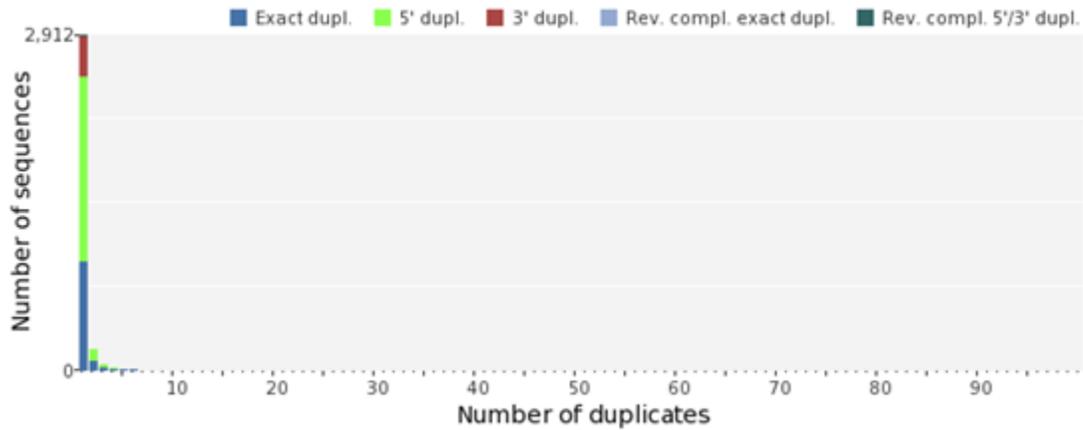


Figura 10. Número de secuencias en los duplicados de E109 por el método paired-end

Tabla 7. Información de la complejidad de las secuencias en la cepa E109 por el método paired-end

| Complejidad de la secuencia | | |
|---------------------------------|-------|-----------------------------|
| | Valor | Secuencia |
| Puntaje DUST mínimo | 0 | GACTACACGTAGTATGCGAACGGTCTC |
| Puntaje DUST máximo | 100 | CGTA |
| Valor de entropía mínimo | 0 | CGTA |
| Valor de entropía máximo | 100 | AGACCCTCGAAATAGCCACGCA |

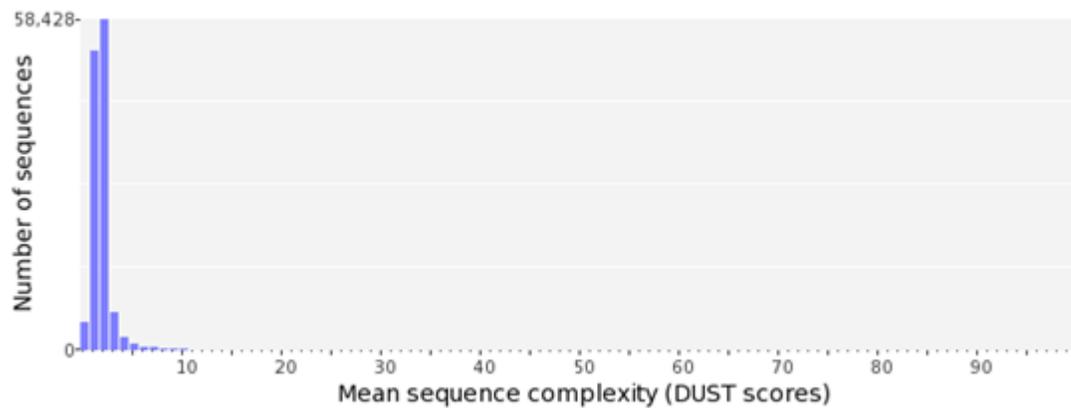


Figura 12. Promedio de la complejidad de la secuencias (Puntaje DUST) de E109 por el método paired-end

Análisis genómico y funcional de los mecanismos de promoción del crecimiento en *B. japonicum* E109, la cepa más utilizada para la formulación de inoculantes para soja en la República Argentina

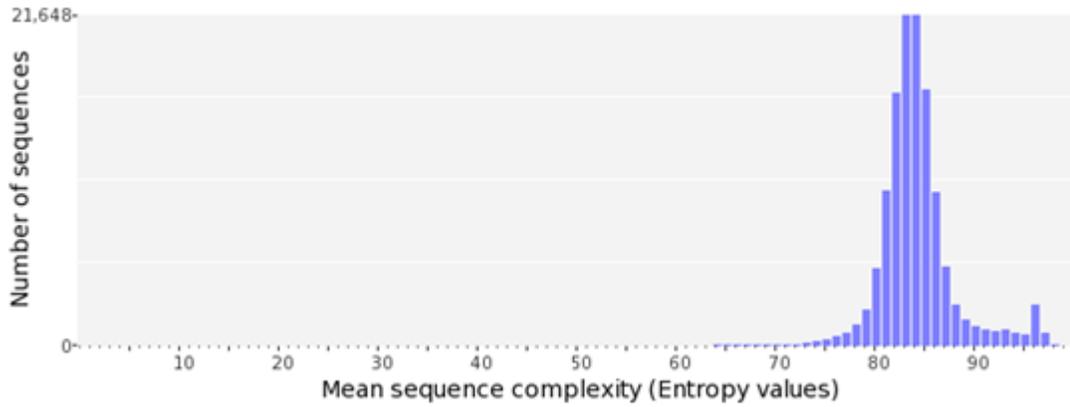


Figura 13. Promedio de la complejidad de la secuencias (Valor de Entropía) de E109 por el método paired-end

Tabla 8. Información de los dinucleótidos odds ratio en las secuencias en la cepa E109 por el método paired-end

| Dinucleótidos Odds Ratio | | | | | | | | | | |
|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | AA/TT | AC/GT | AG/CT | AT | CA/TG | CC/GG | CG | GA/TC | GC | TA |
| Odds ratio | 0.8706 | 10.548 | 0.9277 | 12.489 | 0.9663 | 0.7776 | 12.622 | 11.548 | 10.419 | 0.9431 |

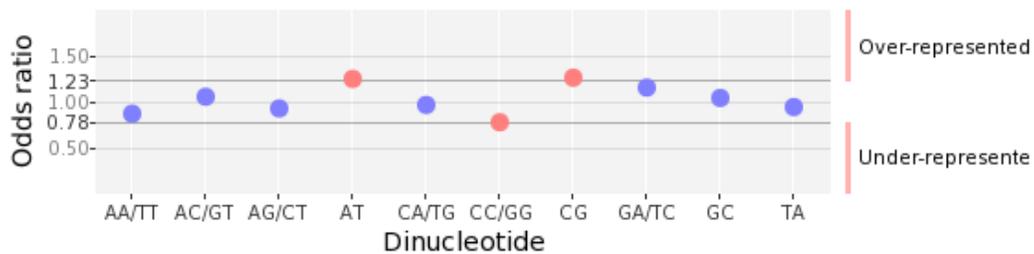


Figura 14. Valor de odds ratio en los dinucleótidos de E109 por el método paired-end