

Universidad Nacional de La Plata

Facultad de Ciencias Exactas

Dpto. de Ciencias Biológicas



**“Análisis de las alteraciones estructurales y/o**

**regulatorias en los genes de nodulación y fijación de**

**nitrógeno, en aislados de *Bradyrhizobium japonicum* que difieren en su capacidad para fijar nitrógeno.”**

Tesis Doctoral – 2015

Lic. Silvina M. Y. Lopez

Director: Ph.D. Pedro A. Balatti

Instituto de Fisiología Vegetal

INFIVE – UNLP - CONICET



*El presente Trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales UNLP- CCT- La Plata-CONICET bajo la dirección del Ph. D. Pedro Alberto Balatti.*

A mis padres, *Yamil* y *Daniel*

A mis abuelos

A mis hermanos, *Lupita*, *Andrés* y *Marieta*

Y a ella, mi sobrina, mi dulce *Francisca*,

Mis pilares en la vida.

***Mi reconocimiento...***

A la Facultad Nacional de La Plata por formarme desde hace 15 años cuando comencé mis estudios de grado.

Al Instituto de Fisiología Vegetal (INFIVE) y a la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, por haberme brindado el lugar y los equipos para desarrollar este trabajo.

Al consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación a la investigación; como así también a la Jefatura de Gabinete de Ministros de la Nación por la beca correspondiente al programa Bec.Ar que me permitió la realización de una estadía de investigación en España.

Al Departamento de Ecología Genética de la Rizósfera, de la Estación Experimental del Zaidín (EEZ) - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada, España, donde pude realizar experimentos del presente trabajo.

Al Laboratorio de Mecanismos moleculares de fertilización en plantas del Instituto de Investigación en Ingeniería Genética y Biología Experimental (INGEBI) – CONICET por su colaboración en la realización de los ensayos proteómicos de esta tesis.

Al Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría MALDI-TOF del Departamento de Química Biológica (Cequibiem) – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA, por su colaboración en la realización de los ensayos proteómicos de esta tesis.

***Mis agradecimientos...***

Al Profesor Ph. D. Pedro Balatti, por dirigir mi trabajo, por su confianza, enseñanza y estímulo. Por su apoyo y la posibilidad de crecer profesionalmente más allá de la realización de la tesis doctoral.

Al Profesor Dr. Aníbal Lodeiro por haber aceptado ser mi asesor académico de tesis y su buena predisposición para desarrollar esta tarea.

Al profesor Dr. Nicolás Toro García por abrirme las puertas de sus laboratorios y colaborar en todo para que mi estadía sea fructífera y agradable. A todos los integrantes de sus laboratorios por su compañerismo y predisposición.

Al Profesor Dr. Mario Saparrat por su compañerismo, por compartir sus conocimientos de a montones y su incansable insistencia por hacer de mí una micóloga (persevera y triunfarás, jajaja) y por enseñarme entre otras muchas cosas el secreto de la ciencia en una sola palabra... “paciencia”: “paz” y “ciencia”.

A Grace, mi compañera transitando la rizobiología, por tantas charlas científicas y de las otras entre recuentos y mediciones, por su aporte en nuestra improvisación de protocolos.

A Rocio y Ernest, mis compañeros de ciencia, de profesión y amigos, por trabajar juntos, por aprender juntos, por las peleas científicas de días feriados de trabajo y por las cervezas de después.

A Lola y Rafa por tantas qPCR y Southern, Alpujarra y playas, tapas y cañas, por el nutrido intercambio de vocabulario y en resumen por aguantar a la “argentina molesta” y hacer de mi estadía una experiencia que quiero repetir.

A todos los integrantes del Lab C, a los que están y a los que se fueron, por compartir estos años de experimentos y charlas.

A mi familia por su apoyo incondicional y acompañarme a pesar de las distancias.

***A todos, ¡Gracias!***

## Resumen

La fijación biológica de nitrógeno (N) que consiste en la reducción de N<sub>2</sub> atmosférico a NH<sub>3</sub> realizada por algunos organismos procariotas, constituye el mayor aporte de nitrógeno a la biosfera. Entre estos organismos, los que fijan el nitrógeno asociándose simbióticamente con las plantas de la familia de las leguminosas son los que realizan el mayor aporte. Las interacciones bacteria-planta conducen a la formación de nódulos como parte de un proceso complejo, de numerosos intercambios de señales entre los simbioses.

La superficie cultivada con soja en la Argentina es de alrededor de 19 millones de hectáreas, esto y el valor de su producción lo convierten en el cultivo más importante del país. La soja es exótica en Argentina y América del Sur y por ello el 90 % de la superficie se inocula con bacterias del género *Bradyrhizobium* en el momento de la siembra. La incorporación de bacterias simbioses de la soja durante muchos años hizo que las poblaciones de las mismas se naturalizaran en los suelos. Estas bacterias alóctonas pertenecen al género *Bradyrhizobium* e inducen la formación de nódulos en soja. En general estos rizobios alóctonos o naturalizados no son eficientes fijadores de nitrógeno en relación a las cepas seleccionadas para la formulación de inoculantes comerciales. La explicación es que si bien derivan de cepas eficientes, cuando se establecen en los suelos, sufren cambios genéticos que contribuyen a su sobrevivencia en el medio ambiente; si bien esto conduce a una mejora en su capacidad competitiva, habitualmente estas se ven alteradas negativamente en su capacidad de fijación de nitrógeno. En este sentido, uno de los problemas del uso de cepas fijadoras de N seleccionadas es que no suelen ser tan competitivas como las poblaciones naturalizadas en los suelos.

El género *Bradyrhizobium* fue descrito en 1982 y dentro de este género la especie *B. japonicum* es el simbiote por excelencia de la soja. El genoma de *B. japonicum* contiene un alto número de secuencias repetitivas entre las que se han descrito RS $\alpha$  y RS $\beta$ . En *B. japonicum* y probablemente en el resto de las especies, estas secuencias se concentran en los fragmentos de ADN que contienen gran parte de los genes que codifican las enzimas de fijación de N (genes *nif* y *fix*). Estas secuencias repetitivas poseen características estructurales de los elementos de inserción de los procariotas y fueron asociadas con mecanismos de recombinación de los genomas. Esto y el hecho de que en la naturaleza es frecuente la aparición de mutantes espontáneos que difieren en su capacidad para fijar N, sugiere que los mutantes naturales probablemente se generan por rearrreglos del genoma que ocurren particularmente en la isla simbiótica, en los que

las regiones repetitivas podrían jugar un rol clave. Esto podría explicar los cambios en la capacidad de fijación que suele caracterizar a los mutantes naturales.

El objetivo de este trabajo se focalizó en analizar las diferencias genéticas presentes en los fragmentos del genoma en donde se concentran gran parte de los genes de nodulación y fijación de N en 12 cepas de *Bradyrhizobium*. Estas fueron aisladas de suelos bajo diversos sistemas de manejo y se seleccionaron en base a su capacidad diferencial de fijación de N. Se propuso además realizar una caracterización fisiológica de los aislados y establecer en base a diversos marcadores moleculares, la relación que existe entre los rizobios aislados con los que se han utilizado en formulaciones comerciales de inoculantes. Además se analizó la expresión de genes clave de los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno.

Los estudios confirmaron que las cepas naturalizadas en los suelos difieren de los fenotipos de las cepas de origen que fueron *B. japonicum* y *B. elkanii*. La colección de los aislados estudiados provino exclusivamente de las cepas utilizadas en inoculantes comerciales (*B. japonicum* y *B. elkanii*) y si bien se encontró que son cepas estrechamente relacionadas, el análisis de las regiones repetitivas del genoma (Southern blot) demostró diversidad genética. Un grupo de estos aislados de *B. japonicum* que fijan nitrógeno con mayor eficiencia presentaron adaptaciones que podrían beneficiar su vida saprofítica; entre las que se destacaron una mayor supervivencia sobre semilla, mayor tolerancia al glifosato; mayor síntesis de exopolisacáridos e inducción de la formación de biopelículas por exudados de semillas de soja. El análisis más detallado de la isla simbiótica no mostró diferencias entre los aislados y la cepa E109 (comercial), excepto la secuencia del gen *nopP* que fue diferente en los aislados 2112 y 366. Al comparar los perfiles de expresión de genes de fijación de nitrógeno entre el aislado 366 y la cepa E109, se detectaron diferencias en la expresión de alguno de ellos, que no estuvieron asociadas a ningún fenotipo en particular.

Estudios proteómicos de las proteínas secretadas en la interacción simbiótica bradyrizobio-soja que establecen E109 y 366, mostraron diferentes perfiles de expresión en las cepas, que además no respondieron a la presencia de exudados de semillas en el medio de cultivo. Las diferencias entre las dos cepas se centraron en la expresión de proteínas relacionadas con la motilidad bacteriana.

Se concluyó que los fenotipos de fijación de N en los aislados no estuvieron vinculados a rearrreglos ocasionados por regiones repetitivas en la isla simbiótica, si bien

estos ocurrieron en otras regiones del genoma. La supervivencia, infectividad, producción de exopolisacáridos, formación de biofilm y agregados bacterianos y la motilidad, son características de las cepas alóctonas que probablemente contribuyen a su adaptación en el suelo. En las cepas naturalizadas son frecuentes los cambios vinculados a los mecanismos que modifican la motilidad de los mismos en el suelo. Es claro que la motilidad de los rizobios es un elemento clave que influye en las características competitivas de las bacterias. El estudio en profundidad de cada una de las características diferenciales entre los aislados que se naturalizan y la implicancia de estas en el resultados final del proceso de nodulación y fijación biológica de nitrógeno, pueden contribuir a una selección de cepas que mejoren la eficiencia de la relación simbiótica entre el inoculante y la planta de soja.

## Abstract

Biological Nitrogen fixation is the ability of several prokaryotic organisms to reduce atmospheric  $N_2$  to  $NH_3$ , a process that constitutes the major input of N to the biosphere. Among these organisms, those that fix nitrogen symbiotically in association with legumes, plants of the family leguminosae (Fabaceae) are those that contribute the most to biological nitrogen fixation. The bacteria—plant interaction led to the development of nodules, which is the outcome of a complex process, where many signal exchanges occur between the symbiotic organisms.

In Argentina approximately 19 million hectares are cultivated with soybean, which is the most important crop based on both the area cultivated and the economic revenue. Soybean is an exotic crop in Argentina and South America and because of this, 90 % of the planted area is inoculated at seeding with bacteria of the genus *Bradyrhizobium*. These populations of rhizobia that were introduced in the soils, they adapted and naturalized in such new environments. These allochthonous bacteria belong to the genus *Bradyrhizobium* that contain rhizobia that nodulate soybean. Frequently, these allochthonous populations are not efficient nitrogen fixers compared to those strains selected to formulate commercial inoculants. A possible explanation is that even though naturalized populations are derived from selected strains, during the process of adaptation, genetic changes occur that mostly affect the survival ability of the isolates. While these changes improve their competitive ability, most often their nitrogen fixation capacity is impaired, and therefore they fix less nitrogen. Regarding this, one of the main problems of inoculation is that the introduced strains, selected based on their nitrogen fixation capacity, are not as competitive as native rhizobia.

The genus *Bradyrhizobium* was described in 1982, and *B. japonicum* has been considered, until recently as the main and only symbiont of soybean. The genome of *B. japonicum* has a high number of repetitive sequences such as  $RS\alpha$  y  $RS\beta$ . In *B. japonicum* and probably, within the other species of the genus, these sequences are located in the DNA fragments that contain the genes that code for the enzymes of nitrogen fixation (*nif* y *fix*). These repetitive sequences have structural characteristics similar to those of insertion elements (IS) of prokaryotes and have been associated with mechanisms of recombination. This and the fact that in nature they appear of natural mutants that differ in their ability to fix nitrogen occurs quite often, suggest that natural mutants are probably the result of rearrangements that occur mainly in the symbiotic island, indicating the key

role that repetitive sequences might be playing. This might explain the changes in the nitrogen fixation ability that often characterizes natural mutants.

The purpose of this work was to analyze, within 12 strains of *Bradyrhizobium*, the genetic differences in genome fragments that contain most of the nodulation and nitrogen fixation genes. The isolates were collected from soil under different management systems, such as conventional and zero tillage and were selected based on their ability to fix N. The isolates were characterized based on their physiological characteristics and molecular markers. In addition, also the relationship of the isolates with the potential parental strains that are used in commercial inoculants was analyzed. Also the expression of nodulation and nitrogen fixation genes was studied by means of real time PCR and proteomics.

These studies confirmed that strains naturalized in soils differ from the phenotypes of strains parenterals of *B. japonicum* and *B. elkanii*. Even though the isolates were closely related, the analysis of the genome, by means of the repetitive sequences (southern blot) demonstrated that they are genetically diverse. A group of *B. japonicum* isolates that fix nitrogen more efficiently developed phenotypic adaptations that most probably favor their saprophytic ability. A more detailed analysis of the symbiotic island of the isolates and parental strain E109 showed that they were substantially similar. Only the sequence of *nopP* was different in isolates 2112 y 366. The comparison of the profiles of genes of nitrogen fixation or related to the activity in isolate 366 and parental strain E109, showed that there are some differences in the expression pattern that were not associated to a particular phenotype. Furthermore, proteomic studies of the secreted proteins of the *Bradyrhizobium*-soybean symbiotic interaction established by isolates E109 y 366, showed that they presented a different profile. Additionally did not respond to the presence of exudates of seed in the culture medium. The differences observed between isolates 366 and E109 occurred within genes related to bacterial motility.

It was concluded that the nitrogen fixation phenotype of the isolates was not related with rearrangements provoked by repetitive sequences within the symbiotic island, although they occurred in the genome. Survival, infectivity, exopolisaccharides production, biofilm development, bacterial aggregation and motility are the characteristics of the allochthonous isolates that most probably contributed to the adaptation of bacteria to the soil. In naturalized isolates, the changes were related to mechanisms that alter motility of bacteria in the soil. This is particularly interesting considering the role that the motility of rhizobia play in competitiveness of bacteria. A thorough study of the differential characteristics between naturalized isolates and their

impact on the nodulation and nitrogen fixation process, might contribute to perform strain selection under environments that might lead to the isolation of organisms improved in their ability to symbiotically interact with the plant.

## Índice

Capítulo 1: Introducción General.....	30
Capítulo 1: Introducción.....	31
El Nitrógeno en la producción agrícola .....	31
El Nitrógeno simbiótico .....	33
Las leguminosas - soja .....	34
La fijación simbiótica rizobio-leguminosas .....	36
Los simbioses de la soja .....	37
<i>Bradyrhizobium</i> .....	38
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> .....	39
Proceso de nodulación .....	40
Atracción de los rizobios y quimiotaxis .....	41
Adhesión de la bacteria al pelo radicular.....	42
Reconocimiento específico – Flavonoides y Factores Nod.....	43
Sistema de secreción tipo III (SSTT).....	44
Invasión de la raíz y Organogénesis del nódulo – Infección bacteriana.....	46
Fijación simbiótica de nitrógeno.....	50
Regulación de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno.....	51
Nodulación.....	51
Fijación .....	54
Genes relevantes de la simbiosis .....	56
Hipótesis y Objetivos:.....	59
Hipótesis principal: .....	59
Objetivo general: .....	59
Hipótesis derivadas: .....	59

Objetivos específicos: .....	60
Capítulo 2: Caracterización fenotípica y simbiótica de aislados naturalizados.....	61
Introducción .....	62
Hipótesis del capítulo .....	68
Objetivo del capítulo .....	68
Materiales y métodos del capítulo .....	69
1. Especies y cepas bacterianas.....	69
2. Cultivares de soja .....	69
3. Cultivos bacterianos .....	70
3.1. Medios de cultivo .....	70
3.2. Antibióticos .....	71
3.3. Condiciones de cultivo .....	71
3.4. Conservación de cultivos bacterianos .....	71
3.5. Resistencia a antibióticos, elevadas temperaturas y sales.....	71
4. Análisis de Exopolisacáridos (EPS) .....	72
5. Ensayo de formación de biofilm .....	73
6. Ensayo de autoagregación bacteriana .....	73
7. Inducción con exudados de semilla sobre Biofilm y Autoagregación. ....	74
Extracción de exudados semillas de soja (Isoflavonoides-IF).....	74
8. Supervivencia bacteriana.....	74
9. Capacidad de fijación de nitrógeno .....	75
10. Distribución de nódulos en la raíz.....	76
11. Infectividad y nodulación.....	76
12. Tolerancia al glifosato.....	77
12.1. Efecto del glifosato sobre la nodulación y fijación de N <sub>2</sub> . ....	78

13. Análisis estadísticos.....	78
Resultados del capítulo.....	79
Características fenotípicas .....	79
Resistencia a antibióticos, elevadas temperaturas y concentración de sal. ..	79
Producción de Exopolisacáridos (EPS) .....	80
Formación de biofilm.....	81
Porcentaje de autoagregación bacteriana.....	82
Inducción con IF: Autoagregación (AA) y formación de biofilm. ....	82
Supervivencia sobre semillas .....	84
Infectividad y Nodulación .....	85
Fenotipo simbiótico.....	87
Eficiencia de nodulación y fijación de nitrógeno.....	87
Distribución de nódulos en la raíz.....	91
Segundo ensayo de nodulación y fijación de nitrógeno. ....	92
Tolerancia al glifosato.....	96
Efecto sobre la nodulación y fijación de N <sub>2</sub> de la aplicación de glifosato ..	98
Discusión.....	103
Capítulo 3: Caracterización genotípica de aislados naturalizados .....	108
Introducción .....	109
Hipótesis del capítulo .....	116
Objetivo del capítulo .....	116
Materiales y métodos .....	117
1. Cepas bacterianas y cultivos.....	117
2. Aislamiento de ADN de <i>Bradyrhizobium</i> . ....	117
2.1. Lisado de colonias .....	117

3.	Manipulación y amplificación de ADN.....	117
3.1.	Digestión con enzimas de restricción .....	117
3.2.	PCR .....	118
3.3.	Multiplex .....	118
3.4.	PCR de colonia .....	119
3.5.	RFLP de genes <i>nifDK</i> y <i>nifH</i> .....	119
4.	Oligonucleótidos.....	120
5.	Electroforesis.....	121
5.1.	Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizantes. ....	121
5.2.	Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.....	121
5.3.	Marcadores de peso molecular .....	121
6.	Análisis bioinformático.....	122
7.	Secuenciación y análisis de secuencias.....	122
8.	Técnica de hibridación de ácidos nucleicos.....	123
8.1.	Hibridación ADN-ADN (Southern Blot).....	123
8.1.1.	Transferencia alcalina por vacío .....	123
8.1.2.	Marcaje de la sonda .....	124
8.1.3.	Hibridación, lavados y revelado.....	124
	Resultados .....	126
	Cepas control.....	126
	Análisis de los fingerprints del total de aislados.....	127
	Multiplex .....	127
	“Fingerprints”- Huella digital .....	127
	Estudio de los genes codificantes de la enzima Nitrogenasa .....	134
	Amplificación y restricción de la secuencia parcial del gen <i>nifD</i> .....	134

Amplificación y restricción de la secuencia del gen <i>nifK</i> .....	136
Amplificación y restricción de la secuencia parcial del gen <i>nifH</i> .....	136
RFLP con sondas marcadas de RS $\alpha$ y RS $\beta$ .....	137
ITS.....	141
Discusión.....	143
Capítulo 4: Análisis estructural de la isla simbiótica. ....	148
Introducción .....	149
Islas genómicas e isla simbiótica.....	150
Hipótesis del capítulo .....	154
Objetivo del capítulo .....	154
Materiales y métodos .....	155
1. Cultivo de cepas .....	155
2. Aislamiento de ADN.....	155
3. Oligonucleótidos.....	155
4.1. Amplificación por PCR y purificación de amplicones.....	156
4.2. Digestión con enzimas de restricción .....	156
4.3. Electroforesis .....	156
5. Análisis por RFLP de grandes fragmentos de la isla simbiótica .....	157
6. Amplificación, restricción y secuenciado del gen <i>nopP</i> .....	158
Resultados .....	159
Análisis estructural de la región simbiótica.....	159
Amplificación, restricción y secuenciado del gen <i>nopP</i> .....	169
Secuenciación del gen <i>nopP</i> ( <i>blr1752</i> ) .....	170
Discusión.....	172
Capítulo 5: Estudio de la expresión de genes simbióticos. ....	175

Introducción .....	176
Hipótesis del capítulo .....	180
Objetivo del capítulo .....	180
Materiales y métodos .....	181
1. Oligonucleótidos.....	181
2. Cepas y condiciones de cultivo.....	181
3. Extracción de ARN total.....	182
3.1. Extracción de ARN total de <i>B. japonicum</i> .....	182
3.2. Extracción de ARN total mediante kit comercial .....	183
3.3. Cuantificación de ADN y ARN .....	184
4. RT-qPCR.....	184
4.1. Síntesis de cADN. ....	185
4.2. qPCR .....	185
5. Electroforesis.....	186
5.1. Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.....	186
6. Extracción de proteínas extracelulares .....	186
7. Ensayo de deformación de pelos radiculares.....	187
8. Geles 2D SDS-PAGE.....	187
9. Identificación de los polipéptidos: digestión trípica y MALDI TOF .....	188
10. Ensayos de motilidad – Swarming.....	188
Resultados .....	190
Expresión génica - Extracción de ARN .....	190
Fase estacionaria y exponencial de crecimiento .....	190
Nódulo .....	193
Cultivos inducidos con exudados de semilla.....	196

Cultivos inducidos con genisteína pura.....	197
Extracción de proteínas extracelulares (PEC) .....	199
Ensayo de enrulamiento de pelos radiculares.....	200
Proteínas extracelulares – Geles 2D .....	201
Identificación de los polipéptidos mediante digestión trípica y MALDI TOF	206
Ensayos de motilidad – Swarming .....	207
Discusión.....	209
Capítulo 6: Discusión general y Perspectivas. ....	217
Bibliografía .....	224

**Índice de figuras del capítulo 1:**

Figural-1: Ciclo del nitrógeno: La fijación de nitrógeno, nitrificación, reducción de nitratos y la desnitrificación son los componentes de este ciclo esencial, que convierte el nitrógeno gaseoso atmosférico en iones amonio y nitratos (formas aprovechables por las plantas), y el retorno del N <sub>2</sub> a la atmósfera.....	32
Figural-2: Este gráfico presenta la producción de los 20 productos alimentarios y agrícolas más importantes (clasificados según su valor) en Argentina en el año indicado. Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura ( <a href="http://faostat3.fao.org/home/S">http://faostat3.fao.org/home/S</a> ).....	35
Figura 1-3: (a-b): Esquema del proceso de infección y formación del nódulo. La planta exuda compuestos flavonoides en la rizósfera que desencadenan la producción de factores Nod en la bacteria. Los factores Nod percibidos por la planta desencadenan respuestas como el enrollado del pelo radicular y la invasión de pelo por la bacteria. En la invasión también son requeridos los exopolisacáridos bacterianos y la producción de especies reactivas de oxígeno de la planta. Los factores Nod inducen la división celular mitótica en la corteza de la raíz (representado en azul), lo que conduce a la formación del meristema nodular (Zona I). En el gráfico también se marcan en el nódulo una zona de invasión (Zona II) y una zona de fijación de N (Zona III). La Zona IV corresponde a la zona de senescencia. Fuente: Gibson et al., 2008.....	41
Figura 1- 4: (c-d): c- La bacteria ingresa en el pelo radicular a través del hilo infectivo (IT) que se elonga hacia el meristema nodular; (n)-núcleo, (v)-vacuola. d – en el extremo de elongación del IT, las bacterias son endocitadas dentro del citoplasma de la célula vegetal. Cada bacteria es rodeada por la membrana peribacterioida y ocurre la diferenciación a bacteroide. Los bacteroides establecen una infección crónica en el citoplasma, y enzimáticamente reduce el N <sub>2</sub> para proveer a la planta de una fuente de nitrógeno asimilable (Zona III). Fuente: Gibson et al., 2008.....	42
Figura 1-5: Señalización. Las señales de la planta, flavonoides, son reconocidas por la proteína reguladora NodD de la bacteria, que induce la expresión de los genes de nodulación. NodD modula a su vez la expresión del sistema de dos componentes regulatorios NodV/W. Fuente: Masson-Boivin et al., 2009.....	47
Figura 1- 6: Esquema del desarrollo de nódulos determinados e indeterminados. El desarrollo se esquematiza desde el inicio del intercambio de señales entre los simbiositos, progresando a la formación del hilo infectivo hasta llegar al primordio nodular, donde las bacterias son liberadas en un simbiosoma que se diferencia al estadio de bacteroide donde podrá fijar N. Fuente: Ferguson et al., 2010 modificado.....	49
Figura 1-7: Ilustración del modelo de regulación de genes <i>nod</i> en <i>B. japonicum</i> y sus componentes. Los genes <i>nod</i> son activados por NodD1 y NodVW, en respuesta a la genisteína y esto resulta en la síntesis de la señal Nod. La regulación negativa de los genes <i>nod</i> es mediada por NolA y NoD2. NolA regula a NodD2, que luego reprime la expresión de genes <i>nod</i> . Fuente Loh & Stacey, 2003. ....	52

Figura 1-8: Esquema regulatorio del operon *fixR-nifA* de *B. japonicum*. Las flechas rojas simbolizan los genes y las flechas de puntos representan su transcripción. Las flechas negras muestran la regulación con círculos que contienen (+) o (-) que indican la regulación positiva o negativa, respectivamente Fuente: Terpolilli et al, 2012..... 56

### Índice de figuras del capítulo 2:

Figura 2-1: Producción de EPS expresada en partes por millón de glucosa producida por unidad de DO de cultivo.....	80
Figura 2-2: Producción de EPS expresada en partes por millón de glucosa producida por unidad de DO de cultivo de los aislados crecidos en medio mínimo. ....	80
Figura 2-3: Formación de biofilm sobre la superficie de una placa, expresada como la relación $DO_{560\text{ nm}}/DO_{630\text{ nm}}$ . ....	81
Figura 2-4: porcentaje de autoagregación de las cepas en cultivos estáticos.....	82
Figura 2-5: Efecto de la inducción con exudados radiculares sobre la formación de biofilm. ....	83
Figura 2-6: Efecto de la inducción con exudados radiculares sobre la autoagregación. ....	83
Figura 2-7: Supervivencia bacteriana sobre la superficie de la semilla a las 144 hs de almacenamiento, expresada como factor de recuperación porcentual. ....	84
Figura 2-8: Supervivencia bacteriana sobre la superficie de la semilla a las 348 hs de almacenamiento, expresada como factor de recuperación porcentual. ....	85
Figura 2- 9: Recuento de número de nódulos. Las semillas de soja inoculadas se almacenaron por un período de 144 hs previo a la siembra. ....	86
Figura 2- 10: Recuento de número de nódulos. Las semillas de soja inoculadas se almacenaron por un período de 348 hs previo a la siembra. ....	86
Figura 2-11: Número de nódulos promedio por planta inoculada. ....	87
Figura 2-12: Peso seco de nódulos (mg). ....	88
Figura 2-13: Estimación del peso promedio por nódulo. ....	88
Figura 2-14: Determinación de la actividad nitrogenasa expresada en nmol de Etileno/PSN(mg).H.....	89
Figura 2-15: Evaluación del peso seco aéreo del ensayo de fijación de nitrógeno.....	90

Figura 2-16: Correlación entre PSN (mg) y PSA (mg), $p < 0,0001$ - $r: 0,67$ .....	90
Figura 2-17: Distribución de nódulos en la raíz primaria. Número de nódulos por planta ubicados en la raíz primaria. ....	91
Figura 2-18: Distribución de nódulos en raíces secundarias. Número de nódulos por planta ubicados en raíces secundarias.....	92
Figura 2-19: Análisis de componentes principales. Agrupamiento de los aislados considerando las variables PSN, PSA, N° nódulos y la relación PSN/N° nódulos.....	93
Figura 2-20: Peso seco de nódulos (mg) promedio por planta.....	94
Figura 2-21: Peso promedio por nódulo (mg). ....	94
Figura 2-22: Peso seco aéreo por planta (mg).....	95
Figura 2-23: Análisis de coordenadas principales. Agrupamiento de los aislados en función de los parámetros PSA, PSN, N° de nódulos y la relación PSN/N° nódulos. ....	96
Figura 2-24: Medida de DO a 625 nm a los 3 días como estimación del crecimiento bacteriano en medio de cultivo suplementado con tres concentraciones diferentes de glifosato (0,114; 0,227 y 0,454 $\mu\text{M}$ ). ....	97
Figura 2-25: Medida de DO a 625 nm a los 7 días como estimación del crecimiento bacteriano en medio de cultivo suplementado con tres concentraciones diferentes de glifosato (0,114; 0,227 y 0,454 $\mu\text{M}$ ). ....	97
Figura 2-26: Peso seco aéreo de plantas sin inocular. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días). ....	98
Figura 2-27: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 115. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días). ....	99
Figura 2-28: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 2112. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días). ....	99
Figura 2-29: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa E109. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días). ....	100

Figura 2-30: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 665. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días)..... 100

Figura 2-31: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa SEMIA5080. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días)..... 101

Figura 2-32: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa SEMIA587. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días)..... 101

Figura 2-33: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 366. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días)..... 101

Figura 2-34: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 163. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días)..... 102

Figura 2-35: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 953. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días)..... 102

Figura 2-36: Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 9110. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días)..... 102

### **Índice de figuras del capítulo 3:**

Figura 3-1: Fingerprints de las cepas control generado con las secuencias BOX, REP y  $RS\alpha$ . Los perfiles fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene y normalizados considerando la posición de las bandas con respecto a las bandas de un marcador de peso molecular considerando un 1 % de tolerancia..... 126

Figura 3-2: Reacción multiplex  $RS\alpha$ -*noIB*. Los productos de reacción se resolvieron en gel de agarosa de 1 %. ..... 127

Figura 3-3: PCR BOX. Perfiles de bandas obtenidos por PCR con ADN de las cepas en estudio. Gel de agarosa de 2 %.	128
Figura 3-4: Dendrograma de los aislados de suelo y las cepas de <i>B. japonicum</i> (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y <i>B. elkanii</i> (SEMIA587 y SEMIA5019), basado en la huella digital de ADN con BOX AR1. Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 1 % de tolerancia.	129
Figura 3-5: Reacción REP-PCR. Perfiles de bandas obtenidos con primers REP para las cepas en estudio. Gel de agarosa de 1,5 %.	130
Figura 3-6: Dendrograma de los aislados de suelo y las cepas <i>B. japonicum</i> (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y <i>B. elkanii</i> (SEMIA587 y SEMIA5019), basado en la huella digital de ADN primers REP. Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 2 % de tolerancia.	131
Figura 3-7: Dendrograma construido con los patrones de amplificación de regiones repetitivas RS $\alpha$ . Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 2 % de tolerancia.	132
Figura 3-8: Dendrograma obtenido por la combinación de los fingerprints BOX, REP y RS $\alpha$ . Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 2 % de tolerancia.	133
Figura 3-9: Análisis de coordenadas principales, obtenido a partir de la matriz de similitud generada por combinación de los patrones BOX, REP y RS $\alpha$ .	134
Figura 3-10: (A) Amplificación del gen <i>nifD</i> . El fragmento amplificado de 1170 pb, se separó por electroforesis en un gel de 1 % de agarosa. (B-C) Productos de la digestión del fragmento amplificado con la enzima <i>EcoRV</i> .	135
Figura 3-11: RFLP del amplicón del gen <i>nifK</i> de las 17 cepas, con la enzima <i>HinfI</i> . La restricción generó 6 bandas de 768 pb, 581 pb, 164 /162 pb, 123 pb y 52 pb cuya sumatoria se corresponde con el tamaño del fragmento amplificado (1850 pb).	136
Figura 3-12 . Amplicon del gen <i>nifH</i> . El fragmento amplificado de 782 pb, se separó por electroforesis en un gel de 1 % de agarosa.	136
Figura 3-13: RFLP del amplicón del gen <i>nifH</i> con la enzima <i>NaeI</i>	137
Figura 3-14: Southern blot de las digestiones de ADN genómico con <i>SaII</i> , hibridación con la sonda RS $\alpha$ marcada con digoxigenina.	138
Figura 3-15: Southern blot de las digestiones de ADN genómico con <i>BamHI</i> , hibridación con la sonda RS $\alpha$ marcada con digoxigenina.	138

Figura 3-16: Southern blot de las digestiones de ADN genómico con *SaII*, y posterior hibridación con la sonda  $RS\beta$  marcada con digoxigenina..... 139

Figura 3-17: Southern blot de las digestiones de ADN genómico con *BamHI*, y posterior hibridación con la sonda  $RS\beta$  marcada con digoxigenina..... 139

Figura 3-18: Dendrograma generado con la combinación de los perfiles obtenidos con las sondas marcadas  $RS\alpha$  y  $RS\beta$ . NTSYS software, coeficiente DICE, UPGMA. .... 140

Figura 3-19: Árbol filogenético generado con el software Geneious 8.0.2 utilizando el modelo Neighbor-joining, modelo de distancia genética Tamura-Nei, considerando como grupo externo la secuencia ITS de la cepa USDA 257 (*Ensifer fredii*). ..... 142

#### Índice de figuras del capítulo 4

Figura 4- 1: Esquema con la ubicación de los primers en el fragmento 1 de la isla simbiótica. En este fragmento ubicado entre las posiciones 1908138 – 1935114 del genoma de USDA110 (Kaneko et al., 2002), se incluyen los genes [*nifDKENX-nifS-nifB-nifH-fixBCX*]. El fragmento completo se amplificó con 4 pares de primers que generaron 4 amplicones de 7740 pb, 6591 pb, 5998 pb y 9800 pb. .... 160

Figura 4- 2: Esquema con la ubicación de los primers en el fragmento 2 de la isla simbiótica. En este fragmento ubicado entre las posiciones 2175526 – 2199025 del genoma de USDA110 (Kaneko et al., 2002), se incluyen los genes [*nolZY-nolA-nodD2-nodDIYABCSUIJ-nolMNO-nodZ-fixR-nifA-fixA*]. El fragmento completo se amplificó con 3 pares de primers que generaron 3 amplicones de 8900 pb, 9630 pb y 5996 pb..... 160

Figura 4-3: Fragmento Bj 11 de 7740 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *PstI*. .... 161

Figura 4-4: Fragmento Bj 12-1<sup>ra</sup> parte de 6591 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *PstI*. .... 162

Figura 4-5: Fragmento Bj 12-2<sup>da</sup> parte de 5996 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. .... 163

Figura 4-6: Fragmento Bj 13 de 9800 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. .... 164

Figura 4-7: Fragmento Bj 21 de 8900 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *PstI*, *EcoRI* y *BamHI*. .... 165

Figura 4-8: Fragmento Bj 22 de 9630 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *EcoRV* y *XhoI*. .... 166

Figura 4-9: Fragmento B <sub>j</sub> 23 de 5995 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas <i>EcoRI</i> y <i>XhoI</i> . .....	166
Figura 4-10: Esquema de la región polimórfica. ....	167
Figura 4-11: amplicón <i>nifE</i> de 1777 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con la enzima <i>Hinfl</i> . ....	168
Figura 4-12: amplicón <i>nifN-nifX</i> de 2070 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con la enzima <i>Hinfl</i> . ....	168
Figura 4-13: amplicón <i>nifS – FixU</i> de 1700 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con la enzima <i>BbuI</i> y <i>PstI</i> y digestión del mismo fragmento con <i>PstI</i> .....	169
Figura 4-14: Amplificación del gen <i>nopP</i> y digestión con <i>PstI</i> . ....	170
Figura 4-15: Alineamiento de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen <i>nopP</i> secuenciado de las 5 cepas. Los cuadros negros marcan las diferencias encontradas en las secuencias de aminoácidos, traducidas a partir de la secuencia nucleotídica del gen. ....	171

### Índice de figuras del capítulo 5

Figura 5- 1: gel de agarosa desnaturalizante para verificar integridad de ARN de cultivos de las cepas E109, USDA110 y 366, inducidos y sin inducir con isoflavonoides. En cada calle se sembró una alícuota de 1 µl de la suspensión de ARN. ....	190
Figura 5- 2: Niveles de expresión de los genes <i>nodW</i> , <i>nodD1</i> y <i>nodD2</i> en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.....	191
Figura 5- 3: Niveles de expresión de los genes <i>nifA</i> , y <i>fixL</i> en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.....	191
Figura 5- 4: Niveles de expresión de los genes <i>rhcC1</i> y <i>nopP</i> en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.....	192
Figura 5- 5: Niveles de expresión de los genes <i>fixX</i> y <i>blr0241</i> en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.....	193
Figura 5- 6: Niveles de expresión de los genes <i>nodW</i> , <i>nodD1</i> y <i>nodD2</i> en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109. ....	194
Figura 5- 7: Niveles de expresión de los genes <i>nifA</i> , y <i>fixL</i> en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109. ....	194
Figura 5- 8: Niveles de expresión de los genes <i>rhcC1</i> y <i>nopP</i> en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.....	195

Figura 5- 9: Niveles de expresión de los genes <i>fixX</i> y <i>blr0241</i> en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.....	196
Figura 5- 10: Niveles de expresión de los genes <i>nifA</i> , <i>rhcC1</i> , <i>nopP</i> , <i>nodW</i> y <i>nodD1</i> en cultivos líquidos de las cepas 366 y E109 inducidos con exudados de semillas de soja, en referencia a los cultivos sin inducir.....	197
Figura 5- 11: Niveles de expresión de los genes <i>nifA</i> , <i>rhcC1</i> , <i>nopP</i> , <i>nodW</i> y <i>nodD1</i> en cultivos líquidos de las cepas 366, E109 y USDA 110 inducidos con genisteína, en referencia a los cultivos sin inducir.....	198
Figura 5- 12: Electroforesis de proteínas extracelulares de E109 y 366, extraídas de cultivos controles e inducidos con exudados de semillas de soja. La imagen de la izquierda corresponde a la tinción con plata y la imagen de la derecha corresponde a una repetición del gel teñido con Coomassie brilliant blue. ....	199
Figura 5- 13: Imagen de la observación microscópica de pelos radiculares tratados con agua destilada estéril. ....	200
Figura 5- 14: Imagen de la observación microscópica de pelos radiculares tratados con extractos de proteínas extracelulares de E109 y 366 inducidos con exudados de semillas de soja. Se observa el comienzo del proceso de enrulamiento del pelo radicular. ....	201
Figura 5- 15: Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de E109. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen. ....	202
Figura 5- 16: Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de E109 inducido con isoflavonoides. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen. ....	202
Figura 5- 17: Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de 366. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen. ....	203
Figura 5- 18: Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de 366 inducido con isoflavonoides. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen. ....	203
Figura 5- 19: Gel 2D de proteínas extracelulares de E109 (Izquierda) y 366 (Derecha). El rango de pH (4-7) se indica en la parte superior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de cada imagen. ....	204

Figura 5- 20: Ensayo de motilidad – Swarming en agar semisólido (0,5%). En la parte superior de la imagen se observan los duplicados del ensayo. En la parte inferior se ve un acercamiento de la imagen. Alrededor de la colonia de E109 se observa el halo de motilidad. .... 208

**Abreviaturas.**

ACC: 1-amino-ciclopropano -1-carboxilato.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

AIA: Ácido Indol Acético.

ANOVA: Análisis de Varianza.

ARN: Ácido Ribonucleico.

DO: Densidad Óptica.

EMA (YEM): Extracto de levadura – Manitol – Agar.

EPS: Exopolisacáridos.

FBN: Fijación Biológica de Nitrógeno.

FRP: Factor de Recuperación Porcentual.

IEF: Isoelectroenfoque.

IF (Exudados de semillas de soja): Isoflavonoides.

MW: *Molecular Weight*, pesos moleculares.

Nop: *Nodulation Outer Proteins*, Proteínas de Nodulación Externas.

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en cadena de la polimerasa.

PEC: Proteínas Extracelulares.

pI: Punto Isoeléctrico.

PPM: partes por millón.

PSA: Peso Seco Aéreo.

PSN: Peso Seco de Nódulos.

RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism*, restricción de fragmentos largos polimórficos.

RPM: revoluciones por minuto.

RS: *Repetitive sequence*, Secuencias Repetitivas.

SSTT: Sistema de Secreción Tipo III.

UFC: Unidades Formadoras de Colonias.

*“Lo maravilloso es que el ejercicio moderno de la enseñanza no haya ahogado por completo la sagrada curiosidad por investigar, pues esta delicada plantita, además de estímulo, necesita esencialmente de la libertad, sin la cual perece de modo inevitable.”*

(Albert Einstein)

***Capítulo 1: Introducción General.***

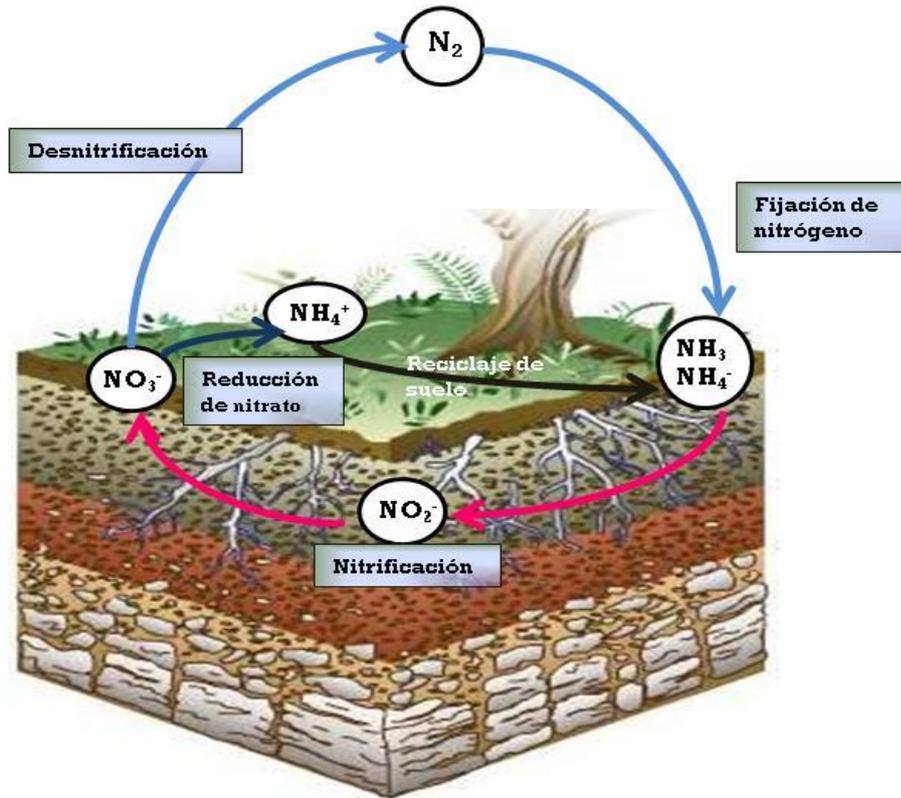
## **Capítulo 1: Introducción**

### ***El Nitrógeno en la producción agrícola***

En la actualidad, la agricultura se caracteriza por el alto nivel de tecnificación, lo que conduce a la obtención de altos rendimientos, en un contexto de uso intensivo del recurso suelo. Esto último atenta contra la sustentabilidad del sistema agrícola y si bien la fertilización es una manera de reponer al suelo los elementos nutritivos que se extraen con las cosechas, esto no solo es costoso sino que además pone en riesgo al ambiente.

Uno de los elementos nutritivos que con mayor frecuencia limita el rendimiento de los cultivos es el nitrógeno (N), aun cuando la atmósfera contiene un 80 % de nitrógeno molecular ( $N_2$ ), en este estado no puede ser aprovechado por la planta (Haag et al., 2013). Por eso, frecuentemente limita el crecimiento ya que las plantas lo extraen del suelo en cantidades superiores al resto de los nutrientes (Zhang et al., 2007). El N es por lo tanto un elemento clave para la agricultura, ya que el rendimiento es una función directa de la disponibilidad del mismo (Vitousek et al., 1997; Myrold, 2005). El  $N_2$  que es como se encuentra en grandes cantidades en la atmósfera solo puede ser utilizado directamente por un grupo reducido de microorganismos, en un proceso que se conoce como fijación biológica de nitrógeno (FBN). Este es un proceso realizado por microorganismos del suelo en vida libre o en simbiosis con plantas leguminosas y actinorrícicas (Zuberer, 2005).

La fijación de  $N_2$  (Combustión –Fijación espontánea, Fijación industrial y FBN) es uno de los dos procesos más importantes del ciclo biogeoquímico del N y es el aporte más importante de N a la biomasa del suelo (Figura 1-1). La fijación de  $N_2$  atmosférico es un proceso que ocurre en algunos grupos de organismos de la biosfera. En contraposición, la desnitrificación es un proceso microbiológico que devuelve el  $N_2$  a la atmósfera. La fijación de  $N_2$  lo convierte a sus formas reducidas, principalmente a  $NH_3$ . El amonio es oxidado principalmente a nitrato ( $NO_3^-$ ), si bien ambos compuestos son asimilados por los organismos vivos. La forma oxidada del N,  $NO_3^-$ , es la que incorporan las plantas. La desnitrificación solo hace referencia al pasaje de las formas oxidadas del nitrógeno, como  $NO_2^-$  a  $N_2$  gaseoso, que constituye una pérdida de N del suelo ya que vuelve a la atmósfera. Una de las etapas del ciclo del N más interesante para el desarrollo de la vida, en la superficie de la tierra, es la de la fijación de  $N_2$ .



**Figural-1:** Ciclo del nitrógeno: La fijación de nitrógeno, nitrificación, reducción de nitratos y la desnitrificación son los componentes de este ciclo esencial, que convierte el nitrógeno gaseoso atmosférico en iones amonio y nitratos (formas aprovechables por las plantas), y el retorno del  $N_2$  a la atmósfera.

La creciente demanda de alimentos en un escenario de crecimiento progresivo de la población mundial y la limitada superficie cultivable, han conducido a intensificar prácticas agrícolas como el riego y el manejo de fuentes adicionales de nutrientes en los suelos (Galloway et al., 2004); en este esquema la fijación de  $N_2$  es una fuente imprescindible (Matthews & Hammond, 1999). Se estima que en el mundo se fijan alrededor de 275 millones de toneladas métricas de  $N_2$  al año, de los cuales 30 millones corresponden a fenómenos naturales como las descargas eléctricas, 70 millones proceden de la fijación industrial por el proceso de Haber-Bosch, en el cual se gasta gran cantidad de energía procedente del petróleo y 175 millones de toneladas corresponden a la fijación biológica (de Felipe, 2006).

La producción de granos con fertilizantes nitrogenados conduce a una producción más ineficiente y con riesgos de contaminación ambiental. La utilización masiva de

fertilizantes nitrogenados altera el ciclo natural del N, contribuyendo al cambio climático, o a la contaminación de los cursos de agua, entre otras consecuencias negativas.

Existen numerosas iniciativas enfocadas a realizar un uso racional de los recursos naturales, que consideran a los microorganismos como agentes biológicos útiles para los cultivos, para biofertilizar y favorecer así la nutrición de las plantas, pero además también como inductores de resistencia sistémica frente a patógenos o productores de fitohormonas (Velázquez et al., 2006). Es así que la fijación biológica de nitrógeno ha cobrado valor dentro del contexto de la agricultura sustentable, ya que reduce el uso de fertilizantes nitrogenados con el consiguiente ahorro en los costos de producción y la consecuente reducción de la contaminación ambiental, disminuyendo la degradación del medio (Olivares et al, 2013).

### ***El Nitrógeno simbiótico***

La fijación biológica de  $N_2$  es uno de los procesos biológicos que ha resultado en el desarrollo de un producto biotecnológico como lo es la producción industrial de inoculantes, que en Argentina ha tenido un considerable desarrollo (Balatti, 2007).

Un ejemplo de esta alternativa lo constituye la simbiosis mutualista que se establece entre ciertos microorganismos diazotrofos del orden Rhizobiales, genéricamente denominados rizobios y las plantas leguminosas, que constituyen el modelo clásico para el estudio de las interacciones planta-microorganismo por su importancia ecológica y agronómica (Jiménez-Zurdo et al., 2006; Balatti, 2007).

La reducción de  $N_2$  atmosférico realizada por las bacterias es el mayor aporte de N a la biosfera, y es un componente clave del ciclo global del nitrógeno. De los 175 millones de toneladas de nitrógeno que fijan las bacterias, 140 millones corresponden a la fijación simbiótica (de Felipe, 2006), es decir que, la principal fuente de fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la asociación simbiótica entre rizobios y plantas de la familia de las leguminosas. La interacción entre las bacterias y una planta huésped conduce a la formación de nódulos, estructuras que desarrollan frecuentemente en la raíz y solo en algunas pocas plantas en el tallo. El desarrollo de los nódulos fijadores de  $N_2$  es un proceso complejo, que resulta del intercambio de señales entre los simbioses (Gibson et al., 2008; Kereszt et al., 2011). Sin embargo, las bacterias difieren en su

adaptación a las condiciones edáficas, en su capacidad competitiva, en su habilidad para evadir la respuesta de defensa de las plantas en el momento de la infección y también en su capacidad para adaptar su fisiología a la vida endosimbiótica (bacteroide), procesos que aún no están claramente establecidos (Jiménez-Zurdo et al., 2006).

Si bien está claro que las bacterias mejoran el crecimiento de las plantas por medio de un amplio espectro de mecanismos de interacción, la asociación de bacterias que fijan  $N_2$  en simbiosis con leguminosas es la más significativa (Velázquez et al., 2006).

### ***Las leguminosas - soja***

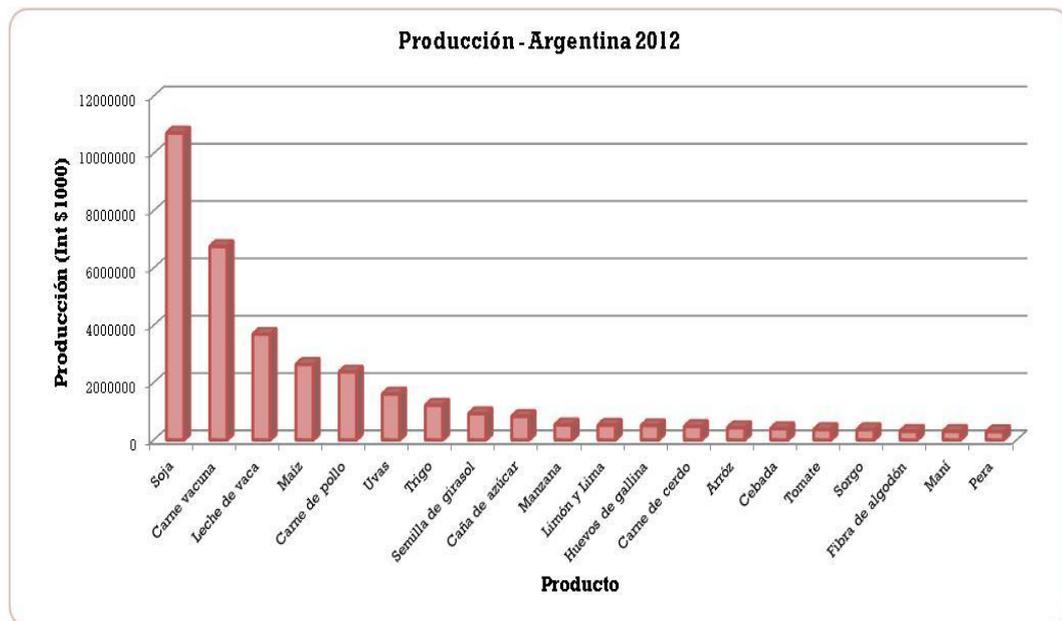
Las leguminosas (Fabaceae) son la segunda familia de plantas con mayor importancia económica para el hombre, por detrás de las Gramíneas, considerando que el número total de especies que la componen es de aproximadamente 19400 (Gepts et al., 2006; Gyaneshwar et al., 2011). Esta familia es integrada por plantas de gran diversidad morfológica, que se adaptan a un amplio espectro de ambientes, que van desde plantas de ambientes árticos anuales a árboles tropicales (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Tradicionalmente, la familia de las leguminosas se ha dividido en tres subfamilias: Caesalpinieae, Mimosoideae, y Papilionoideae (van Rhijn & Vanderleyden, 1995; Lewis et al., 2005). Las leguminosas de grano se incluyen en esta última subfamilia, compuesta por plantas como la soja (*Glycine max*), frijol (*Phaseolus sp.*), Maní (*Arachis sp.*) y los guisantes (*Pisum sativum*).

La soja es una planta nativa de Asia, siendo el norte y centro de China, el sitio en que se originó y sufrió el proceso de domesticación. A partir de su sitio de origen, el cultivo de soja se dispersó en el mundo, cultivándose en los 5 continentes (Balatti, 2007; López et al., 2013).

En 2010, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación estimó que se produjo un total de 264 991 580 toneladas de soja en todo el mundo en una superficie aproximada del cultivo de 102.556.310 hectáreas. El grano de soja es una fuente de aminoácidos esenciales y, por lo tanto, es una fuente clave de nutrientes para la población humana y animal y por ello la producción de soja ha experimentado un constante aumento, tanto a nivel mundial como a nivel nacional.

En Argentina la superficie cultivada con soja actualmente es de alrededor de 19,5 millones de hectáreas, y considerando una producción de 49,3 millones de toneladas (en 2013) es el cultivo más importante del país desde el punto de vista de su valor comercial (Figura 1-2).

La planta de soja tiene una composición orgánica muy particular, alrededor del 3 % de las estructuras de su biomasa vegetal es N total. Además acumula en sus granos aproximadamente el 73 % del total de N adquirido por la planta, lo que implica una más que elevada cantidad de N en la estructura del cultivo (Piccinetti et al., 2013). Por ello el rendimiento depende fuertemente de la disponibilidad de nitrógeno, el que puede provenir de la mineralización de la materia orgánica del suelo o de la simbiosis con los rizobios del suelo.



**Figural-2:** Este gráfico presenta la producción de los 20 productos alimentarios y agrícolas más importantes (clasificados según su valor) en Argentina en el año indicado. Fuente: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (<http://faostat3.fao.org/home/S>).

La soja es exótica en Argentina y América del Sur al igual que los rizobios del suelo con los que interacciona, por ello el 90 % de la superficie cultivada se inocula en el momento de la siembra con *Bradyrhizobium japonicum* (González, 2007). La capacidad de

la soja para interactuar con los rizobios está determinada genéticamente y cada cultivar de soja responde específicamente a la interacción con cepas seleccionadas y en este sentido no solo se han identificado genes que regulan la respuesta de la planta a determinadas bacterias (Salvucci et al., 2011), sino que además se identificaron caracteres cuantitativos asociados a marcadores moleculares que determinan la capacidad de nodulación de la soja (Salvucci et al., 2011; López et al., 2013). Por lo cual es claro que en la interacción leguminosa-rizobios, la simbiosis y su eficiencia está en función de factores de la planta y de la bacteria.

### ***La fijación simbiótica rizobio-leguminosas***

Tanto las raíces como la parte aérea de las plantas permanentemente se encuentran en contacto con bacterias. Estas pueden ser saprófitas y/o benéficas, aunque algunas sin duda, establecen relaciones patogénicas porque utilizan a la planta como una fuente de nutrientes. En las interacciones planta-bacteria ocurre el intercambio de señales como resultado de los cuales, en algunos casos, se activan mecanismos de defensa (Schumpp & Deakin, 2010). La asociación de bacterias capaces de fijar nitrógeno en simbiosis con las leguminosas es la más significativa ya que los beneficios son claramente cuantificables. Sin embargo de los aproximadamente 700 géneros de leguminosas y 19400 especies, solo algunos/as (alrededor de un 10 %) son nodulados por endosimbiontes aislados y caracterizados (Moulin et al., 2001; Vinuesa y Silva, 2004).

Al principio se consideró que la bacteria que nodulaba todas las leguminosas era solo una, sin embargo con el paso del tiempo se comenzó a estudiar la diversidad de los microorganismos denominados genéricamente rizobios (Velázquez et al., 2006). Es así que en la edición del Manual Bergey de 1974 se reconocen seis especies del género *Rhizobium* cuyos nombres, en muchos casos, derivan del hospedador al que nodulan. Esta primera clasificación sistemática había sido propuesta por Fred et al. (1932) basada en el concepto de inoculación cruzada con respecto a la leguminosa huésped, resultando en seis especies: *R. leguminosarum*, *R. japonicum*, *R. phaseoli*, *R. trifolii*, *R. lupini* y *R. meliloti* (Marçon Delamuta et al., 2013). Este criterio de clasificación de las bacterias en función de lo que hacen y no por lo que son, no es adecuado considerando los principios de la taxonomía, aun así todavía se utiliza en las descripciones de especies de rizobios. En algunos casos, el nombre de las especies del microsimbionte se corresponde con las plantas que nodula y sugiere que la simbiosis es especie-específica.

Una clasificación más actualizada de los rizobios en el orden *Rhizobiales*, se subdivide en cuatro familias: *Rhizobiaceae* a la que pertenecen los géneros de crecimiento rápido *Rhizobium*, *Allorhizobium* y *Sinorhizobium* (*Ensifer*); *Phyllobacteriaceae*, género *Mesorhizobium* de crecimiento intermedio; *Bradyrhizobiaceae*, género *Bradyrhizobium* de crecimiento lento y la familia *Hyphomicrobiaceae* a la que pertenece el género *Azorhizobium* también de crecimiento lento (Vinuesa y Silva, 2004).

Uno de los descubrimientos importantes en la rizobiología, se produjo en 2001 cuando se confirmó que no solo las  $\alpha$ -Proteobacterias forman nódulos fijadores de  $N_2$  con las leguminosas. En 2001 se encontró que dos especies de  $\beta$ -Proteobacterias, *Burkholderia* y *Ralstonia* que suelen encontrarse viviendo en los espacios intercelulares de las plantas como endosimbiontes, también establecen simbiosis con plantas leguminosas (Vinuesa y Silva, 2004; Velázquez et al., 2006).

Las leguminosas como ya se dijo anteriormente interaccionan entonces, con bacterias Gram (-) de las Alfa ( $\alpha$ ) y Beta ( $\beta$ )-proteobacterias ( $\alpha$  y  $\beta$ -rizobios). El resultado de la interacción es la fijación simbiótica de nitrógeno, haciendo que la demanda de energía de origen fósil de las leguminosas se reduzca en un 35-60 % (Jensen et al., 2012; Haag et al., 2013).

### **Los simbiotes de la soja**

Los microorganismos que fijan nitrógeno en simbiosis con la soja, se agrupan en el orden *Rhizobiales*, incluyendo especies de los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* (*Sinorhizobium*), *Azorhizobium*, *Allorhizobium* (Angelini et al., 2011). Dentro de este grupo de organismos, existen tres especies de *Bradyrhizobium* que nodulan soja, de los cuales *B. japonicum* (Fred et al. 1932) y *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992) son de crecimiento lento y *B. liaoningense* (Xu et al., 1995) de crecimiento extra lento. Por otro lado, también se identificaron rizobios de crecimiento rápido capaces de nodular soja como *Ensifer* (previamente *Sinorhizobium*) *fredii*, (Keyser et al., 1982), *E. xinjiangensis* (Chen et al., 1988) y un mesorizobio, *M. thianshanense* (Chen et al., 1995). Además, se observó que *Rhizobium sp.* NGR234 es capaz de nodular soja (Saldaña et al., 2003). Esta cepa es uno de los rizobios de comportamiento más promiscuo, ya que es

capaz de nodular a 232 leguminosas sobre 452 probadas (Lloret & Martínez-Romero, 2005). Así, hasta el momento podemos decir que la soja puede ser nodulada por tres especies de bradyrizobios, tres de rizobios y una de mesorizobios (Vinuesa et al., 2008). Estudios más recientes han mostrados que algunas cepas de la especie *B. yuanmingense* son capaces de nodular plantas de soja en diversos suelos de India, Myanmar y Vietnam (Vinuesa et al., 2008).

En la actualidad y tras muchos años de cultivo de soja y por ende de inocular bacterias en los suelos, las cepas se han naturalizado y pertenecen a los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* (González, 2007), lo que también ocurrió en Brasil (Da Costa Coutinho et al., 1999) y Paraguay (Chen et al., 2000). Sin embargo, en general la eficiencia de estos rizobios alóctonos o naturalizados para fijar el N<sub>2</sub> no es la misma que la de las cepas seleccionadas, probablemente debido a que sufren cambios genéticos que mejoran su competitividad contribuyendo así a su sobrevivencia en los suelos. A esto se le suman las variaciones genéticas provocadas por el flujo horizontal de material genético, es decir que los rizobios de suelo pueden adquirir, por transferencia horizontal, genes que generen cambios en la capacidad para interactuar y nodular la soja (Moulin et al., 2004; Barcellos et al., 2007). En este sentido, uno de los problemas de los rizobios seleccionados por su capacidad de fijar nitrógeno es que no son competitivas en relación con las poblaciones naturalizadas de los suelos (Minamisawa et al., 1999).

### ***Bradyrhizobium***

En la octava edición del *Manual de Bacteriología Determinativa de Bergey's* el género *Rhizobium* se dividió en dos grupos en base a la disposición flagelar, la tasa de crecimiento, un mayor contenido de %GC en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el género de plantas huésped noduladas entre otras características (Jordan, 1982). El adecuado nombre para el nuevo género fue *Bradyrhizobium* (adj. *bradus*-slow-lento; *Rhizobium*-nombre genérico bacteriano), rizobio de crecimiento lento.

Este género comprende un grupo muy heterogéneo de bacterias de nódulos dentro del cual las relaciones taxonómicas no están completamente comprendidas. Las características descriptivas del género *Bradyrhizobium* se corresponden con bacilos cortos de 0.5 a 0.9 µm por 1.2 a 3.0 µm, Gram (-), aeróbicas, no esporulantes. Son móviles debido a que poseen un flagelo polar o subpolar. En medio Extracto de levadura-

Manitol-Agar (EMA) crecen lentamente formando colonias de aproximadamente 1 mm de diámetro a los 5-7 días de incubación a una temperatura de 25-30 °C (Kersters & Vancanneyt, 2005). Estas bacterias cuando son adicionadas a semillas o en raíces de leguminosas tropicales tales como representantes de los géneros *Glycine*, *Vigna*, y *Macroptilium*, estimulan la producción de nódulos.

### ***Bradyrhizobium japonicum***

*B. japonicum* está clasificado como miembro de las  $\alpha$ -Proteobacterias, dentro del orden Rhizobiales y perteneciente a la familia Bradyrhizobiaceae.

Esta bacteria puede vivir en vida libre en el suelo o como bacteroide, estado en el que fija nitrógeno en los nódulos que forma en las raíces de las plantas huéspedes. Además de la soja, *B. japonicum* puede nodular miembros de otras familias de plantas como Papilonoideae, Mimosoideae y Phaseoleae (Dénarie et al., 1992).

*B. japonicum* es una bacteria que se desarrolla en diferentes ambientes y concentraciones de oxígeno. En vida libre en condiciones aeróbicas, utiliza O<sub>2</sub> como aceptor final de electrones en la cadena respiratoria. Aunque crece también en condiciones de anoxia o baja tensión de O<sub>2</sub>, y en estas condiciones utiliza nitrato como aceptor terminal de electrones desnitrificando (Vairinhos et al., 1989). En los nódulos, como bacteroide, la bacteria sufre cambios fisiológicos y se adapta a una respiración microaeróbica usando la citocromo oxidasa simbiótica con una alta afinidad por el oxígeno (Preisig et al., 1996).

*B. japonicum* USDA110, la cepa tipo de la especie, fue aislada de nódulos de soja en Florida, USA en 1957. Su genoma fue secuenciado por Kaneko et al. (2002) y está constituido por un cromosoma circular de 9.105.828 pb con un contenido del 64,1 % de GC. Se han predicho 8.317 genes codificantes de proteínas, y una región con bajo contenido en GC de unos 410 Kb identificada como isla simbiótica. En esta región se concentran los genes de nodulación y fijación de nitrógeno (Göttfert et al., 2001).

Durante las últimas dos décadas, varios autores han reportado una gran diversidad morfo-fisiológica, genética y simbiótica dentro de la especie *B. japonicum* (Ferreira y Hungría, 2002; Menna et al., 2006), incluyendo la proposición de que algunas

cepas formarían una nueva especie. Más recientemente, Marçon Delamuta et al. (2013) aportaron evidencias para considerar una reclasificación polifásica en una nueva especie de la cepa tipo USDA110 así como también la cepa SEMIA5080 comúnmente empleada en la formulación de inoculantes. La nueva especie *Bradyrhizobium diazoefficiens* debe su nombre a *diazo* referente a dinitrógeno y *efficiens* referente a eficiente, en conjunto remarcando una mayor eficiencia de fijación de nitrógeno mostrada por varias cepas de la especie *B. japonicum*. Esta nueva especie corresponde a bacterias Gram (-), aeróbicas como otras especies del género pero sus colonias son de 1,2-1,5 mm de diámetro, circulares, convexas y opacas luego de 7 días de crecimiento a 28 °C en medio EMA con rojo congo. Tienen un porcentaje de GC de 63,98 % y son muy efectivas en la nodulación y fijación de nitrógeno en simbiosis con soja, aunque la especie también incluye simbioses de otras leguminosas (Marçon Delamuta et al., 2013).

En la década de 1970, varias cepas pertenecientes al género *Bradyrhizobium* se recibieron en Argentina a partir de diferentes colecciones de todo el mundo para ser evaluadas en condiciones agronómicas, incluida la cepa 2860 (anteriormente llamada USDA138 y que corresponde al serogrupo *Bradyrhizobium japonicum* USDA6). Después de la evaluación, selección y reaislamiento de nódulos de soja, la cepa fue rebautizada 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 de colonizar efectivamente la planta y fijar nitrógeno con el consecuente aumento de productividad de los cultivos (Perticari et al., 1996). El genoma completo de esta cepa también fue secuenciado recientemente (Torres et al., 2015). Este genoma consiste en 9.224.208 pb con un contenido de GC de 63,6 % (Torres et al., 2015).

### **Proceso de nodulación**

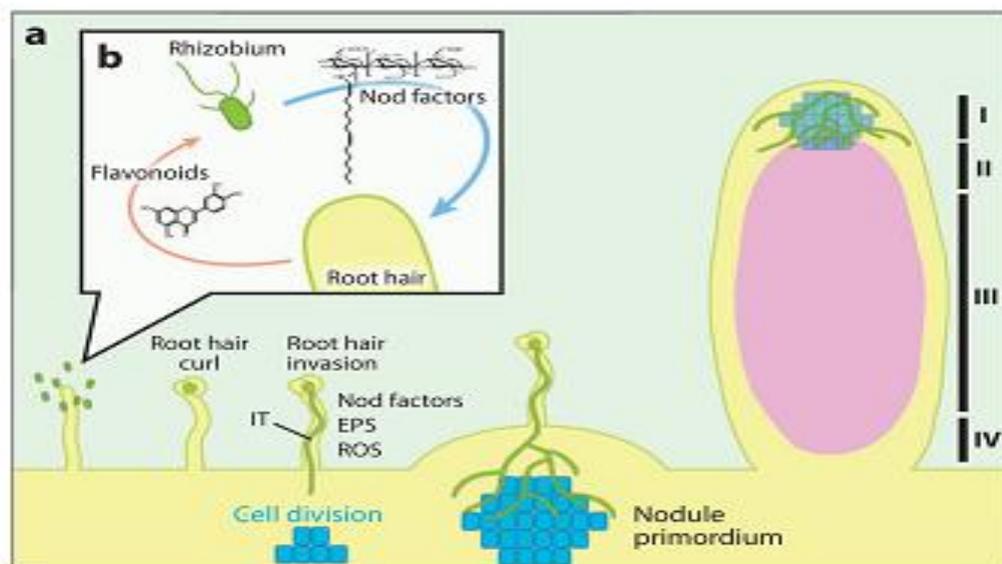
El proceso de nodulación en la simbiosis rizobio-leguminosa, puede dividirse en las siguientes etapas que dan origen a la estructura especializada en la fijación de nitrógeno: (Figura 1-3 y 1-4).

- Atracción de los rizobios y quimiotaxis
- Adhesión de la bacteria a la raíz
- Reconocimiento específico (Flavonoides y Factores Nod)

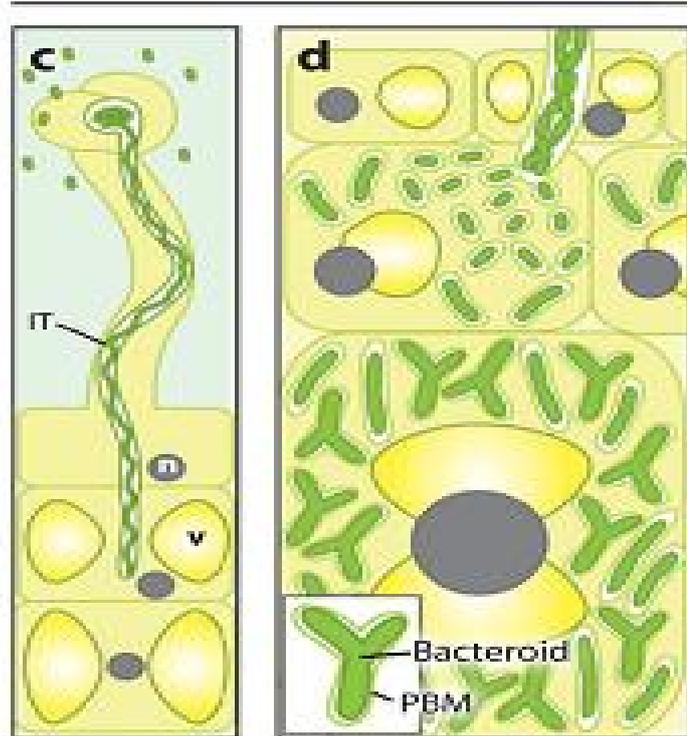
- Invasión del pelo radicular y Organogénesis del nódulo
- Diferenciación de las bacterias en bacteroides.

### *Atracción de los rizobios y quimiotaxis*

La coordinación del proceso de nodulación involucra un intensivo intercambio de moléculas señales entre el macro- y micro-simbionte. La bacteria en la rizósfera es quimiotácticamente atraída por la planta huésped, luego de la detección de compuestos tales como flavonoides, compuestos fenólicos, azúcares, ácidos dicarboxílicos y aminoácidos que son exudados por las raíces de la planta (Schmidt et al., 1994; Fauvart & Michiels, 2008). La atracción de los rizobios a la raíz y pelos radiculares es un paso muy importante en la iniciación de la simbiosis, e involucra además proteínas y polisacáridos de superficie (Downie, 2010).



**Figura 1-3:** (a-b): Esquema del proceso de infección y formación del nódulo. La planta exuda compuestos flavonoides en la rizósfera que desencadenan la producción de factores Nod en la bacteria. Los factores Nod percibidos por la planta desencadenan respuestas como el enrollado del pelo radicular y la invasión de pelo por la bacteria. En la invasión también son requeridos los exopolisacáridos bacterianos y la producción de especies reactivas de oxígeno de la planta. Los factores Nod inducen la división celular mitótica en la corteza de la raíz (representado en azul), lo que conduce a la formación del meristema nodular (Zona I). En el gráfico también se marcan en el nódulo una zona de invasión (Zona II) y una zona de fijación de N (Zona III). La Zona IV corresponde a la zona de senescencia. Fuente: Gibson et al., 2008.



**Figura 1- 4:** (c-d): c- La bacteria ingresa en el pelo radicular a través del hilo infectivo (IT) que se elonga hacia el meristemo nodular; (n)-núcleo, (v)-vacuola. d – en el extremo de elongación del IT, las bacterias son endocitadas dentro del citoplasma de la célula vegetal. Cada bacteria es rodeada por la membrana peribacterioide y ocurre la diferenciación a bacteroide. Los bacteroides establecen una infección crónica en el citoplasma, y enzimáticamente reduce el  $N_2$  para proveer a la planta de una fuente de nitrógeno asimilable (Zona III). Fuente: Gibson et al., 2008.

#### *Adhesión de la bacteria al pelo radicular*

La rizósfera es el espacio contiguo a la raíz que constituye un hábitat rico en nutrientes y puede ser colonizado por diversos microorganismos que generalmente forman biopelículas sobre la superficie de la raíz (Kennedy, 2005; Seneviratne et al., 2011). La rizósfera se enriquece por exudados de las plantas ya que se ha estimado que un 20 % de los productos fotosintetizados son liberados por las raíces en forma de mucilagos y metabolitos (Downie, 2010), los que a su vez pueden ser utilizados por los microorganismos para establecerse y proliferar. Por ello la mayoría de las bacterias de suelo tienen la capacidad de adherirse por diversos mecanismos a las raíces (Rodríguez Navarro et al., 2007; Downie, 2010).

En este proceso de adhesión actúan moléculas secretadas por la planta y por la bacteria. Por parte de la planta, se reconoce como participe en esta adhesión a las

lectinas (glicoproteínas) que suelen acumularse en los ápices de los pelos radiculares, estas se unen a los polisacáridos de superficie de la bacteria, contribuyendo junto con otros mecanismos a la especificidad entre el rizobio y la leguminosa (Dazzo & Hubbell, 1975; van Rhijn & Vanderleyden, 1995; De Hoff et al., 2009; Pérez-Giménez et al., 2009; Downie, 2010). Por su parte, los rizobios secretan adhesinas, que incluyen polisacáridos de superficie, aglutinas, fibrillas de celulosa y hasta se ha propuesto que los flagelos podrían tener un rol en la adhesión (Sorroche et al., 2012).

Esta primera etapa de adhesión es de gran importancia ya que, la proximidad a los pelos radiculares asegura el suministro de nutrientes que permite el crecimiento bacteriano y la formación de una biopelícula que les permite a las bacterias estar en contacto con la raíz, y próximas a los sitios de infección. Además se considera que si bien la deformación de los pelos radiculares ocurre en respuesta a los factores Nod, el enrulamiento del pelo que atrapa a la bacteria ocurre solo cuando es inducido por la adhesión bacteriana (Downie, 2010).

#### *Reconocimiento específico – Flavonoides y Factores Nod*

La unión del rizobio a los pelos radiculares es un paso muy importante en la iniciación de la simbiosis e involucra la reacción de proteínas secretadas y polisacáridos algunos de los cuales se ubican a nivel de la superficie bacteriana.

Las leguminosas secretan metabolitos secundarios, usualmente sustancias fenólicas (flavonoides o isoflavonoides) que difunden pasivamente a través de la membrana bacteriana y que actúan como señales (Fauvert & Michiels, 2008). Los tres grupos mayoritarios de Isoflavonoides presentes en la soja son genisteína, daidzeína y gliciteína. Sin embargo, el perfil y el contenido de isoflavonas pueden variar según el año, el genotipo del cultivar e incluso ser modificados por efectos del medio ambiente (Meksem et al., 2001).

Los flavonoides de las leguminosas son reconocidos por los rizobios, que en general responden activando o reprimiendo la expresión de los genes de nodulación *nod*, *nol* y *noe* (Cooper, 2004). Entre los exudados de la soja, genisteína y daidzeína son los compuestos mayoritarios que inducen los genes *nod* en *B. japonicum* (Subramanian et al., 2006). En particular, se ha demostrado que la genisteína induce todos los genes asociados a *nod* box (Lang et al., 2008).

La proteína de membrana NodD, pertenece a una familia de reguladores transcripcionales que al interactuar con los flavonoides de las leguminosas se unen a las cajas regulatoria (*nod*-box) que regulan la expresión de los genes de nodulación (Viprey et al., 1998; Krishnan et al., 2003). Algunos de estos genes de nodulación codifican enzimas para la biosíntesis de moléculas señales llamadas factores Nod, que son oligómeros de usualmente 4 a 6 residuos N-acetilglucosaminas unidas por enlaces  $\beta$  1-4, con un grupo N-acyl unido. Los genes *nodABC* participan en la biosíntesis y ensamblaje de unidades de N-acetilglucosaminas y la unión de la cadena del ácido graso; mientras que los genes de nodulación específicos, *nol* y *noe* codifican las enzimas que catalizan la incorporación de los diferentes sustituyentes en sus extremos (Masson-Boivin et al., 2009). Además de estos genes, se han descrito otros genes cuyos productos participan en la regulación y activación de genes *nod*, como *nodD* y *nodVW* que son inducidos por los flavonoides secretados por la planta.

Estos factores Nod son primariamente determinantes de las leguminosas con que la bacteria puede nodular. La especificidad de leguminosa huésped está determinada por la precisa sustitución en los factores Nod (Schultze & Kondorosi, 1998; Downie, 2010). Los factores Nod son reconocidos por la planta por medio de receptores tipo quinasas de la familia de LysR en las células epidérmicas de los pelos radiculares (Viprey et al., 1998).

Además de factores Nod, algunos rizobios secretan proteínas que están involucradas en la nodulación. Varias de estas proteínas son secretadas por el sistema de secreción tipo III, codificado por el cluster de genes *rhc*. Este sistema de secreción está presente en bacterias Gram negativas, patógenas de plantas y animales, y es conocido por su participación en la secreción de proteínas de virulencia (Schechter et al., 2010).

#### *Sistema de secreción tipo III (SSTT)*

En los rizobios, las proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III (SSTT) son llamadas proteínas externas de nodulación – Nop (nodulation outer proteins) (Schechter et al., 2010). Estas proteínas son elementos clave en la determinación del rango de especies noduladas por los rizobios, mientras que algunas de estas promueven la simbiosis en algunas leguminosas, en otras no tienen efecto o reducen la competencia de los rizobios (Viprey et al., 1998; Krause et al., 2002; Marie et al., 2003; Schechter et al., 2010).

Se ha encontrado una alta homología en la secuencia de los genes que codifican el SSTT con las de los genes codificantes del sistema de secreción flagelar bacteriano, por lo que se cree que deriva del mismo. El SSTT es un sistema a través del cual los rizobios secretan proteínas del citoplasma bacteriano hacia el citoplasma de las células de la planta (Viprey et al., 1998). El complejo de secreción involucra alrededor de 20 proteínas diferentes, algunas de las cuales actúan en el citoplasma, otras constituyen la barrera estructural que atraviesa membranas interna y externa y otras forman una estructura tipo aguja que trasmite proteínas dentro de las células eucariotas (Downie, 2010).

La síntesis del sistema de secreción tipo III y la expresión de los efectores está regulada por los flavonoides de las leguminosas y la proteína NodD (Wassem et al., 2008; Okazaki et al., 2009). La interacción de la proteína NodD de los rizobios con los flavonoides de la leguminosa es específica y resulta en la expresión de *ttsI*, gen que codifica una proteína reguladora que se une a *tts*-box. Estos últimos son elementos promotores altamente conservados que se encuentran antecediendo, y por ello regulando a los operones que codifican las proteínas que constituyen la estructura de secreción y las proteínas secretadas (Wassem et al., 2008). El número de efectores en *B. japonicum* USDA110 es de alrededor de 30 (Zehner et al., 2008). Vale la pena destacar que no todos los genes precediendo los *tts* box están involucrados en el sistema de secreción tipo III.

El SSTT de *B. japonicum* secreta proteínas homólogas a NopP, NopE1 y NopE2 y probablemente secreta homólogas a NopL, NopM y NopT (Krause et al., 2002; Downie, 2010).

NopP y NopL son indispensables para que ocurra la nodulación de las leguminosas, ambas son fosforiladas por kinasas de las plantas aunque la relevancia de esta información es desconocida (Fauvart & Michiels, 2008). Han sido identificadas en unas pocas especies de rizobios (*Rhizobium* sp., *Ensifer fredii* y *B. japonicum*) y están ausentes en bacterias patógenas (Schechter et al., 2010). NopT, es estructuralmente similar a proteasas efectoras patogénicas (Kambara et al., 2009). NopM suele actuar como represora de la nodulación de algunas leguminosas. NopE1 y NopE2 se translocan dentro de la célula de la planta, en donde parecen someterse en presencia de calcio a un auto clivaje, que es clave para la nodulación en soja (Wenzel et al., 2010)

*Invasión de la raíz y Organogénesis del nódulo – Infección bacteriana*

En la formación de nódulos, en el caso de interacciones compatibles rizobio-leguminosa capaces de fijar nitrógeno, la bacteria activa en la planta dos programas: uno de morfogénesis del nódulo y otro de infección del mismo por los rizobios.

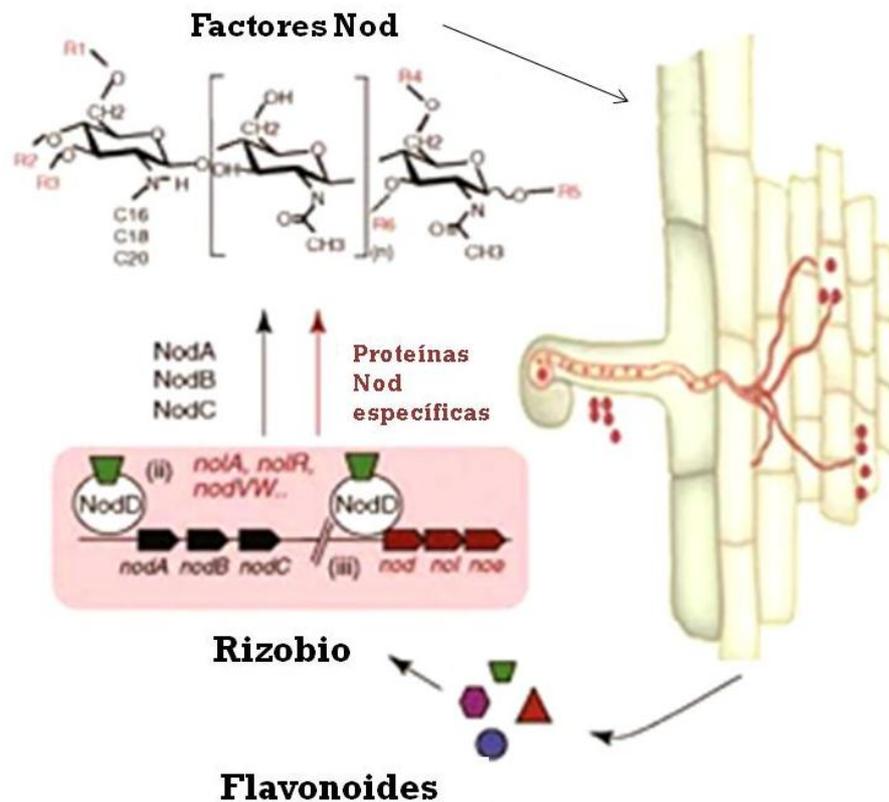
Los factores Nod interactúan con los receptores, y esto genera oscilaciones de la concentración de calcio en el nucleoplasma y citoplasma, “calcium spiking”, que se refleja en la expresión de los genes específicos de nodulación y nodulinas tempranas (ENODs) (Oldroyd & Downie, 2008; Haag et al., 2013).

En paralelo al aumento de calcio en el núcleo de la célula de la planta, los factores Nod desencadenan un flujo de  $\text{Ca}^{+2}$  hacia el ápice del pelo radicular provocando un incremento de los niveles de  $\text{Ca}^{+2}$  en el citosol, una despolarización transitoria de la membrana plasmática y la reorganización de los filamentos de actina y microtúbulos en las células del pelo radicular. Esto probablemente induce cambios en dichas células resultando en enrollado de los pelos (Gage, 2004; Fauvart & Michiels, 2008; Haag et al., 2013).

Como resultado de lo anterior el pelo radicular se enrula (Shepherds crook) y en el interior del plegamiento suelen quedar atrapadas bacterias. En el interior del rulo se produce la hidrólisis de la pared celular del pelo radicular, muy probablemente como resultado de la actividad de hidrolasas. Se ha sugerido que la bacteria puede inducir enzimas hidrolíticas que son las responsables de esta alteración localizada de la estructura de la pared que se debilita (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). Las bacterias crecen, se multiplican, se mueven dentro del hilo infectivo, estructura intracelular que se forma por una invaginación de la membrana de la célula vegetal. El hilo infectivo es un tubo estrecho de aproximadamente dos células de ancho. Las células que infectaron exitosamente continúan la producción de factores Nod durante el crecimiento en el hilo infectivo por inducción del gen de nodulación *nodM* que codifica una glucosamina sintasa.

En general una sola célula bacteriana es la que penetra y da origen a una progenie clonal que es la que completa el avance e invade el nódulo en formación. Sin embargo, en ocasiones más de un genotipo bacteriano es atrapado en el pelo enrollado, y por ello es posible observar que dos bacterias diferentes van a formar parte del hilo de infección (Gage, 2004).

El avance del hilo de infección continua hasta que los rizobios alcanzan la corteza interior de la raíz, donde se observa que las bacterias son internalizadas por las células vegetales corticales. En las células corticales se produce una endocitosis, una o unas pocas bacterias ingresan a la célula y quedan rodeadas por la membrana de la célula del hilo de infección. Esas vesículas son las que ingresan al citoplasma de las células infectadas. Estas vesículas constituyen el denominado simbiosoma, y la membrana que las rodea se denomina membrana peribacteroidal (Bolaños et al., 2004). Durante el proceso de infección y formación de los simbiosomas, el primordio del nódulo se va desarrollando y comienza a poblarse de células infectadas. En paralelo, los rizobios comienzan una diferenciación que va a concluir con su transformación en bacteroide, el cual puede comenzar a fijar  $N_2$ .



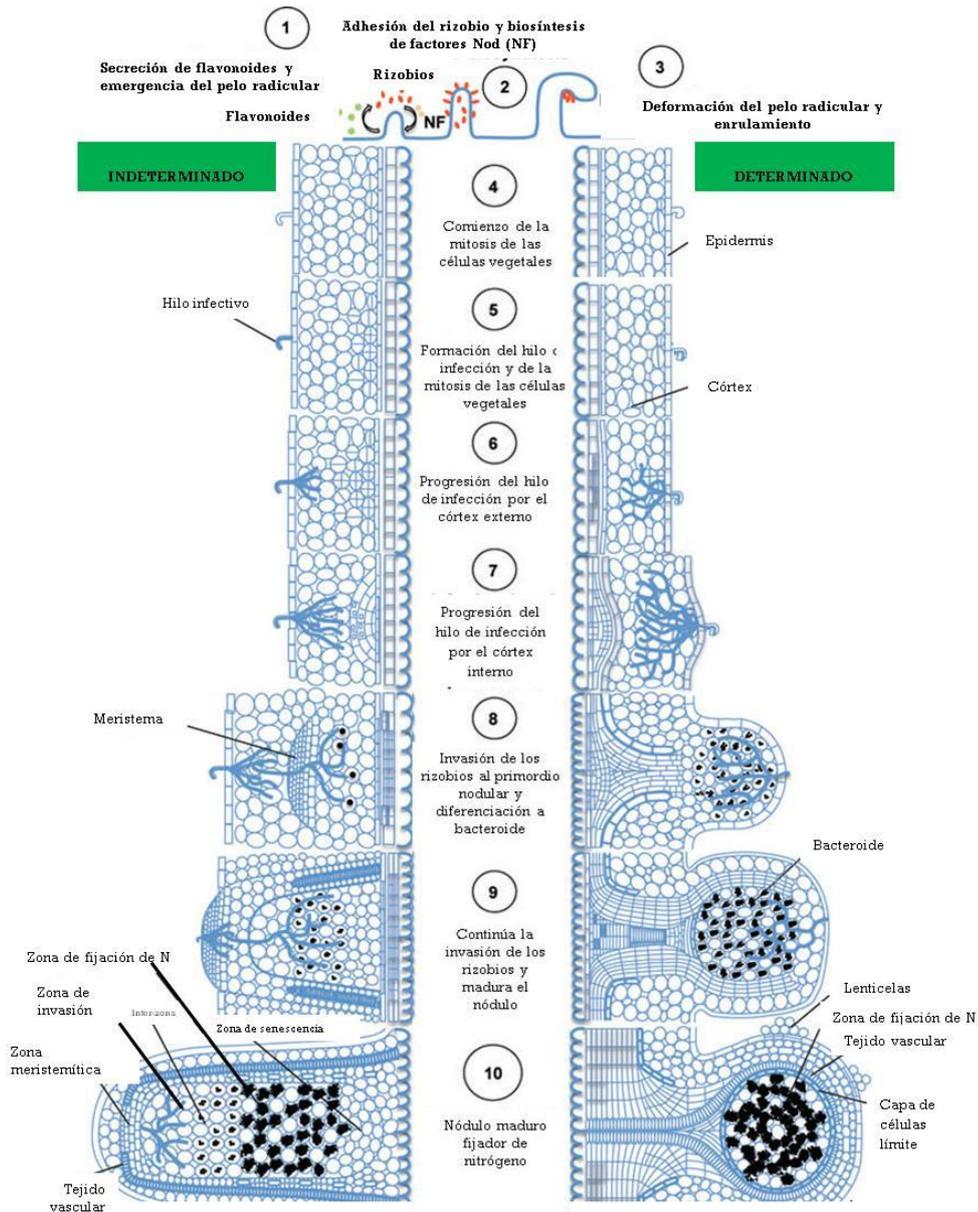
**Figura 1-5:** Señalización. Las señales de la planta, flavonoides, son reconocidas por la proteína reguladora NodD de la bacteria, que induce la expresión de los genes de nodulación. NodD modula a su vez la expresión del sistema de dos componentes regulatorios NodV/W. Fuente: Masson-Boivin et al., 2009.

### *Diferenciación de los bacteroides*

En el momento del desarrollo de los bacteroides a partir de las bacterias ocurren cambios morfológicos y metabólicos. La morfología de los bradyrizobios cambia, se pierde la estructura flagelar, se multiplican en forma controlada y comienzan a expresar la enzima nitrogenasa. En el estado de bacteroide los genes relacionados con la replicación del ADN están reprimidos, los cambios transcripcionales que se producen en los bacteroides reducen la mayoría de los procesos metabólicos excepto los involucrados en la fijación de nitrógeno y en la respiración, lo que es acompañado de una baja tasa de división celular de los bacteroides (Udvardi & Poole, 2013). El nitrógeno atmosférico es convertido en amonio por los bacteroides y es subsecuentemente asimilado por la planta luego de convertido a glutamina y más tarde a glutamato por la glutamina sintetasa y la glutamato sintasa, respectivamente (Udvardi & Poole, 2013). El carbono fijado por la planta es suministrado a las bacterias en forma de ácidos dicarboxílicos a través de un sistema de transporte específico. Existen otras proteínas aportadas por la planta para sostener la fijación de nitrógeno, como por ejemplo la leghemoglobina (Downie, 2005). Esta última se encarga de disminuir la tensión de oxígeno en los nódulos y administrar el ambiente microaeróbico necesario para la fijación (Jones et al., 2007, Terpolilli et al., 2012).

Existen dos tipos morfológicos de nódulos en las leguminosas: determinado e indeterminado (Figura 1-6). Las diferencias entre los dos tipos de nódulos son el sitio de las primeras divisiones celulares internas, el mantenimiento de una región meristemática, y la forma de los nódulos maduros (Ferguson et al., 2010). Los nódulos indeterminados tienen un meristema más persistente, lo que resulta en nódulos de forma cilíndrica, como los nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*), trébol (*Trifolium repens*), arveja (*Pisum sativum*) y *Medicago truncatula*. El meristema apical produce continuamente nuevas células que se infectan con bacterias. En la madurez, los nódulos indeterminados contienen una población heterogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno debido a la continua actividad de división celular. Estos nódulos también tienen un sistema vascular diferente, menos ramificado que los nódulos determinados. Los nódulos determinados, por el contrario, suelen ser esféricos y carecen de un meristema persistente. En la madurez, los nódulos determinados contienen una población relativamente homogénea de bacteroides fijadores de nitrógeno, debido a que la diferenciación de las células infectadas se produce de forma sincronizada, seguida de la senescencia. Estos nódulos

tienen una vida útil de unas pocas semanas. Cuando los nódulos envejecen, se forman nuevos nódulos. Los nódulos determinados también forman lenticelas, que son estructuras que mejoraran el intercambio de gases (Figura 1-6). Las leguminosas que forman nódulos determinados son predominantemente de especies tropicales y subtropicales, incluyendo la soja (*Glycine max*) y frijol (*Phaseolus vulgaris*), pero también incluyen otras especies más templadas como *Lotus japonicus*.



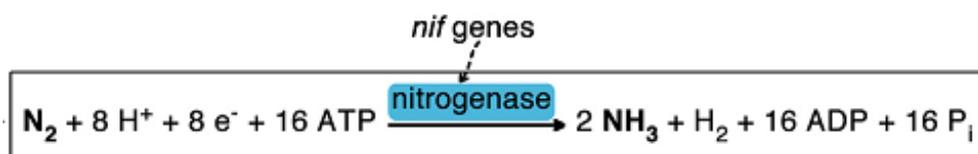
**Figura 1- 6:** Esquema del desarrollo de nódulos determinados e indeterminados. El desarrollo se esquematiza desde el inicio del intercambio de señales entre los simbios, progresando a la formación del hilo infectivo hasta llegar al primordio nodular, donde las bacterias son liberadas en un simbiosoma que se diferencia al estadio de bacteroide donde podrá fijar N. Fuente: Ferguson et al., 2010 modificado.

## Fijación simbiótica de nitrógeno

Los bacteroides se nutren de las fuentes de carbono de las plantas, las que son oxidadas en la cadena respiratoria aún en presencia de muy bajas concentraciones de oxígeno. En este ambiente se activa la nitrogenasa, que está formada por dos enzimas que catalizan la reducción del nitrógeno molecular a amoníaco. Independientemente de las agrupaciones de rizobios que realicemos, todos los organismos capaces de realizar la FBN tienen el complejo enzimático nitrogenasa (Raymond et al., 2004).

El complejo nitrogenasa está compuesto por dos polipéptidos con actividad enzimática que están codificados por los genes *nifDK* y *nifH*. El componente I (dinitrogenasa) contiene el sitio activo donde ocurre la reducción de nitrógeno y consiste en un tetrámero  $\alpha_2\beta_2$  que contiene cuatro clusters  $[4Fe:4S]$ , un cofactor específico ( $MoFe_6S_7-9$ ) y centros metálicos adicionales. El componente II (dinitrogenasa reductasa), es una proteína dimérica que se compleja con un cluster  $[4Fe:4S]$ . Esta es una oxido-reductasa que acepta electrones de la ferredoxina o flavodoxina y los transfiere al complejo I. Las dos enzimas que forman la nitrogenasa son metaloproteínas con centros redox Fe-S, pero en el caso de la dinitrogenasa la presencia adicional de Mo, actúa como cofactor y hace que la enzima se desnaturalice e inactive en presencia de  $O_2$ , con lo cual en esta condición no fija  $N_2$  (Shah & Brill, 1977). En la simbiosis rizobio-leguminosa, la planta protege a la nitrogenasa. Por un lado el nódulo está rodeado por una capa de células exteriores de paredes engrosadas que forman una barrera de protección a la difusión del  $O_2$  de la atmósfera del suelo (Jones et al., 2007, Terpolilli et al., 2012). Pero además, en el nódulo se produce una proteína llamada leghemoglobina –que posee un grupo hemo– (Kundu et al., 2003) que compleja y transporta  $O_2$  con gran afinidad, de esta manera se reduce la cantidad de  $O_2$  dentro del nódulo unas  $10^4 - 10^5$  veces (Jones et al., 2007, Downie, 2005).

La reacción catalizada por la nitrogenasa está representada por la siguiente fórmula:



A diferencia del proceso de Haber Bosch, la nitrogenasa cataliza la rotura del triple enlace del  $N_2$  a temperatura ambiente y a presión atmosférica, utilizando una gran cantidad de energía en forma de ATP. El consumo de ATP va a estar en función del flujo de protones en la cadena respiratoria. Es decir que cualquier condición que limite el flujo de protones reduce la fijación (Halbleib & Ludden, 2000).

### **Regulación de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno**

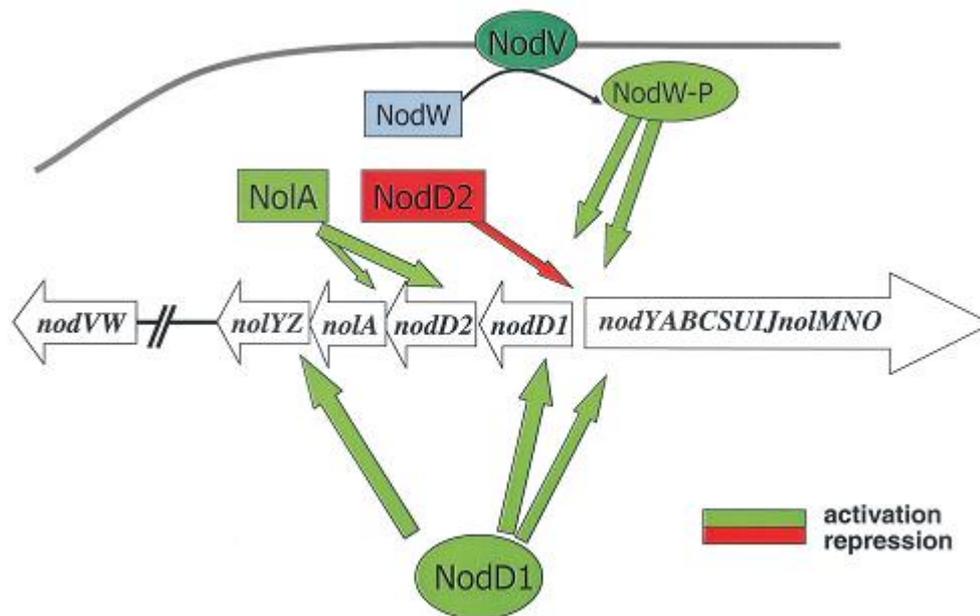
#### *Nodulación*

La proteína reguladora clave de los genes *nod* es NodD, un regulador del tipo Lys-R, que activa la expresión de genes *nod* solo en presencia de flavonoides de la planta que actúan como inductores (Loh & Stacey, 2003). En *B. japonicum* se han identificado dos proteínas NodD (NodD1 y NodD2) que presentan patrones de expresión y funciones diferentes. NodD1 en respuesta a la presencia de isoflavonas como la genisteína y daidzeína, activa la expresión de un conjunto de genes involucrados en la nodulación (Göttfert et al., 1992). En contraste, NodD2 es una proteína represora de los genes *nod*. NodD1 es autorregulada e inducida por genisteína y daidzeína (lo que difiere de la expresión constitutiva que tiene en *Rhizobium sp.*) (Smit et al., 1992; Loh & Stacey, 2003). *nodD1* también es inducido por isoflavonas glucosiladas, si bien estas últimas no inducen la transcripción de *nodYABC* y así provee a la planta el potencial para regular específicamente la expresión de *nodD1* (Loh & Stacey, 2003).

La primer evidencia de que la regulación de los genes *nod* involucra otros activadores transcripcionales surgió a partir de mutantes de *B. japonicum* *NodD1<sup>-</sup>* que nodulan plantas de soja (Göttfert et al., 1990). Subsecuentemente se encontró que las proteínas NodVW proveen de una ruta alternativa para la activación de los genes *nod*. *nodVW* son en *B. japonicum* genes esenciales para la nodulación de algunas plantas (*Vigna* y *Macroptilium*) pero no de la soja (Sanjuan et al., 1994; Loh et al., 1997). Una explicación para esta función huésped específica es que *nodVW* son genes que se expresan por reconocimiento específico de flavonoides producidos por estas plantas pero no los de soja, esto hace que *B. japonicum* nodule un amplio número de especies de leguminosas (Loh & Stacey, 2003). Los genes *nodVW* son clave para la nodulación de *Vigna* y *Macroptilium* y se ha planteado que es probable que estas especies demanden

una mayor concentración de factores Nod que la soja. NodV y NodW pertenecen a una clásica familia regulatoria de dos componentes. Se ha demostrado que estímulos ambientales, provocan la autofosforilación de NodV proteína kinasa con la subsecuente transferencia del grupo fosfato a NodW, que es la otra proteína regulatoria del sistema. Es decir que la fosforilación de estas proteínas activan la expresión de los genes target (*nodYABC* operon de *B. japonicum*) (Loh et al., 1997).

Si bien la inducción de los genes *nod* por los flavonoides es necesaria para que ocurra la nodulación, esta es eficiente solo cuando los genes *nod* se expresan en los niveles, espacio y tiempo apropiados. Por este motivo el mecanismo regulatorio de los genes *nod* es complejo. Así, la adición de un activador positivo de genes *nod* activa una regulación negativa. En *B. elkanii* esta represión de los genes *nod* esta mediada por NodD2. En *B. japonicum*, NolaA y NodD2 forman un sistema de dos componentes que reprime los genes de nodulación. NolaA induce la expresión de NodD2 (Figura 1-7), que reprime la expresión de los genes de nodulación (Loh & Stacey, 2003).



**Figura 1-7:** Ilustración del modelo de regulación de genes *nod* en *B. japonicum* y sus componentes. Los genes *nod* son activados por NodD1 y NodVW, en respuesta a la genisteína y esto resulta en la síntesis de la señal Nod. La regulación negativa de los genes *nod* es mediada por NolaA y NodD2. NolaA regula a NodD2, que luego reprime la expresión de genes *nod*. Fuente Loh & Stacey, 2003.

El gen *nolA* fue clasificado como un gen-genotipo, es decir que regula la especificidad de *B. japonicum* y hace que los rizobios regulen cierto genotipos de soja y no otros (Sadowsky et al., 1991). NolA es un miembro de la familia de proteínas reguladoras transcripcionales MerR. Una característica única del gen *nolA* es que codifica tres proteínas funcionalmente distintas (NolA1, NolA2, NolA3) cada una de las cuales esta codificada por una misma secuencia pero sus transcriptos se originan en distintos sitios de iniciación ATG, es decir que hay tres marcos de lectura (Loh et al., 1999). La proteína NolA1 regula la expresión de los genes *nolA2* y *nolA3*, si bien las funciones no están del todo claras. Mientras que un alto nivel de expresión de NolA2 reduce la eficiencia de nodulación en soja, la expresión de NolA3 es esencial. Los resultados sugieren que es posible que la proteína NolA2 pueda modular la función de regulación de los genes de NolA3 (Loh & Stacey, 2003).

Una característica interesante de la familia de proteínas MerR es que regulan la expresión de genes en respuesta a la presencia de compuestos tóxicos. Considerando esto, es posible que el rol específico que esta proteína tiene con los genotipos de soja estén relacionados a que NolA regule la destoxificación de metabolitos producidos por algunos cultivares de soja (Sadowsky et al., 1991).

La proteína NolA1 también está relacionada con la expresión de NodD2. Así NolA y NodD2 formarían un sistema de regulación negativa de dos componentes que actúan sobre la expresión de los genes de nodulación (Loh & Stacey, 2003).

Cumple también un rol clave sobre la expresión en las bacterias de los genes de nodulación la regulación feedback. Esta usualmente ocurre en respuesta a productos finales de la biosíntesis, reduciendo la producción de los mismos. La expresión de los genes de nodulación de *B. japonicum* está regulada por un mecanismo feedback cuya señal son los factores Nod o algunos de sus componentes. Los factores Nod que sintetiza *B. japonicum* tienen un esqueleto de quitina tetramérico o pentamérico (Cohn et al., 1999). Solamente las señales Nod tetraméricas regularían en feedback a los genes de nodulación (Loh & Stacey, 2003). Una alta concentración de factores Nod tetraméricos producen un incremento de la expresión de *nolA* y *nodD2*, lo que resulta en la represión de *nodYABC* (Knight et al., 1986).

Por otro lado cabe mencionar que la rizósfera es un ambiente rico en nutrientes y por ello se encuentran grandes y numerosas poblaciones bacterianas. Considerando esto, no sorprende que los genes *nod* estén regulados por la densidad de la población

de rizobios, fenómeno conocido como quórum sensing (Loh et al., 2002; Pérez-Montaña et al., 2014). El quórum sensing (QS) ha sido descrito en bacterias Gram (+) y Gram (-) y ha sido definido como un modo de regulación de la expresión de genes bacterianos en respuesta a cambios en la densidad de población bacteriana, que son mediados por pequeñas moléculas señales difusibles llamadas autoinductores (Miller & Bassler, 2001). El estudio de la expresión de los genes *nod* ha revelado que estos genes son inducidos por genisteína cuando la densidad de población bacteriana es baja, y esta inducción se reduce significativamente cuando la densidad de población es alta. Esta aparente regulación QS sería mediada por las proteínas NolA y NodD2 que se acumulan con el incremento de la densidad de población (Loh et al., 2001; Loh et al., 2002).

El descubrimiento de que la expresión de genes *nod* es modulada por la densidad de bacterias, tiene implicaciones claras en la formulación y el uso de inoculantes. Una limitación al uso de inoculante de rizobios comerciales es la competencia que enfrentan los inoculantes de bacterias del suelo autóctonas. Aunque son cepas seleccionadas por su eficiencia en la nodulación y fijación de nitrógeno, estos inoculantes rara vez ocupan grandes porcentajes de nódulos. Un enfoque para superar esta competencia sería aplicar los inoculantes comerciales a altas densidades de población. Sin embargo, Lohrke et al. (2000) demostraron que niveles muy altos de *B. japonicum* aplicados como inoculante resultaron en una significativamente menor eficiencia de nodulación. Se ha demostrado que cuando los inoculantes se preparan con bacterias cultivadas en grandes fermentadores a altas densidades de población, contienen niveles elevados del inductor de NolA (Loh et al., 2001). Por lo tanto, es probable que estos inoculantes muestren una reducción de la eficiencia de nodulación debido a la acción de NolA y NodD2, lo que reduciría el nivel de expresión del gen *nod*. Si esto es cierto, entonces una cepa de *B. japonicum* insensible a la señal (quórum) NolA debe nodular mejor que la de tipo salvaje a alta densidad de población (López-García et al., 2002).

### *Fijación*

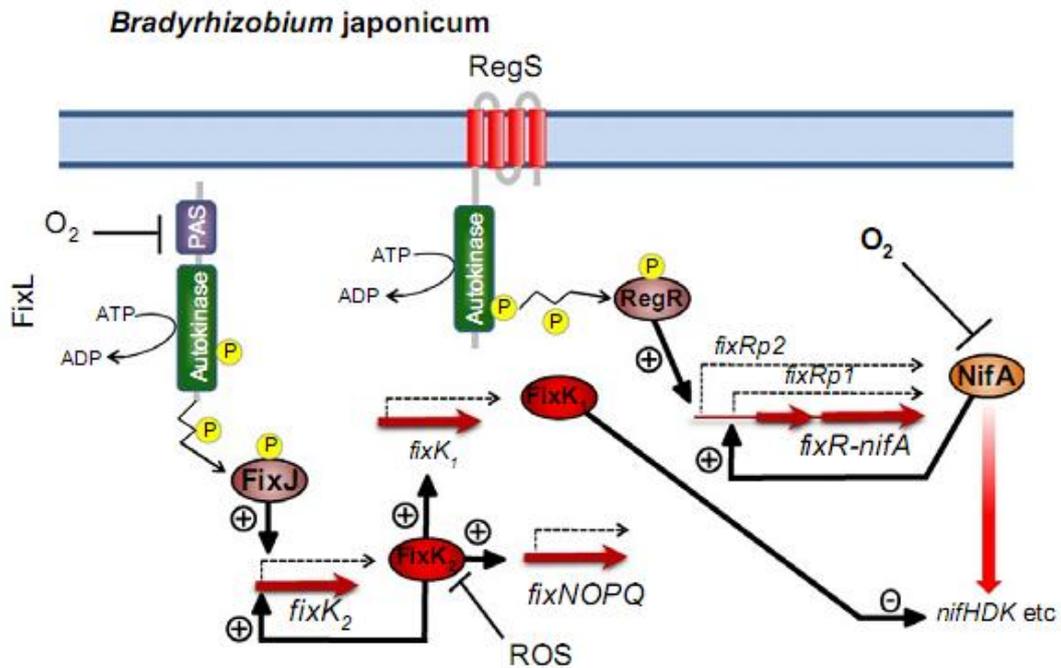
El proceso de fijación de nitrógeno que se desarrolla en el nódulo demanda mucha energía y por otro lado es un proceso sensible al oxígeno, por lo cual la expresión de los genes de fijación de nitrógeno ocurre solo en determinados ambientes.

En *B. japonicum* la transcripción de los genes de fijación está bajo el control de dos cascadas regulatorias interconectadas (Figura 1-8). La primera cascada regulatoria comienza con el sistema regulatorio de dos componentes FixLJ (Nellen-Anthamatten et al., 1998). FixL es una hemoproteína quinasa/fosfatasa unida a membrana. En bajas concentraciones de oxígeno ( $\leq 5\%$  O<sub>2</sub>), FixL es activado y fosforila a FixJ que luego activa la transcripción de genes blanco incluyendo el gen regulatorio clave *fixK<sub>2</sub>* (Terpolilli et al., 2012). La proteína FixK<sub>2</sub> activa genes esenciales para la simbiosis, la respiración micro-oxigénica y para el crecimiento anóxico desnitrificante; entre los que se incluyen *fixNOPQ*, *fixGHIS* y genes involucrados en la biosíntesis de grupos hemo. Además activa otros genes regulatorios tales como el factor  $\sigma^{54}$  (sigma) codificado por *rpoN<sub>1</sub>* y *fixK<sub>1</sub>*, y regula negativamente su propia transcripción (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Mesa et al., 2008).

La segunda cascada está bajo el control del sistema de dos componentes RegSR. RegS que sensa una señal hasta ahora desconocida y fosforila a RegR que induce la transcripción de varios genes incluyendo *nifA* (Lindemann et al., 2007). La actividad de la proteína NifA, en *B. japonicum*, es sensible a altas concentraciones de oxígeno. La proteína NifA es una metal-proteína regulatoria, en la que el metal (probablemente Fe<sup>+2</sup>) debe estar unido en la forma reducida con el fin de que NifA sea activa. Altas concentraciones de oxígeno o altos potenciales redox (positivos) podrían dar lugar a la oxidación del metal lo que conducirían a la inactivación de NifA (Morett et al., 1991).

La cascada RegSR-NifA controla directamente a los genes estructurales y regulatorios de la fijación de nitrógeno tales como los genes que codifican a las subunidades que componen el complejo de la nitrogenasa. Las dos cascadas regulatorias están unidas por el factor sigma RpoN (Terpolilli et al., 2012).

Este operon, RegSR-NifA, se expresa en niveles basales incluso en condiciones aeróbicas. Bajo condiciones microaeróbicas o cuando las células bacterianas se desarrollan en condiciones anaeróbicas con nitrato, la expresión del operon se incrementa hasta 5 veces. La proteína NifA auto-regula, directa o indirectamente, su expresión (Terpolilli et al., 2012).



**Figura 1-8:** Esquema regulatorio del operon *fixR-nifA* de *B. japonicum*. Las flechas rojas simbolizan los genes y las flechas de puntos representan su transcripción. Las flechas negras muestran la regulación con círculos que contienen (+) o (-) que indican la regulación positiva o negativa, respectivamente Fuente: Terpolilli et al, 2012.

### **Genes relevantes de la simbiosis**

El nombre “genes *nif*” hace referencia a genes estructurales y funcionalmente homólogos a los 20 genes *nif* que fueron identificados en *K. pneumoniae* (Arnold et al., 1988; Hennecke, 1990). Mientras que los “genes *fix*” denotan los primeros genes descritos que son esenciales para la fijación simbiótica de nitrógeno (Hennecke, 1990; Fischer, 1994). Actualmente el término *fix* es utilizado en un sentido más amplio, incluyendo genes que determinan funciones esenciales en el desarrollo y metabolismo del bacteroide.

Los genes *nif* y *fix* de *B. japonicum* están localizados en al menos dos clusters que se encuentran en dos regiones diferentes del genoma. La mayoría de los genes están acumulados en el cluster I y otros tres genes *nif* y *fix* están mapeados en el cluster II, adyacentes a al menos 10 genes de nodulación (*nod*), que son claves en las etapas tempranas de la nodulación (Fischer, 1994). En este cluster también se identificaron unos

pocos marcos de lectura abiertos cuyas funciones no están claras. La mayoría aunque no todos los genes *nif* y *fix* están agrupados en operones, formando parte de unidades de transcripción multicistricas: *nifDKENX*, *ORF118ORF73nifS*, *nifB-frxA*, *nifH*, *ORF35fixBCX*, *fixRnifA*, *fixA* (Hennecke, 1990).

Los genes *nifD* y *nifK*, son genes estructurales para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  del componente I de la nitrogenasa (proteína MoFe o dinitrogenasa) mientras que *nifH* codifica las dos subunidades idénticas del componente II (proteína Fe o dinitrogenasa reductasa). Los genes *nifB*, *nifE* y *nifN* están involucrados en la biosíntesis del cofactor hierro-molibdeno. Es interesante, que los genes *nifE* y *nifN* tienen homología con los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente. Además *nifD* y *nifK* son homólogos tal como lo son *nifE* y *nifN*. Esto refleja la función de los productos de los cuatro genes en la unión del cofactor de FeMo o precursores de este (Brigle et al., 1987; Fischer, 1994). El gen *nifS* parece contribuir a la función o estabilidad de la nitrogenasa (componente II), pero la función biológica de la proteína que codifica es desconocida (Ebeling et al., 1987). El rol del gen *nifX* en *B. japonicum* es desconocido, pero se sabe que en *K. pneumoniae* es probablemente un represor de la expresión de los genes de la nitrogenasa (Gosink et al., 1990). Los genes *fixB*, *fixC* y *fixX* (cluster I) y el gen *fixA* (cluster II) parecen estar restringidos a rizobios, y otros diazotrofos microaeróbicos y aeróbicos, pero no están presentes en *K. pneumoniae* (Fuhrmann et al., 1985; Gubler & Hennecke, 1986). El hecho de que el gen *fixX* codifique una proteína de transferencia de electrones similar a la ferredoxina ha llevado a sugerir que es probable que el producto de este gen esté involucrado en una reacción redox desconocida pero esencial para la actividad de la nitrogenasa (Gubler & Hennecke, 1986).

Actualmente se dispone de la secuencia de varios genomas completos. En todos los genomas publicados de *B. japonicum* se describe la presencia de una isla simbiótica integrada al genoma, que contiene los genes necesarios para la simbiosis dentro de la planta huésped. En el caso de USDA110, se conoce un segmento de 410 Kb con un bajo contenido de %GC (Göttfert et al., 2001), que concentra además de los genes simbióticos el 60 % de la secuencia de inserción (IS) descritas en todo el genoma (104 en total). La isla incluye una secuencia de 680 Kb (isla simbiótica A), y otra región adyacente con bajo contenido de % GC (59,2 %) conocida como una posible isla simbiótica B (Kaneko et al., 2002). En base a esto se ha postulado que la isla simbiótica ancestral pudo haber sido más grande y haberse dividido en dos por una reordenación del genoma (Kaneko et al., 2002). Una situación bastante similar a USDA110 fue encontrada en el genoma USDA6T.

Para USDA6T, se describe la presencia de una región de ADN de 695 Kb con bajo contenido de GC (59 %), con notables características compartidas con la de USDA110. Esta región incluye la mayor parte de los genes *nif* y un 45 % (45 de 69) de las secuencias de inserción descritas en su genoma se concentran en esta región simbiótica. Otra dos regiones con estas características (IS y bajo %GC) se describen en el genoma de USDA6T, lo que sugiere que una antigua isla simbiótica más grande pudo haberse dividido en tres más pequeñas (isla A de 695-kb en las coordenadas 7,920-8,614 Kb; isla B de 4-kb en las coordenadas 2,248- 2252 Kb, y la región de 164 Kb isla C en las coordenadas 9,114-0-70 Kb) (Kaneko et al., 2011).

Los genomas procariotas contienen una variedad de secuencias repetitivas, tales como elementos de inserción, rRNA operones, tRNA genes. Estas secuencias pueden contribuir a la evolución de la estructura de los genomas a través de rearrreglos tales como deleciones, duplicaciones e inversiones (Lupski & Weinstock, 1992). Kaluza y colaboradores (1985) describieron dos tipos diferentes de secuencias repetitivas RS ( $RS\alpha$  y  $RS\beta$ ) en el genoma de *B. japonicum*, con la estructura característica de los elementos de inserción de los procariotas. Estas RS son útiles para identificar aislados, debido a que la disposición y el número de estas RS dependen de la cepa (Kaluza et al., 1985; Minamisawa et al., 1992). De hecho la diversidad de perfiles encontrados en estudios de aislados de bradyrizobios ha sugerido que las agrupaciones por RS-fingerprints podrían usarse para definir la variabilidad en poblaciones alóctonas (Minamisawa et al., 1992). Estas regiones repetitivas se concentran en la isla simbiótica y ya se ha presentado evidencia de que una recombinación de  $RS\alpha$  resulta en la deleción de una larga región de ADN genómico (Hahn & Hennecke, 1987).

La presencia en la naturaleza de cepas de *Bradyrhizobium* con gran número de copias de estas regiones repetitivas y los rearrreglos encontrados en los genomas, ha sugerido su fuerte participación en la diversificación genética y la adaptación de las bacterias a ambientes específicos y así jugarían un papel importante en la evolución de las bacterias simbióticas (Minamisawa et al., 1998).

## ***Hipótesis y Objetivos:***

### *Hipótesis principal:*

Las regiones repetitivas están involucradas en cambios a nivel del genoma que podrían justificar las diferentes capacidades de fijación de nitrógeno, ya sea por cambios estructurales en los genes de nodulación y/o de fijación o por cambios que afectan la expresión de tales genes.

### *Objetivo general:*

Considerando que, hay una llamativa densidad de regiones repetitivas en el fragmento genómico de ADN que contiene a los genes de fijación de nitrógeno, que se han detectado rearrreglos naturales entre regiones repetitivas y que las bacterias aisladas de suelos con y sin historia del cultivo de la soja, difieren en su capacidad para fijar nitrógeno:

Se propone en este plan de trabajo identificar los cambios que a nivel del genoma o su expresión podrían explicar la alteración en el fenotipo de los rizobios.

### *Hipótesis derivadas:*

Los microorganismos establecidos en los suelos sufren adaptaciones al ambiente y adquieren capacidades diferentes con respecto a sus antecesores.

La presencia de rizobios en suelos donde fueron introducidos artificialmente, proviene exclusivamente de las cepas utilizadas en inoculantes comerciales que se han naturalizado, y por lo tanto son cepas estrechamente relacionadas.

Los fenotipos de las cepas naturalizadas en los suelos difieren de los fenotipos de las cepas a partir de las cuales se originaron.

Los aislados en estudio corresponden a distintas cepas de las especies *Bradyrhizobium japonicum* y *B. elkanii*.

Los fenotipos encontrados se corresponden con diferencias genotípicas.

En los rizobios que nodulan la soja se producen mutaciones en las secuencias de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno donde son abundantes las regiones repetitivas que podrían explicar los cambios en la capacidad de fijación de nitrógeno.

La capacidad diferencial de fijación de nitrógeno de los aislados es el resultado de la expresión diferencial de genes.

*Objetivos específicos:*

**Objetivo 1-** Caracterización fisiológica de los aislados que difieren en su capacidad de fijar nitrógeno.

**Objetivo 2 -** Identificar en los suelos con historia del cultivo de soja, aislados que difieran en su capacidad de fijación de N y establecer en base a diversos marcadores moleculares la relación de los rizobios aislados de los suelos con los que se han utilizado para formular los inoculantes comerciales.

**Objetivo 3-** Establecer en base a un análisis de restricción la existencia de cambios a nivel genético de las secuencias que codifican genes de nodulación y fijación de nitrógeno.

**Objetivo 4-** Profundizar el análisis y realizarlo en base a la secuencia de la isla simbiótica donde se localizan todos los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, de manera de determinar si se encuentran cambios en la secuencia de bases y/o rearrreglos considerables del genoma de las bacterias que difieren en su capacidad de fijación de nitrógeno.

**Objetivo 5-** Identificar en cepas que contrastan en la capacidad de fijar nitrógeno diferencias en la expresión de genes de la isla simbiótica.

***Capítulo 2: Caracterización  
fenotípica y simbiótica de aislados  
naturalizados.***

## **Introducción**

Los rizobios son bacterias saprófitas Gram (-) cuyo hábitat es el suelo, que con frecuencia se deben adaptar a diversos ambientes. Por eso cuando las condiciones del suelo son limitantes para su crecimiento, disminuyen su capacidad metabólica y exacerbando su capacidad de supervivencia. Los rizobios son bacterias heterótrofas y se multiplican en la rizósfera de las plantas debido a la alta disponibilidad de elementos nutritivos que se acumulan en ese ambiente (Myrold, 2005). Más aún, probablemente los rizobios están sujetos a estreses mayores en el momento en el que infectan las leguminosas y cuando dentro del nódulo fijan nitrógeno, por lo cual ambos procesos se ven fuertemente afectados por las condiciones ambientales (Downie, 2010). Una fijación de nitrógeno eficiente es el resultado de un complejo diálogo molecular entre los organismos simbioses que participan de la interacción, antes, durante y después de la invasión del microsimbionte (Fauvert y Michiels, 2008). Una de las características más relevantes de la simbiosis es la especificidad de los rizobios que nodulan solo un grupo de leguminosas. La especificidad está determinada por factores de las bacterias y de las plantas. Entre los factores bacterianos se pueden mencionar a los factores Nod, los polisacáridos de superficie (exopolisacáridos) y las proteínas secretadas (extracelulares) (Broughton & Perret, 1999). Las plantas por su parte, secretan compuestos de la familia de los flavonoides que juegan un rol importante en el establecimiento de una simbiosis efectiva con los rizobios (Cooper, 2004; Samac & Graham, 2007), siendo estos compuestos los que atraen a las bacterias hacia los pelos radiculares, estimulan su crecimiento e inducen la expresión de los genes *nod* y los genes que codifican el sistema de transporte S<sub>STT</sub> (Sistema de Secreción Tipo III) (Subramanian et al., 2006; Samac & Graham, 2007). Por otro lado, la eficiencia de la fijación simbiótica de N<sub>2</sub> depende también de muchos factores de la bacteria y de la planta. Entre las características que reflejan la eficiencia de la interacción están la biomasa de nódulos y la eficiencia de esa biomasa para fijar nitrógeno. La nodulación tiene para la planta un costo energético y por eso la planta regula el proceso que resulta en el desarrollo del número de nódulos que le proveen a la planta la manera de desarrollar la cantidad de N que ésta demanda, reduciendo así el costo energético del proceso. Se ha descrito que la planta de soja en presencia de un número de nódulos activos inhibe la formación de nuevos nódulos (Vasse et al., 1993; Mithöfer, 2002; Pérez-Giménez et al., 2011). Esto último indica que el genotipo de la planta controla o regula el número de nódulos (Xie et al., 2012). Como ya se ha mencionado la importancia del genotipo del rizobio está dada entre otras cosas por

su capacidad y eficiencia para fijar  $N_2$ , y por ello son determinantes de la eficiencia global de la simbiosis; sin dejar de mencionar que como todo proceso biológico está fuertemente influenciado por el ambiente en el que se desarrolla.

El uso tecnológico de la fijación biológica de nitrógeno ha conducido al desarrollo de la producción de inoculantes comerciales. Esto se hace en base a cepas seleccionadas en función de su capacidad de fijación, supervivencia, su adaptabilidad al agroecosistema donde se utilizará y su capacidad de competir en los suelos con poblaciones de bradyrizobios alóctonos para interactuar y nodular los cultivares de soja (Perticari et al., 2007; Barcellos et al., 2009; Pérez-Giménez et al., 2011). Estas características son entre otras, las de mayor interés cuando se seleccionan microorganismos para formular los inoculantes ya que se relacionan directamente con la eficiencia para producir un aumento en el rendimiento del cultivo.

La soja es una planta exótica en Argentina y por lo tanto nuestros suelos carecían de los rizobios específicos que interactúan con la soja. El cultivo de soja se expandió en gran parte del territorio de nuestro país a partir de la década del '70 y con la inoculación de los cultivos se adicionaron a los campos rizobios exóticos de los géneros *B. japonicum* y *B. elkanii* (Gómez et al., 1997; Piccinetti et al., 2013). Esto último probablemente contribuyó a que la inoculación tuviera un marcado efecto en el rendimiento de la soja, cuando las cepas seleccionadas no tenían competencia con cepas de rizobios alóctonas (Pérez-Giménez et al., 2011; Perticari et al., 2007; Althabegoiti et al., 2013). Debido a lo expuesto anteriormente los suelos con historia de cultivo de soja biofertilizados, contienen bradyrizobios que se han naturalizado (alóctonos). Barcellos y colaboradores (2007) han confirmado la existencia de transferencia horizontal de genes simbióticos entre cepas inoculantes y rizobios naturales en suelos de Brasil. Así cada vez que un nuevo gen es transferido desde un genoma es probable que le este confiriendo una ventaja adicional para colonizar y controlar el ambiente en el que viven (Davison, 1999). Es decir que los rizobios naturalizados representan una fuente de recursos genéticos y de diversidad biótica de la simbiosis rizobio-soja. A causa de la frecuente introducción de rizobios al suelo por medio de la inoculación, se ha generado una población de rizobios alóctonos que probablemente se encuentran en un proceso evolutivo y que por deriva genética y transmisión horizontal de genes, se están diversificando, resultando en una población muy diversa que posiblemente difiere en la eficiencia para nodular y fijar  $N_2$  (Barcellos et al., 2007; Althabegoiti et al., 2013). En los años 80, el INTA comenzó un programa de selección de cepas para la formulación de

inoculantes que buscaba identificar aislados o cepas infectivas, efectivas y capaces de adaptarse a nuestros suelos. Hoy el INTA recomienda a la cepa E109 como recurso para la formulación de los inoculantes comerciales. Se estima que el 47 % de los inoculantes están formulados con E109 y solo un 20 % con E109 y algún otro microorganismo seleccionado (González, 2007).

La identificación de cepas de rizobios con capacidades simbióticas superiores a las cepas comerciales es clave para aumentar la disponibilidad del elemento para la planta y así incrementar el rendimiento de los cultivos, si bien no es una característica determinante para la supervivencia de los rizobios o el establecimiento de la simbiosis. Es decir que probablemente los rizobios naturalizados sean heterogéneos en cuanto a la eficiencia de fijación de  $N_2$ . En cambio la capacidad de nodular podría ser un carácter adaptativo, dado que el nódulo es probablemente un ambiente menos agresivo para la bacteria (Peticari et al., 2007; Pérez-Giménez et al., 2011). Esto podría explicar porque, las poblaciones introducidas y naturalizadas suelen ser menos eficiente para fijar  $N_2$  pero no menos infectivas (Barcellos et al., 2009; Angelini et al., 2011). En este sentido, se ha detectado con frecuencia que las cepas seleccionadas que fijan  $N_2$  suelen ser menos competitivas que las poblaciones naturalizadas. Por ello, la inoculación es un proceso que se debe realizar considerando disponer sobre la semilla un alto número de células viables, lo que no conlleva a que el efecto de la práctica de la inoculación se evidencie a través de aumentos en el rendimiento (Peticari et al., 2007; Pérez-Giménez et al., 2011).

Los bradyrizobios que fijan  $N_2$  eficientemente suelen desarrollar menos nódulos y por ello estos suelen ser de tamaño mediano o grande, los que además se distribuyen mayoritariamente sobre la raíz principal (Appleby, 1984). En general, estos nódulos que fijan  $N_2$  eficientemente presentan un color rojo intenso en su interior, debido a la presencia de leghemoglobina (Arrese-Igor et al., 2011, Terpolilli et al., 2012). En contraposición, generalmente los bradyrizobios que fijan  $N_2$  con baja eficiencia inducen la formación de una mayor cantidad de nódulos que suelen ser más pequeños, y que se desarrollan principalmente en las raíces secundarias. Estos nódulos suelen tener en su interior un color apenas rosado que indica un menor contenido de leghemoglobina que habitualmente se ha asociado a una menor actividad (Somasegaran & Hoben, 1985). En síntesis, el peso seco de los nódulos (PSN), el número y la ubicación de los mismos en la raíz, refleja de alguna manera la eficiencia de la interacción e indirectamente la capacidad de fijar  $N_2$  (Terpolilli et al., 2012).

Una alta actividad de fijación de  $N_2$ , frecuentemente se refleja en un aumento en el rendimiento. Por ello, la cuantificación de la biomasa vegetal suele utilizarse como parámetro indirecto de la capacidad de fijar  $N_2$  (Somasegaran & Hoben, 1985, Grageda-Cabrera et al., 2003). Así, el peso seco de la parte aérea (PSA) es un criterio generalmente aceptado para estimar la capacidad de fijar nitrógeno de las bacterias, sobre todo cuando el cultivo se desarrolló en ausencia de fuentes alternativas de N, en cuyo caso cualquier diferencia de PSA reflejará diferencias de disponibilidad de N que proviene de la actividad de fijación de la nitrogenasa. Si bien este parámetro es válido, es afectado por variables independientes de la actividad nitrogenasa (Somasegaran & Hoben, 1985; Grageda-Cabrera et al., 2003). Entre los métodos directos de la cuantificación de la actividad nitrogenasa, se encuentra la medición de la reducción de acetileno ( $C_2H_2$ ) a etileno ( $C_2H_4$ ), catalizada por dicha enzima (Burris, 1974). La reacción catalizada por la nitrogenasa es la siguiente:  $C_2H_2 + 2H^+ + 2e^- = C_2H_4$ . Este ensayo – también denominado ARA por sus siglas en inglés, acetylene reduction assay– es utilizado desde 1968 (Hardy et al., 1968). La sensibilidad de este método, basado en la cromatografía gaseosa, permite incluso detectar bajos niveles de actividad de la nitrogenasa (Zuberer, 2005).

La interacción de la bacteria y la planta es específica y como ya se describió la infección de la leguminosa por los rizobios depende de un intercambio de señales moleculares. En este diálogo los polisacáridos de la superficie bacteriana juegan un rol importante, tanto en la nodulación como en la fijación de  $N_2$ . Se ha demostrado anteriormente que componentes de la superficie celular tales como exopolisacáridos (EPS), intervienen en los procesos de autoagregación y formación de biofilm que ocurre en los rizobios (Sorroche et al., 2012). Las biopelículas o biofilm se definen como comunidades bacterianas rodeadas por una matriz polimérica compuesta principalmente de EPS, producida por las mismas bacterias, y unidas reversiblemente a una superficie inerte o biótica (Costerton et al., 1995). Después de la unión a la superficie, las bacterias se multiplican, y las comunidades adquieren una estructura tridimensional, en algunos casos, permeadas por canales. Los canales actúan como un "sistema circulatorio", que permite que las bacterias intercambien agua, nutrientes, enzimas y señales, dispongan de metabolitos potencialmente tóxicos y mejoren la cooperatividad metabólica (Costerton et al., 1995; Stanley & Lazazzera, 2004). Sin embargo, es difícil trazar una línea definida entre los agregados simples y los biofilm que suelen estar conectados firmemente sobre una superficie. Los componentes bacterianos de superficie, en

particular exopolisacáridos, flagelos, y lipopolisacáridos, en combinación con la presencia de señales funcionales bacterianas, son cruciales para la formación de biofilm en todas las especies estudiadas hasta el momento (Pérez-Giménez et al., 2009; Rinaudi & Giordano, 2010). La autoagregación bacteriana es un proceso por el cual las bacterias interactúan físicamente entre sí y se depositan en la parte inferior en una suspensión líquida estática. La adhesión de las bacterias a diferentes superficies, y su autoagregación, pueden ser modulados por la regulación de la síntesis de EPS (Sorroche et al., 2010). Se ha encontrado que condiciones desfavorables de crecimiento o de baja actividad metabólica podrían inducir la agregación de bacterias que normalmente crecen de forma dispersa, no agregada. En este contexto, la autoagregación puede reflejar una estrategia de supervivencia que se activa bajo condiciones ambientales desfavorables (Bogino et al., 2013). Por otro lado, las bacterias que viven en el biofilm se ven beneficiadas entre otras cosas por la protección contra la desecación, y la exposición a sustancias antibacterianas y una mayor facilidad de adquirir nutrientes liberados en el entorno de la planta. Las biopelículas proporcionan sitios de supervivencia tanto para bacterias patógenas como para bacterias benéficas, otorgando protección y aumentando el potencial de las bacterias para sobrevivir y evolucionar en el entorno de la planta (Bogino et al., 2013).

Ambos procesos probablemente jueguen un rol ecológico en la supervivencia del rizobio en el suelo y probablemente en la fijación simbiótica, si bien esto parece no ser esencial en las fases tempranas de la infección (Sorroche et al., 2012). La mayor parte del tiempo los rizobios colonizan y sobreviven en el suelo, en la rizósfera o inclusive en comunidades complejas sobre la raíz. Es de esperar que la capacidad formadora de biofilm represente una estrategia importante de supervivencia en los suelos, generando además ventajas competitivas en la rizósfera. Debido a que la competencia por la rizósfera y por los sitios infectivos de la raíz es alta, cualquier estrategia adaptativa es probable conduzca a una colonización exitosa de la rizósfera o al establecimiento del microorganismo en el suelo, de manera de posicionarse ventajosamente para iniciar la simbiosis (Morris & Monier, 2003). La raíz produce exudados que constituyen una importante fuente de carbohidratos y otras moléculas, así como moléculas bioactivas que de alguna manera determinan el éxito o el fracaso de las poblaciones microbianas en la rizósfera. En cambio el suelo, tiene una baja proporción de fuentes de carbono, por eso la rizósfera resulta una región fértil para los microorganismos (Kennedy, 2005). Colonizar este nicho, rico en fuentes de carbono es clave cuando el objetivo es garantizar que en el

momento de iniciarse la nodulación, la bacteria adherida a la superficie de la raíz en el sitio correcto sea la seleccionada para la infección y formación del nódulo (Sorroche et al., 2012).

En virtud de todo lo expuesto surge claramente que la elección de cepas de rizobios para formular productos biológicos, debe realizarse considerando algunas características fisiológicas que probablemente puedan asegurar el éxito de la inoculación o conferirles ventajas frente a las cepas seleccionadas.

### **Hipótesis del capítulo**

*Los microorganismos establecidos en los suelos sufren adaptaciones al ambiente y adquieren capacidades diferentes con respecto a sus antecesores.*

*Los fenotipos de las cepas naturalizadas en los suelos difieren de los fenotipos de las cepas a partir de las cuales se originaron.*

### **Objetivo del capítulo**

*Caracterizar fenotípicamente aislados de *Bradyrhizobium* de suelo que provienen de una colección de aislados de suelos con distinto sistema de manejo.*

*Realizar una caracterización simbiótica de las cepas seleccionadas.*

## Materiales y métodos del capítulo

### 1. Especies y cepas bacterianas

En la tabla 2.I se presentan los aislados y las cepas de rizobios control incluidas en los ensayos realizados de esta tesis.

Tabla 2.I: Cepas bacterianas, características.

Cepa bacteriana	Características	Referencia
<i>B. japonicum</i> E109	Cepa salvaje, denominación anterior USDA 138. Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	INTA, Argentina
<i>B. elkanii</i> SEMIA587	Otra designación: BR 96, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	EMBRAPA, Brasil
<i>B. elkanii</i> SEMIA5019	Otra designación: 29 W, BR 29, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	EMBRAPA, Brasil
<i>B. japonicum</i> SEMIA5079	Otra designación: CPAC 15, DF 24, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	EMBRAPA, Brasil
<i>B. japonicum</i> SEMIA5080	Otra designación: CPAC 7, Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	EMBRAPA, Brasil
<i>B. japonicum</i> USDA 110	Cepa salvaje, Cm <sup>r</sup> , Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Dpto de Agricultura de EEUU (USDA)
<i>B. japonicum</i> 163	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 366	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 457	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 2112	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 2614	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 2615	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 115	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 665	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 458	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 9110	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 455	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina
<i>B. japonicum</i> 953	Aislado de suelo de nuestro laboratorio - Nod <sup>+</sup> , Fix <sup>+</sup>	Argentina

### 2. Cultivares de soja

Se emplearon semillas de soja DM 4670, las cuales son recomendadas para la zona núcleo sojera, centro-sur de Bs. As., ambientes de alta productividad del centro-sur de Córdoba y centro-sur de Santa Fe. Es una planta de Ciclo III largo (136 días) y hábito de crecimiento indeterminado.

### 3. Cultivos bacterianos

#### 3.1. Medios de cultivo

El medio que se utilizó para multiplicar y conservar a 4 °C las cepas de *Bradyrhizobium* fue el EMA – Extracto de levadura, Manitol (YEM, Vincent, 1970).

Tabla 2.II: Medio de cultivo EMA: pH 6,9

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g/l
NaCl	0,1 g/l
MgSO <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>7</sub>	0,2 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Manitol	5 g/l
Agar	16 %

Las suspensiones bacterianas se realizaron en el mismo medio al que no se le adicionó agar. La esterilización se realizó en autoclave durante 20 min a 120°C.

Otros medios de cultivo que se utilizaron en este trabajo fueron:

Tabla 2.III: Medio salino HM suplementado con L-arabinosa y Gluconato de sodio (medio AG)

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,125 g/l
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,25 g/l
NH <sub>4</sub> Cl	0,32 g/l
MgSO <sub>4</sub> .7 H <sub>2</sub> O	0,18 g/l
FeCl <sub>3</sub>	4 mg/l
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	13 mg/l
HEPES	1,3 g/l
MES	1,1 g/l
L-arabinosa	1 g/l
Gluconato de sodio	1 g/l
Extracto de levadura	1 g/l
Agar	16 g/l

Tabla 2.IV: TY (Tryptone yeast, Beringer, 1974)

Triptona	5 g/l
Extracto de levadura	3 g/l
CaCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub>	0,45 g/l
Agar	15 g/l

El medio se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min.

### 3.2. Antibióticos

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se hizo a partir de soluciones preparadas en agua desionizada (Km, Amp) o en agua-etanol al 50% que se conservaron en heladera. Las soluciones preparadas en agua se esterilizaron por filtración utilizando unidades Minisart® NML (Sartorius) con tamaño de poro de 0,2 µm.

Las concentraciones finales de los antibióticos precisados en los diferentes protocolos fueron:

Tabla 2.V: Antibióticos

Antibiótico	Concentraciones
Tetraciclina (Km, Roche)	15 mg
Rifampicina (Amp, Sigma)	30 mg
Eritromicina (Sm, Sigma)	5-30 mg
Ácido nalidíxico	5-30 mg
Cloranfenicol	5-30 mg

### 3.3. Condiciones de cultivo

Las distintas cepas de *B. japonicum* y *B. elkani* se multiplicaron a 28 °C en oscuridad en medio sólido o líquido, siendo su tiempo de generación en medio líquido de aproximadamente 5 días a 190 rpm, en agitador orbital.

### 3.4. Conservación de cultivos bacterianos

Los aislados se conservaron por congelación a -70 °C. Se utilizó como crioprotector glicerol en una concentración de aprox. 20 % (v/v); de manera que, a 250 µl de glicerol 87 % estéril dispuesto en criotubos, se le adicionaron 750 µl de cultivo bacteriano crecido en caldo EMA hasta fase logarítmica tardía - fase exponencial. Los viales se congelaron por inmersión en nitrógeno líquido y se almacenaron a una temperatura de -70 °C.

### 3.5. Resistencia a antibióticos, elevadas temperaturas y sales.

Se evaluó la capacidad de los aislados para crecer a temperaturas altas, se los sembró en placas de EMA-agar por triplicado, de forma tal de obtener colonias aisladas.

Uno de los triplicados fue incubado durante 10 días en estufa a 37 °C, mientras el otro fue incubado durante el mismo periodo a 28 °C. Las placas fueron observadas a los 3, 5, 7 y 10 días. Como referencia se utilizó la cepa E109.

También se procedió a evaluar la capacidad de los aislados para desarrollar en altas concentraciones salinas, para lo cual se los sembró en placas de EMA-agar suplementadas con dos concentraciones de NaCl (0,2 y 2 %). Las placas se incubaron durante 10 días a 28 °C y se realizaron observaciones a los 3, 5, 7 y 10 días.

#### 4. *Análisis de Exopolisacáridos (EPS)*

Se determinó la capacidad de los aislados de *Bradyrhizobium* para producir Exopolisacáridos (EPS) de acuerdo a lo descrito por Gancel & Novel 1994. Se crecieron cultivos bacterianos durante 72 hs y se determinó la cantidad de células bacterianas por medición de la densidad óptica a 625 nm ( $DO_{625nm}$ ). Luego se separó el sedimento celular de los mismos por centrifugación durante 15 min a 11000 rpm. La determinación se realizó en cultivos bacterianos crecidos en medio EMA (Tabla 2.II) y en medio mínimo (Tabla 2.III).

Los exopolisacáridos se removieron del sobrenadante por precipitación con el agregado de tres volúmenes de etanol 96 % y se incubaron a -20 °C por 24 hs, luego de lo cual se centrifugación a 15000 rpm por 20 min. El precipitado obtenido se resuspendió en 500 µl de agua destilada estéril. Los EPS fueron determinados por el método fenol-sulfúrico descrito por Dubois (1956). El método fenol-sulfúrico consistió en el agregado de 200 µl de fenol 5 % (v/v) a 100 µl de muestra diluida con 100 µl de agua destilada, e inmediatamente se adicionó 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Posteriormente las muestras se incubaron 10 min en reposo. Transcurrido este tiempo los tubos se agitaron en vortex y se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min. Tras la incubación se determinó la absorbancia de las muestras en cubetas de vidrio a una longitud de onda de 580 nm. Como control se usaron 200 µl de agua destilada estéril que siguieron el mismo protocolo que las muestras en estudio.

Debido a que la composición de EPS fue desconocida, los resultados se expresaron en microgramos de dextranos equivalentes por unidad de densidad óptica a 580 nm. Los datos obtenidos fueron relativos a una curva de calibración realizada con soluciones de glucosa de concentración conocida (0, 20, 40, 60, 80 y 100 ppm) con la misma metodología usada para las muestras. Cada experimento fue realizado por

triplicado y cada extracto de EPS se realizó por duplicado, de modo que se trabajó con dos replicas biológicas y tres replicas técnicas.

##### 5. *Ensayo de formación de biofilm*

La formación de biofilm se determinó macroscópicamente en un ensayo cuantitativo en microplaca de 96 pocillos, en el que los biofilm fueron teñidos con cristal violeta (CV), basado en un método descrito por O'Toole y Kolter (2000), con modificaciones. Las bacterias fueron crecidas en 2 ml de medio EMA e incubadas con agitación por 48 h a 28 °C. Los cultivos fueron diluidos con medio fresco y llevados a una  $DO_{630nm}$  de 0,1. Cien microlitros de la suspensión fueron agregados en cada pocillo y la placa se incubó en agitación por 24 hs a 30 °C. El crecimiento bacteriano se cuantificó por  $DO_{630nm}$ . Las células no adheridas fueron removidas, y se agregó 180  $\mu$ l de solución acuosa de CV (0.1 %, p/v), lo que se incubó por 15 min. Cada pocillo se lavo con agua y luego se agregó a la biopelícula 150  $\mu$ l de etanol 96 %. EL CV solubilizado fue medido por DO a 560 nm en un lector de microplacas, MicroELISA Auto Reader (series 700 microplate reader; Cambridge Technology). En paralelo, cultivos control fueron medidos en medio EMA (Sorroche et al., 2012). La formación de biofilm se informó como  $DO_{560nm} / DO_{630nm}$ .

##### 6. *Ensayo de autoagregación bacteriana*

La autoagregación bacteriana se determinó como lo describe Sorroche et al. (2012). Las bacterias fueron crecidas en 2 ml de medio TY e incubadas a 28 °C durante 5 días, luego se diluyeron 1/100 en medio TY fresco y se incubaron por 72 horas en las mismas condiciones. Las suspensiones bacterianas (5ml) fueron transferidas a tubos de vidrio estériles y conservados estáticos por 96 hs a 4 °C. Una alícuota de 0,2 ml de la parte superior de la suspensión se transfirió a un pocillo en microplacas y se determinó la densidad óptica final a 630 nm ( $DO_{final\ 630nm}$ ). Un control fue agitado en vortex durante 30 segundos y se transfirió una alícuota de 0,2 ml a la microplaca, la DO de esta alícuota constituyó la DO inicial a 630 nm ( $DO_{inicial\ 630nm}$ ). Luego el porcentaje de autoagregación se calculo para cada aislado como:

$$100 \times [1 - (DO_{final} / DO_{inicial})]$$

Las determinaciones para cada aislado bacteriano se realizaron por quintuplicado y se analizaron por análisis de la varianza (ANOVA), usando el test de Tukey 0,05 %.

### 7. Inducción con exudados de semilla sobre Biofilm y Autoagregación.

La misma determinación de formación de biofilm y del porcentaje de autoagregación bacteriana se realizó en dos ensayos independientes, induciendo los cultivos con exudados de semillas de soja compuestos principalmente de Isoflavonoides, durante las 96 hs previas a la determinación de DO en microplacas.

#### *Extracción de exudados semillas de soja (Isoflavonoides-IF).*

La extracción de isoflavonoides se realizó colocando una muestra de 2 g semillas en frascos con tapa a rosca de 100 ml. Como solvente de extracción se empleó una mezcla de metanol-agua (80:20). Se agitó durante 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente la muestra fue filtrada al vacío. El extracto fue cuantificado por espectrofotometría a 258 nm de longitud de onda. La concentración de IF en la solución se determinó utilizando el coeficiente de absortividad molar  $\epsilon^{\circ} = 26830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  y la fórmula de Lambert-Beer  $C = A [M] / \epsilon^{\circ} (\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}) d (\text{cm})$ , donde  $C$  es la concentración molar,  $A$  la absorbancia medida y  $d$  es la distancia en cm que recorre el haz de luz (Barnes et al., 1994).

Los Isoflavonoides extraídos fueron utilizados en ensayos posteriores en los que se realizó la inducción de cultivos bacterianos con una concentración final de  $1 \mu\text{M}$  de IF en el medio de cultivo. En todos los casos en los que se realizó la inducción con IF resuspendidos en el solvente de extracción (Metanol/agua 80:20) se incluyeron cultivos controles a los que se les adicionó el mismo volumen del solvente de extracción con el que se indujeron los cultivos con IF.

### 8. Supervivencia bacteriana

Un mililitro de cultivo ( $3,2 \times 10^8$  ufc/ml) fue aplicado a 50 g de semillas de soja ( $320 \pm 1$  semillas). Las semillas se recubrieron uniformemente con la mezcla formada por el cultivo bacteriano y un protector generalmente incluido en los inoculantes comerciales, se agitaron durante 30 s para favorecer el contacto en frascos estériles de 50 ml. Luego las semillas secas se colocaron en placas de Petri estériles y se almacenaron a temperatura ambiente ( $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A diferentes tiempos posteriores a la inoculación de las semillas, la supervivencia fue determinada por lavado de las bacterias adheridas en la superficie de una muestra de 10 semillas con agua destilada. Se realizaron las diluciones adecuadas del agua de lavado de las semillas y se plaquearon alícuotas de la misma en

medio EMA. Luego de 7 días de incubación a 30 °C se determinó el número de ufc que desarrollaron en placa. Los microorganismos contaminantes presentes en las semillas fueron fácilmente identificados por morfología de colonia, color y rápido crecimiento. Los valores de supervivencia fueron calculados basados en el número conocido de bacterias con el que se inocularon las semillas y el número de ufc recuperadas de una muestra de 10 semillas en cada determinación temporal.

Los resultados se expresaron como el factor de recuperación porcentual (FRP), definido como el valor resultante del número de bacterias recuperadas por semilla en relación al número teórico de bacterias inoculadas en cultivo a las semillas ( $1 \times 10^6$  ufc.semilla<sup>-1</sup>). El FRP fue calculado usando la siguiente ecuación (Penna et al., 2011):

$$\text{FRP (\%)} = R_n [\text{ufc.semilla}^{-1}] \cdot (T [\text{ufc.semilla}^{-1}])^{-1} \cdot 100$$

Donde  $R_n$  es el número de bradyrizobios recuperados por semilla al tiempo  $n$  de incubación y  $T$  es el número teórico de bradyrizobios provistos por inoculación a la semilla.

#### 9. Capacidad de fijación de nitrógeno

Se realizaron ensayos de inoculación con el objetivo de confirmar en los cultivos puros la capacidad efectiva de formación de nódulos y fijación de nitrógeno de cada aislado. En cada ensayo se utilizaron semillas de cultivares de soja que previo a la inoculación se esterilizaron superficialmente tratándolas con etanol 50 % (v/v) durante 3 min y solución de hipoclorito de sodio diluido (25 %, v/v) por 3 min, seguido por sucesivos lavados con agua destilada estéril. Las semillas se colocaron en diferentes recipientes dependiendo del ensayo usando como soporte vermiculita estéril.

Cada aislado de *Bradyrhizobium* fue crecido en medio EMA líquido hasta fase exponencial de crecimiento lo que se obtuvo aproximadamente a las 144 hs de cultivo en agitación a 150 rpm, y a partir de este cultivo se prepararon diluciones con una concentración final de  $10^7$  ufc ml<sup>-1</sup> de cada bacteria para la posterior inoculación de las semillas. Las semillas de soja fueron inoculadas con una alícuota de 1 ml de estas diluciones de cultivo. Las plantas se regaron con solución nutritiva libre de nitrógeno (Solución Jensen 1X).

La capacidad de fijación de nitrógeno fue evaluada en experimentos que se desarrollaron en invernáculos, estos se realizaron con un diseños enteramente al azar

con 10 replicas por tratamiento. A los 30 días posteriores a la emergencia de las plantas se realizaron evaluaciones en términos de peso seco aéreo y recuento y peso seco de nódulos. (Barcellos et al., 2007). Además se determinó la actividad nitrogenasa sobre seis plantas de cada tratamiento, por medio del ensayo de la reducción del acetileno. Un ml de muestra se analizó con un cromatógrafo de gases Konic 3000 equipado con una columna de 1/8 pulgadas por 6 pies de largo, rellena con Porapak Q y equipado con un detector de ionización de llama. Los resultados se expresaron en nmoles de etileno producido por mg de PSN y por hora.

Tabla 2.VI: Solución nutritiva libre de N - Solución Jensen (50X)

CaHPO <sub>4</sub>	1 (g/l)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,2 (g/l)
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,2 (g/l)
NaCl	0,2 (g/l)
FeCl <sub>3</sub>	0,1 (g/l)
Solución de elementos trazas	1 ml

#### 10. Distribución de nódulos en la raíz

El ensayo consistió en un test de inoculación como se describe en el apartado 4 de este capítulo. La distribución de nódulos en las raíces primarias y secundarias se determinó a los 20 días de a la emergencia de las plantas inoculadas. Se contaron los nódulos en los 2,5 cm superiores de la raíz, diferenciando la ubicación de los mismos en la raíz primaria y las raíces secundarias.

#### 11. Infectividad y nodulación

Tan relevante como la capacidad de supervivencia de los aislados evaluada sobre semillas, es confirmar que las cepas conserven su eficiencia para nodular las raíces. Con esta finalidad, luego de evaluar la supervivencia como se describió en el apartado anterior, se esperó recuperar las bacterias sobrevivientes en las semillas de soja que cumplieron la función de “plantas trampa”, mediante la formación de nódulos en sus raíces (Hungria y Araujo, 1994).

De manera que en aquellos tratamientos con mayor número de rizobios luego del tiempo de almacenado (mayor capacidad de supervivencia), se esperó obtener mayor número de nódulos en las raíces, asimismo la ubicación de los nódulos (raíz primaria o raíz secundaria) serían un indicio sobre velocidad de infección.

Las semillas inoculadas se almacenaron en cámara con condiciones de temperatura, humedad y luz controladas. Posteriormente se sembraron 12 semillas de soja en macetas individuales como se describe en el test de fijación de nitrógeno a los 7 y 14 días de inoculadas. El ensayo consistió en 17 tratamientos inoculados con cada uno de los aislados y un tratamiento control sin inocular, cada uno con 12 repeticiones evaluadas a dos tiempos de ensayo.

A los 20 días posteriores a la siembra se realizó el recuento de nódulos en la raíz primaria.

### *12. Tolerancia al glifosato*

Se evaluó la tolerancia al glifosato (isopropilamina de N-fosfonometilglicina) suplementado al medio de cultivo de 7 aislados de suelo y las tres cepas comerciales de *Bradyrhizobium*: *Bradyrhizobium elkanii* (SEMIA 587) y dos *B. japonicum* (E 109 y SEMIA 5080) (dos Santos et al., 2005). Cada cepa fue inoculada en medio EMA líquido suplementado con tres concentraciones del componente activo del glifosato (0,114, 0,227 y 0,454  $\mu\text{M}$ ). Se utilizó un tratamiento control sin el agregado del herbicida.

El diseño experimental consistió en 4 tratamientos con tres repeticiones y dos determinación a los 3 y 7 días posteriores a la inoculación. Cada cepa fue analizada individualmente.

Las soluciones de glifosato fueron diluidas en agua destilada y filtradas con filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro (Millipores). El crecimiento bacteriano se determinó por medición de la densidad óptica a 625 nm y las unidades de DO se transformaron a su equivalencia en unidades formadoras de colonias (ufc) a partir de las respectivas curvas de crecimiento bacteriano.

Las curvas de crecimiento bacteriano fueron realizadas para cada cepa a los largo de 168 h de crecimiento y se analizaron por análisis de la varianza (ANOVA), usando el test de Tukey 0,05 %.

### *12.1. Efecto del glifosato sobre la nodulación y fijación de $N_2$ .*

Se realizó un ensayo de inoculación como se describe en el apartado 9 de este capítulo, con el objetivo de confirmar en los cultivos puros la capacidad efectiva de formación de nódulos y fijación de nitrógeno cuando las plantas fueron asperjadas con glifosato (0,114  $\mu\text{M}$  del componente activo). Las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y a un grupo de plantas se les realizó dos aplicaciones (14 y 21 días).

Por cada aislado de los seleccionados con el primer ensayo de nodulación (115, 665, 9110, 163, 366, 2112 y 953) e incluyendo las cepas E109, SEMIA 587 y SEMIA 5080, se inocularon 12 plantas. Estas doce plantas fueron divididas en 4 tratamientos para la aplicación de glifosato. Los tratamientos incluyeron un grupo de plantas sin aplicación de glifosato que se consideraron testigo de este ensayo para cada cepa inoculada, con el objetivo de contrastar los resultados de las tres diferentes aplicaciones foliares del herbicida.

### *13. Análisis estadísticos.*

El análisis de los datos provenientes de las medidas de producción de EPS, biofilm, autoagregación y supervivencia bacteriana se realizó mediante análisis de la varianza (ANOVA). En el ensayo de fijación de nitrógeno se utilizaron tanto un análisis de varianza según un diseño en bloques completamente aleatorizados (DCBA), como un diseño completamente aleatorizados (DCA). Para establecer entre que medias existían diferencias significativas se utilizó el test de Tukey.

## **Resultados del capítulo**

### *Características fenotípicas*

En este trabajo se seleccionaron para trabajar doce aislados que forman parte de una colección de aproximadamente 200 rizobios provenientes de suelos bajo distintos sistemas de manejo (Pastorino, comunicación personal). Este grupo de cepas bacterianas fijadoras de nitrógeno se seleccionaron sobre la base de su interacción con plantas de soja de un cultivar comercial. El subgrupo de 12 cepas fue aislado de diluciones de suelos trabajados con siembra directa y cuyo cultivo antecesor también fue soja. Ocho de estos aislados (2614, 2615, 163, 366, 458, 2112, 455 y 953), desarrollaron en medio EMA suplementado con rojo congo dando colonias de alrededor de 3 mm de diámetro de apariencia y mucosidad semejante a la de las cepas control de *B. japonicum* (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080). Los restantes cuatro aislados (115, 665, 457 y 9110), desarrollaron en las mismas condiciones y tiempo de incubación (7 días), colonias translúcidas más pequeñas como las cepas control de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019.

### *Resistencia a antibióticos, elevadas temperaturas y concentración de sal.*

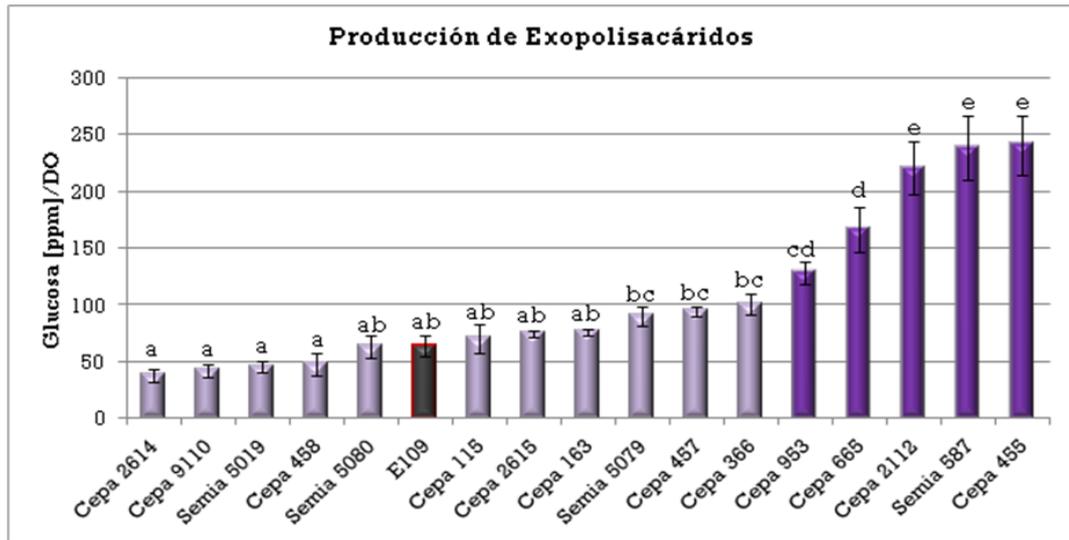
Entre los antibióticos que se ensayaron se agrupan dos tipos: los que inhiben la función ribosomal como el cloranfenicol (también eritromicina y tetraciclina), que actúa inhibiendo la formación de uniones peptídicas al bloquear la enzima peptidil transferasa; y antibióticos que inhiben la síntesis de ácidos nucleicos, ya sea inhibiendo la ARN polimerasa como lo hace la rifampicina o inhibiendo la replicación del ADN por unión con la ADN girasa como es el caso del ácido nalidíxico.

La mayoría los aislados bacterianos fueron resistentes a los antibióticos ensayados. SEMIA587 y 455 mostraron un halo de inhibición de 5 mm con rifampicina (5 mg) y la cepa 9110 fue inhibida por el ácido nalidíxico (30 mg).

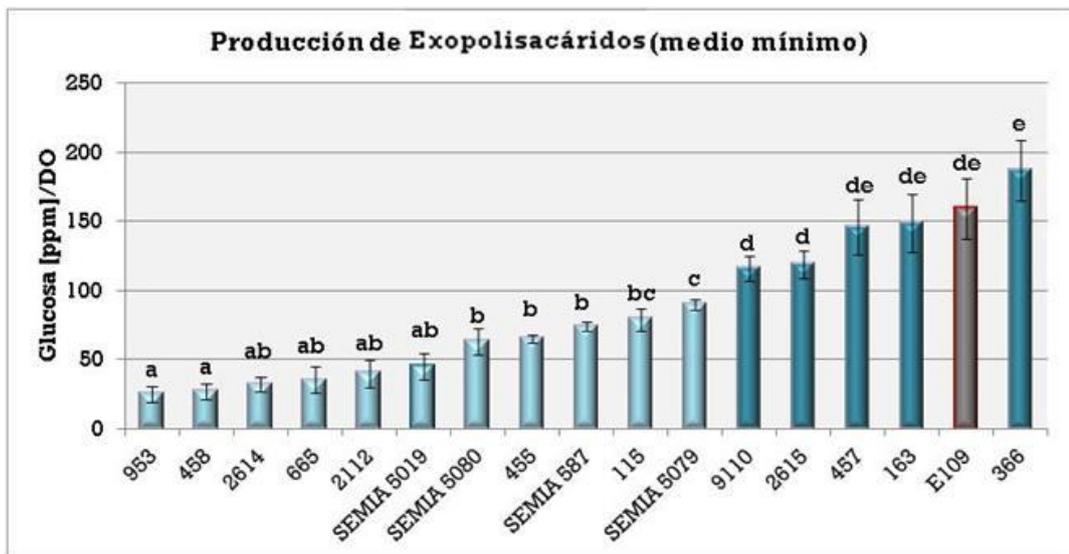
Todos los aislados fueron sensibles a temperaturas de 37 °C y 40 °C y a la presencia de 0.2 y 2 % de NaCl, condiciones en las que no desarrollaron.

*Producción de Exopolisacáridos (EPS)*

En la figura 2-1 se presentan los datos de producción de EPS de bacterias cultivadas en medio EMA suplementado con 2 g/l de extracto de levadura. Un grupo de aislados, 953, 665, 2112, SEMIA587 y 455, produjeron una cantidad de EPS mayor que la cepa control E109. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas entre la producción de EPS de E109 y el resto de los aislados (Tukey  $p < 0,05$ ).



**Figura 2-1:** Producción de EPS expresada en partes por millón de glucosa producida por unidad de DO de cultivo.

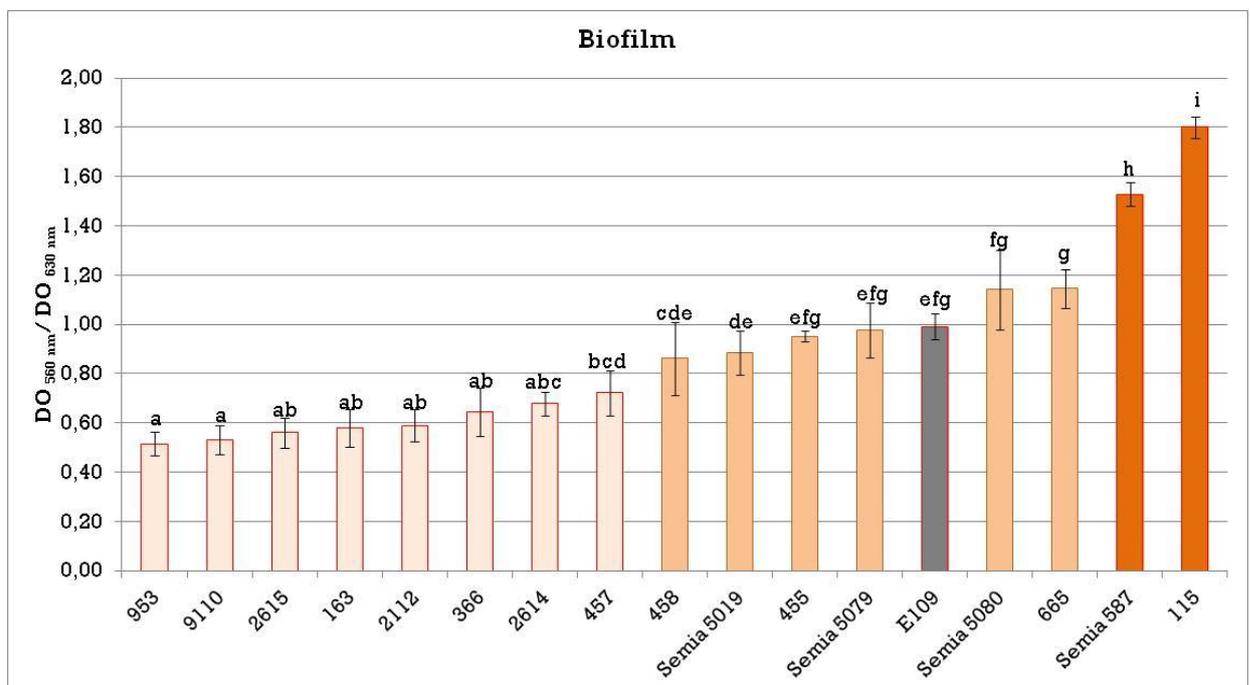


**Figura 2-2:** Producción de EPS expresada en partes por millón de glucosa producida por unidad de DO de cultivo de los aislados crecidos en medio mínimo.

En medios de cultivo con bajos niveles de fuente carbonada se observó que los aislados 366, 9110, 2615, 457, 163 y el control E109 produjeron más EPS (Figura 2-2). El resto de las cepas disminuyeron la producción excepto 115 y las SEMIA5019, SEMIA5079 y SEMIA5080 que no modificaron la cantidad de EPS producidos.

### Formación de biofilm

Se encontró que solo un aislado de suelo y la cepa de referencia SEMIA587 mostraron una capacidad de generación de biofilm superior a la cepa E109. Además, la formación de biopelícula en general fue menor para los aislados 953, 9110, 2615, 163, 2112, 366, 2614 y 457, que para la cepa control E109 (Figura 2-3). Dentro del grupo de cepas con mayor producción de biofilm solo dos, 115 y SEMIA587 se destacaron por una mayor producción de EPS. Sin embargo no se observó una relación directa entre la mayor producción de EPS de cepas como 2112 y 953 y la formación de biofilm, que fue significativamente menor para estas cepas que en E109.



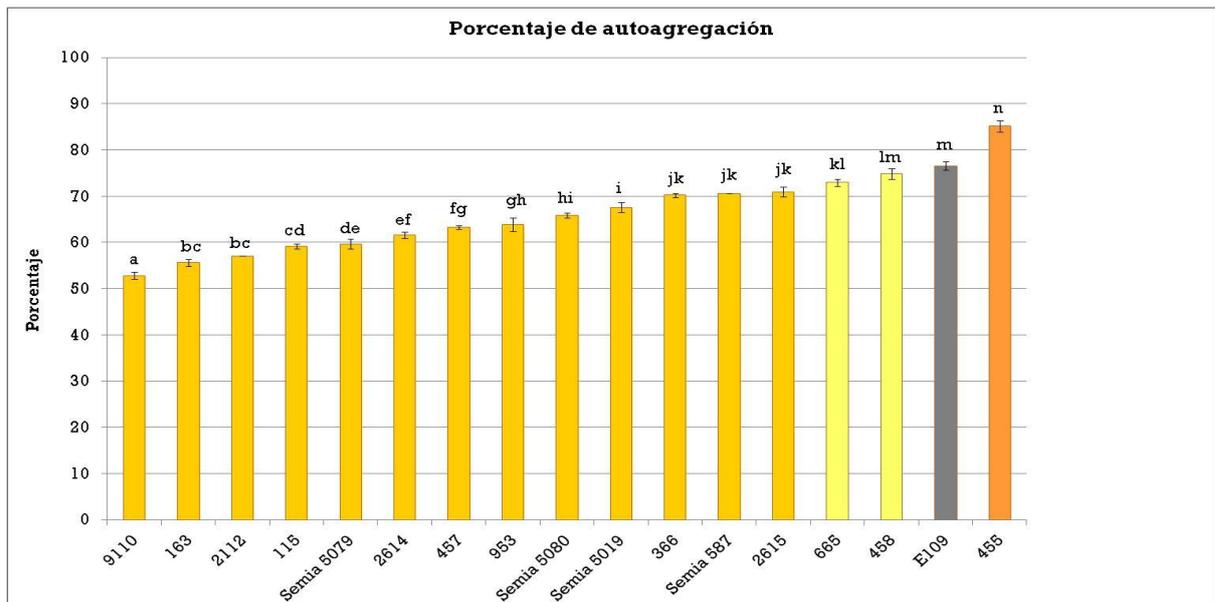
**Figura 2-3:** Formación de biofilm sobre la superficie de una placa, expresada como la relación  $DO_{560\text{ nm}}/DO_{630\text{ nm}}$ .

### Porcentaje de autoagregación bacteriana

Tal como se puede observar en la figura 2-4 la autoagregación fue también un carácter variable en los aislados evaluados.

Mientras que el aislado 455 demostró una capacidad de autoagregación superior, el 458 se comportó de manera similar a la cepa E109. El resto de los aislados de suelo, así como también las cepas SEMIA, mostraron un porcentaje de autoagregación significativamente menor que la cepa control.

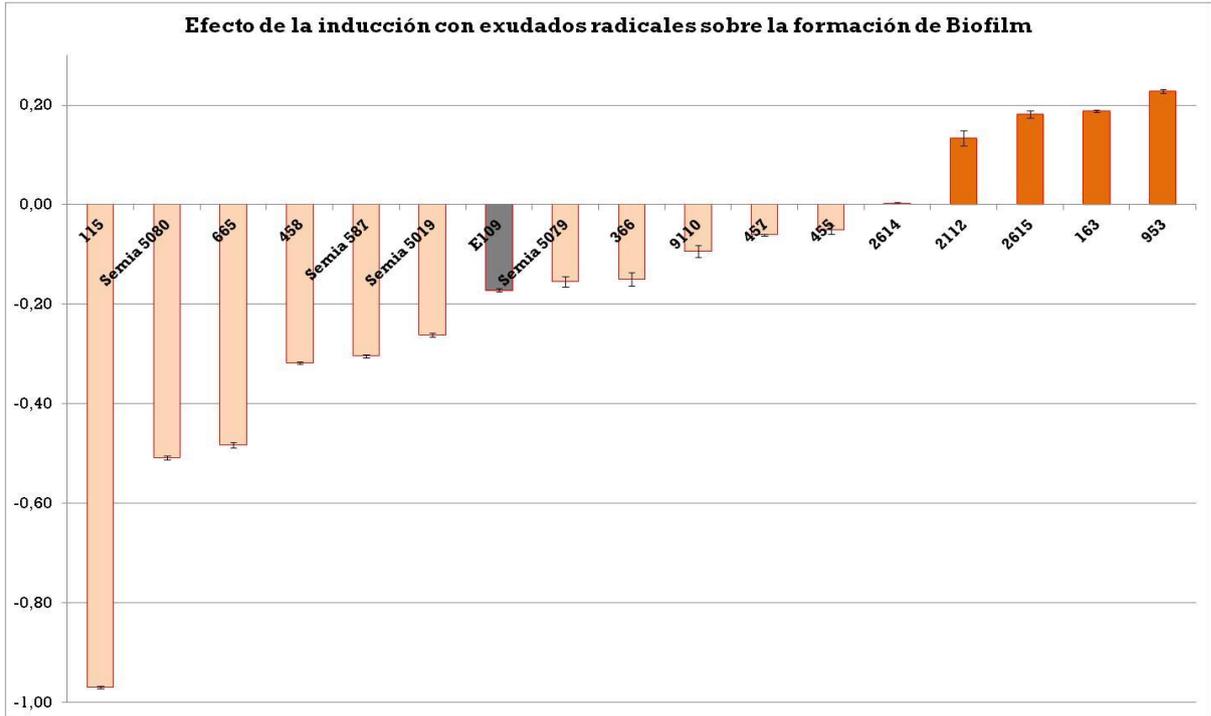
Entre los aislados que mostraron una capacidad de autoagregación superior al 70 % (366, SEMIA587, 2615, 665, 458, E109 y 455), los aislados 665, 455 y la cepa control SEMIA587 se destacaron además por una mayor producción de EPS.



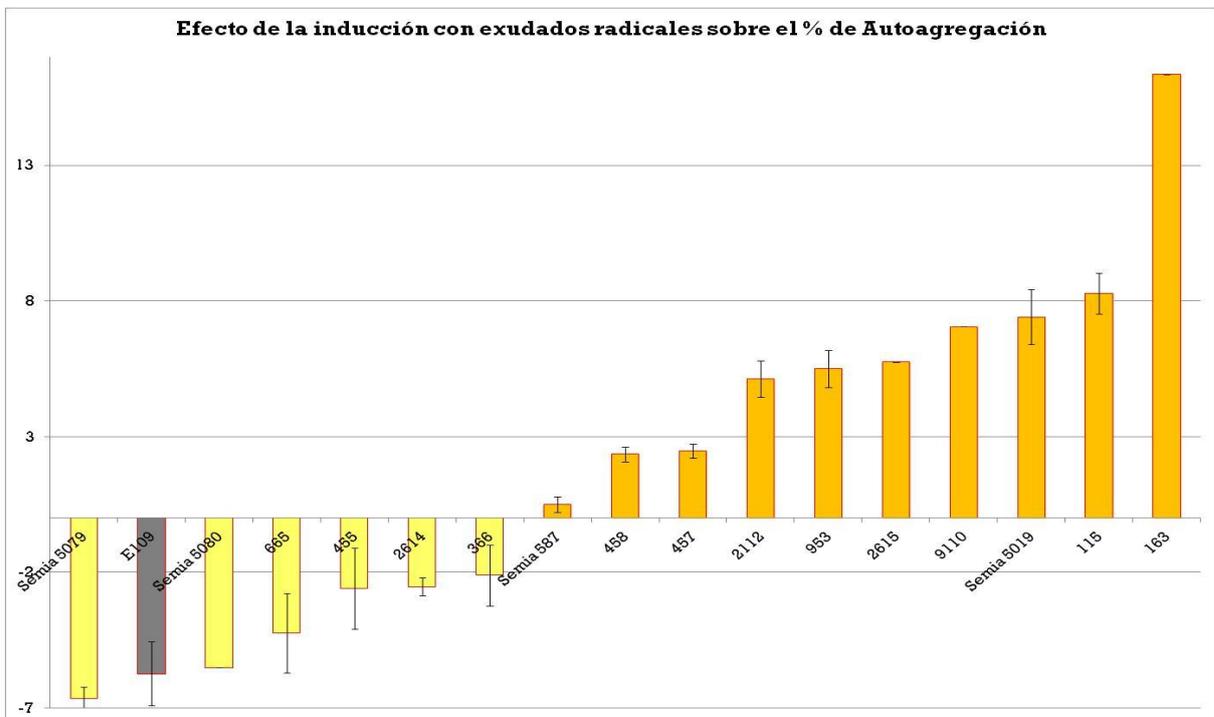
**Figura 2-4:** porcentaje de autoagregación de las cepas en cultivos estáticos.

### Inducción con IF: Autoagregación (AA) y formación de biofilm.

La inducción de los cultivos bacterianos con extractos metanólicos de semillas de soja, solo modificó la formación de biofilm en los aislados 2112, 2615, 163 y 953 (Figura 2-5). Para el resto de las cepas, así como también las cepas E109 y SEMIA la presencia de exudados de semilla provocó una reducción del biofilm. En cambio en presencia de exudados, el porcentaje de autoagregación (Figura 2-6), aumentó para las cepas SEMIA de *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019) y 458, 457, 2112, 2615, 953, 9110, 115 y 163.



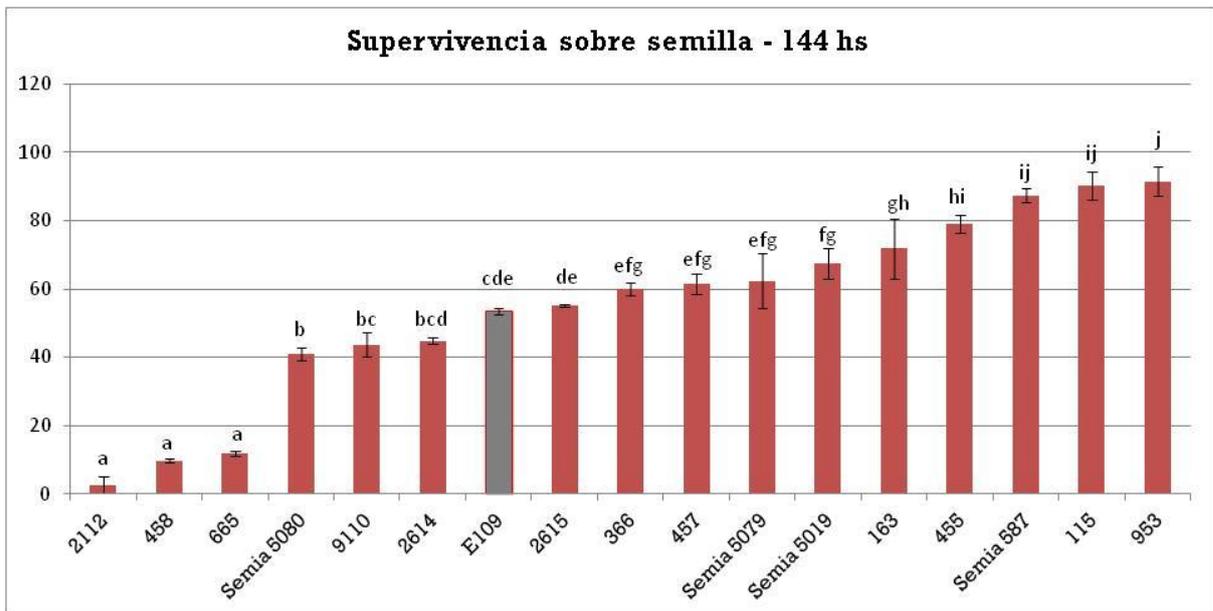
**Figura 2-5:** Efecto de la inducción con exudados radicuales sobre la formación de biofilm.



**Figura 2-6:** Efecto de la inducción con exudados radicuales sobre la autoagregación.

### Supervivencia sobre semillas

La supervivencia de los rizobios sobre la superficie de la semilla es una característica clave para aumentar la eficiencia de infección. Esto se determinó haciendo un recuento de las unidades formadoras de colonias (UFC) que se recuperaron a partir del lavado de la superficie de semilla inoculada. Se encontró que a las 144 hs de la inoculación, el número de bacterias recuperadas de la superficie de la semillas se redujo a un promedio menor al 20 % (FRP – Factor de Recuperación Porcentual) para las cepas 665, 2112 y 458 (Figura 2-7) y a partir de este tiempo, el FRP de las mismas decreció hasta 2 % a las 348 hs posteriores a la inoculación (Figura 2-8).

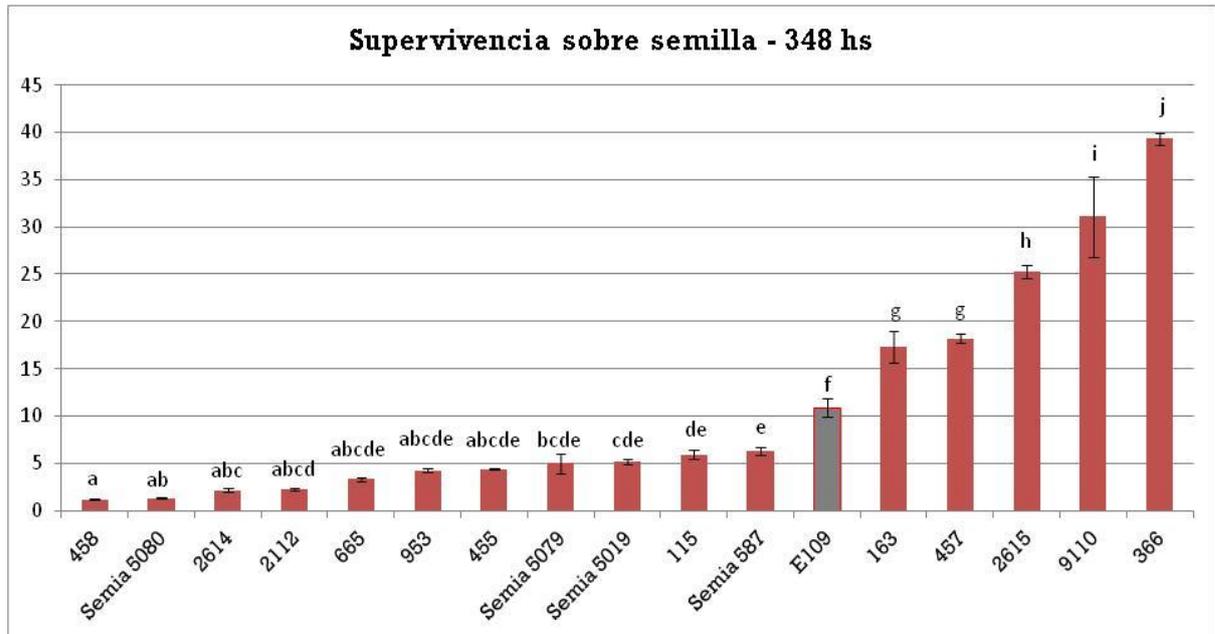


**Figura 2-7:** Supervivencia bacteriana sobre la superficie de la semilla a las 144 hs de almacenamiento, expresada como factor de recuperación porcentual.

El resto de las cepas estudiadas, 9110, 115, 455, 163, 366, 2615, 953, 2614, 457, y los controles SEMIA587, SEMIA5019, SEMIA5079, SEMIA5080 mostraron un comportamiento similar a la cepa E109 a las 144 hs en las cuales los FRP variaron entre el 40-80 %.

Después de 348 hs, todas las cepas presentaron un FRP entre 2-12 % a excepción de las cepas 163, 457, 2615 y 9110 que mostraron un FRP entre 15 - 30 % lo que sugiere

que estas tienen una mayor capacidad de supervivencia en la superficie de la semilla. La cepa 366 luego de 348 hs tuvo un factor de recuperación de 40 %, característica que la diferencia del resto de los aislados.

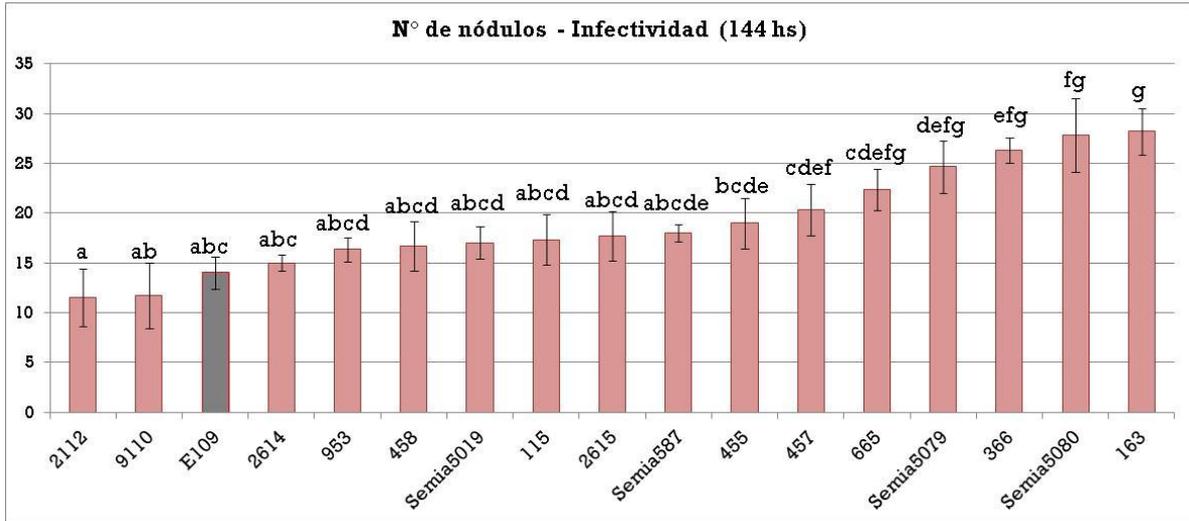


**Figura 2-8:** Supervivencia bacteriana sobre la superficie de la semilla a las 348 hs de almacenamiento, expresada como factor de recuperación porcentual.

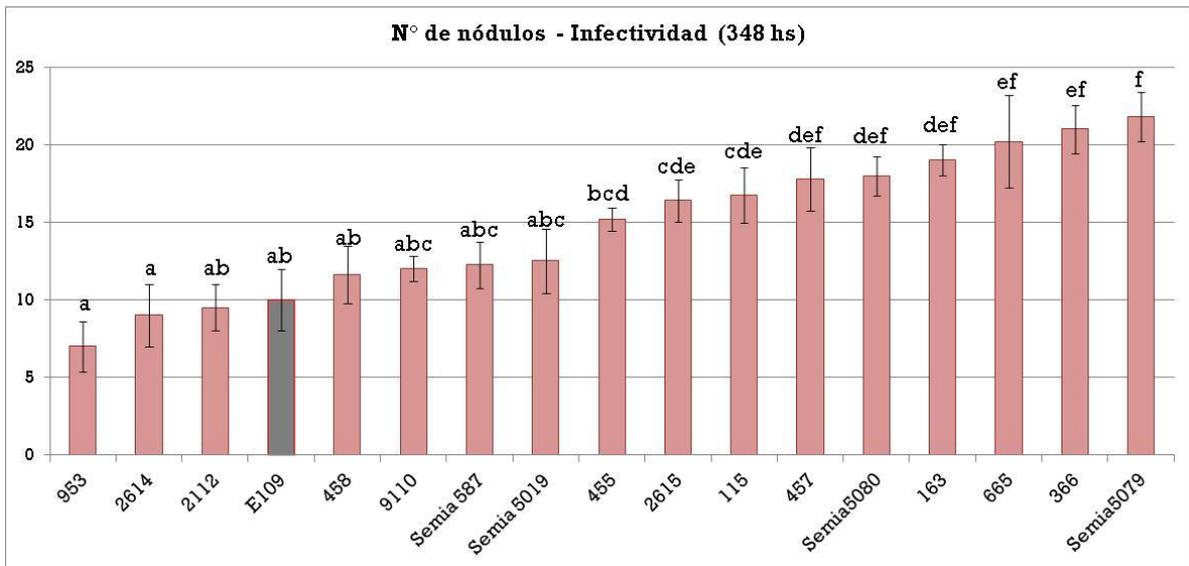
### *Infectividad y Nodulación*

Luego de un período de almacenamiento de 144hs de las semillas inoculadas, se sembraron y se determinó el número de nódulos formados. En la figura 2-9 se muestra que en la mayoría de los aislados la infectividad fue similar a la cepa control E109. Sin embargo las cepas SEMIA5080 y SEMIA5079, así como también los aislados de suelos 366 y 163 formaron un número de nódulos significativamente mayor con las plantas de soja.

El mismo experimento se realizó con un almacenamiento de de las semillas durante 348 hs (Figura 2-10). Se observó que los aislados como 366, 2615, 457 y 163, que mostraron mayor capacidad de supervivencia en la superficie de la semilla, también fueron más infectivos que E109 desarrollando un mayor número de nódulos por planta.



**Figura 2- 9:** Recuento de número de nódulos. Las semillas de soja inoculadas se almacenaron por un período de 144 hs previo a la siembra.

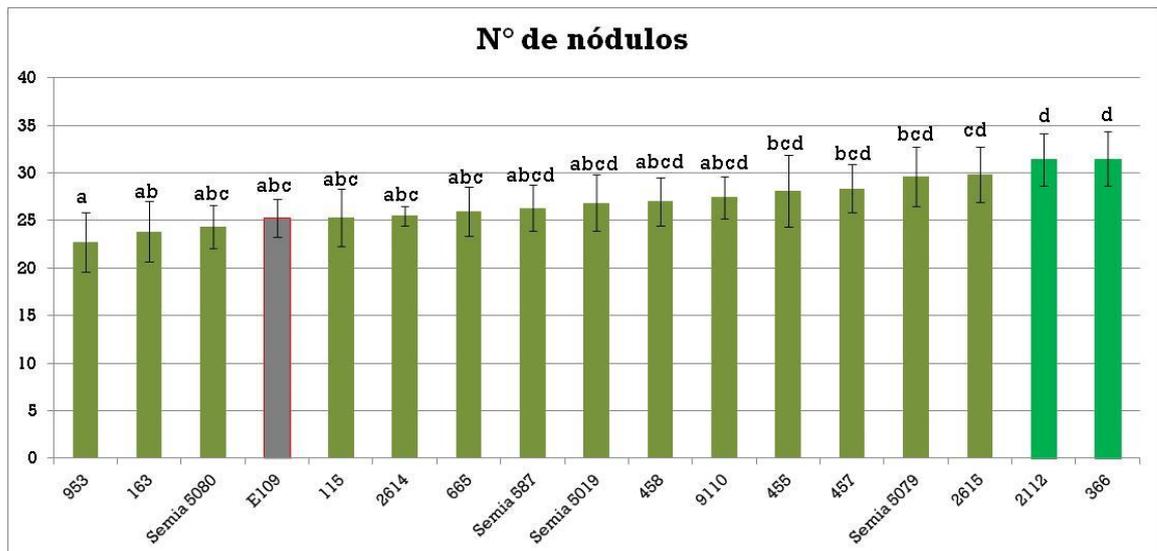


**Figura 2- 10:** Recuento de número de nódulos. Las semillas de soja inoculadas se almacenaron por un período de 348 hs previo a la siembra.

*Fenotipo simbiótico**Eficiencia de nodulación y fijación de nitrógeno*

Las cepas en estudio cuando se inocularon en un cultivar comercial de soja DM4670 desarrollaron nódulos fijadores de nitrógeno y se seleccionaron por su alta capacidad de fijación a partir de una colección de 200 aislados. La evaluación de la capacidad de nodulación de los aislados incluyó cepas controles de *B. elkanii* y *B. japonicum*.

En el ensayo de nodulación de plantas se encontró que los controles sin inocular no presentaron nódulos. En cuanto a las plantas inoculadas, se observó que los aislados 366 y 2112 indujeron la formación de un mayor número de nódulos que la cepa control E109 (N° de nódulos, Figura 2-11).



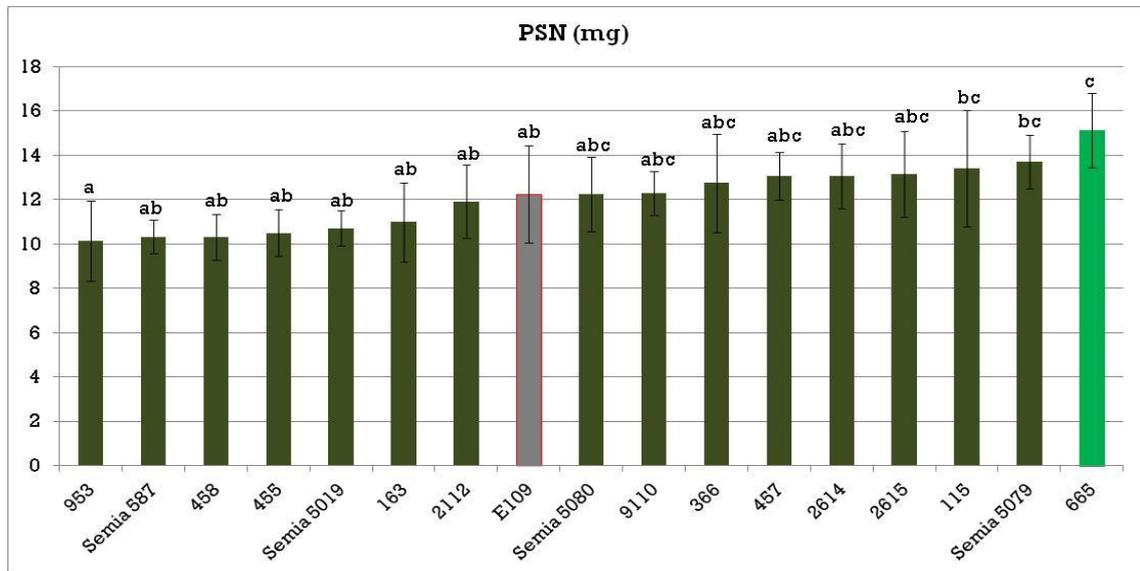
**Figura 2-11:** Número de nódulos promedio por planta inoculada.

El peso seco de los nódulos (PSN, Figura 2-12) fue similar al que se determinó en las plantas inoculadas con la cepa E109, excepto el aislado 665 que presentó un mayor peso seco de nódulos.

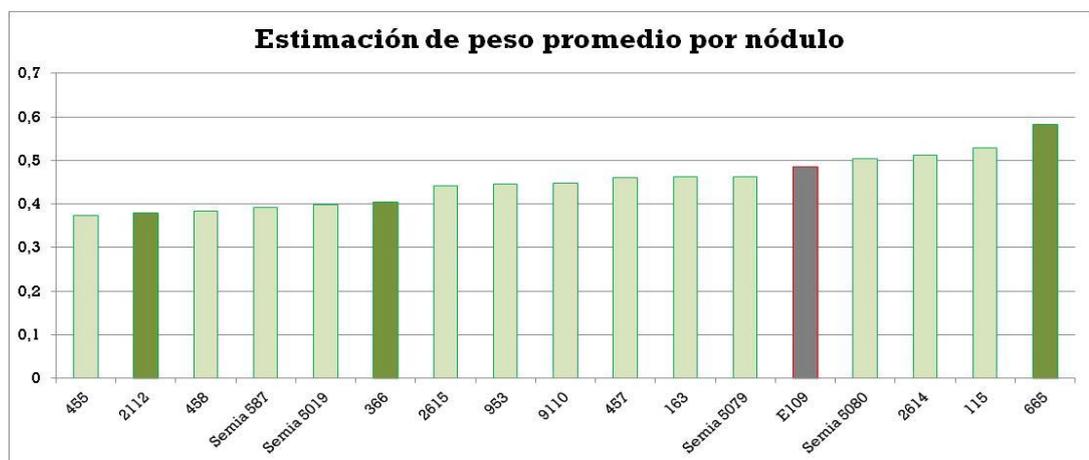
El siguiente análisis fue determinar el peso promedio por nódulo. Si bien las cepas 366 y 2112 presentaron una biomasa de nódulos similar a la de las plantas

inoculadas con E109, el número promedio de nódulos en estas cepas resultó mayor que en E109. En otras palabras, las cepas 366 y 2112 produjeron más nódulos de menor tamaño (0,4 mg), que la cepa E109 (0,48 mg) (Figura 2-13).

Por su parte, la cepa 665, produjo igual número de nódulos de mayor tamaño promedio (0,58 mg), que los producidos por E109 (0,48 mg) ya que el PSN fue significativamente mayor para 665.

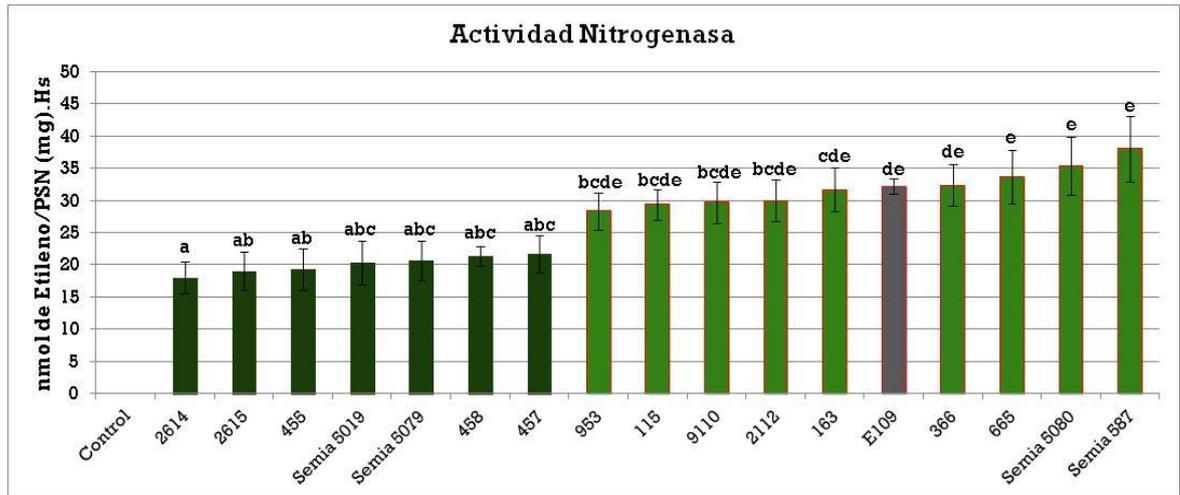


**Figura 2-12:** Peso seco de nódulos (mg).



**Figura 2-13:** Estimación del peso promedio por nódulo.

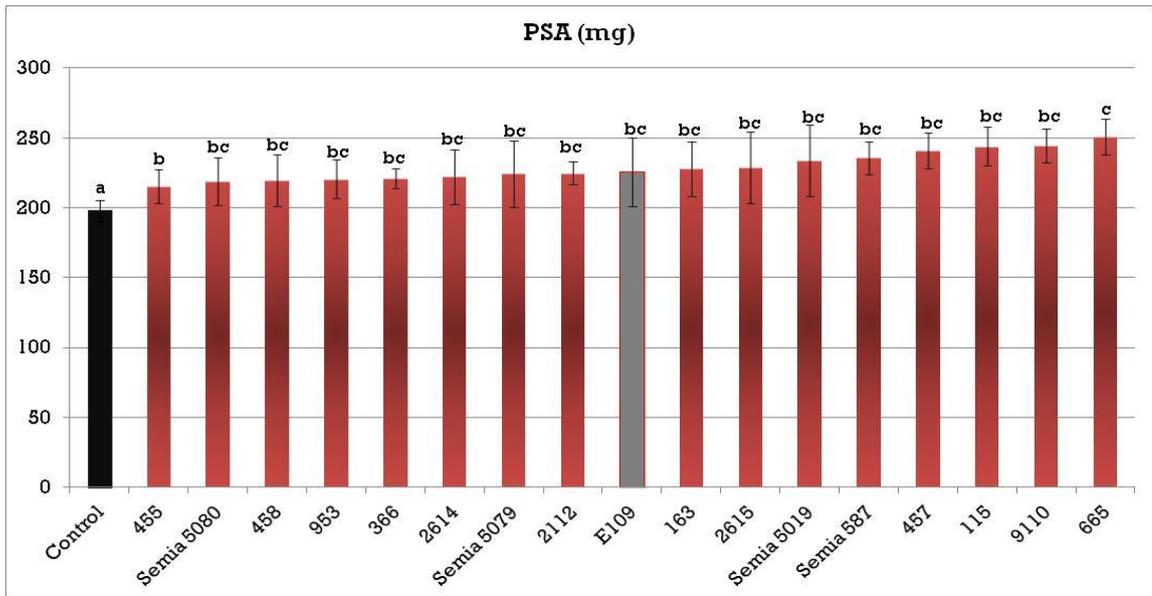
La actividad nitrogenasa expresada como  $\text{nmol de etileno.PSN}^{-1}.\text{H}^{-1}$ , fue significativamente menor para las SEMIA5019 y SEMIA5079 y para los aislados 2614, 2615, 455, 458 y 457 con respecto a la cepa E109. La actividad nitrogenasa para el resto de los aislados de suelo y para la SEMIA587 y SEMIA5080 no difirió significativamente con respecto a la cepa control.



**Figura 2-14:** Determinación de la actividad nitrogenasa expresada en  $\text{nmol de Etileno/PSN(mg).H}$ .

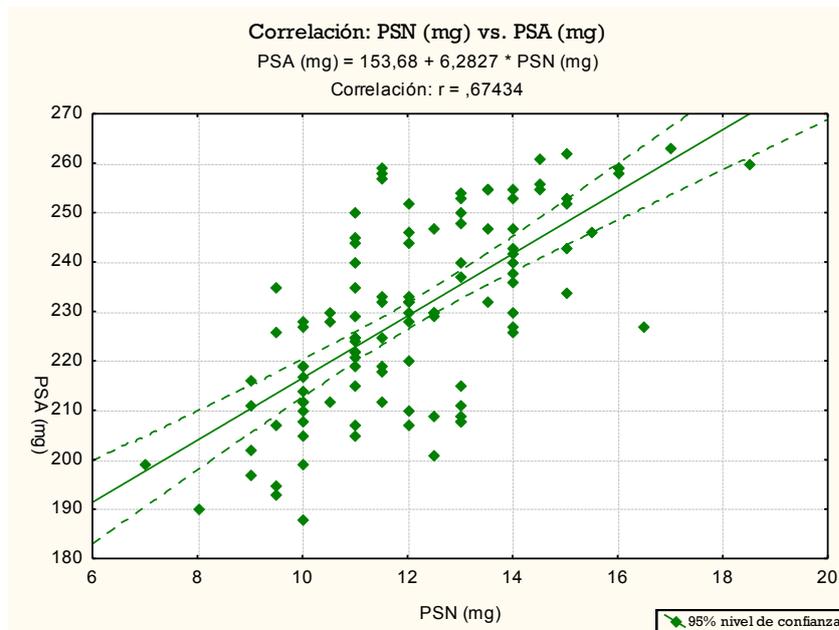
Al evaluar la capacidad de fijación de nitrógeno indirectamente por comparación de peso seco aéreo, se observó que todos los tratamientos inoculados tuvieron un peso medio de la parte aérea del mismo orden que las plantas inoculadas con la cepa control E109 y significativamente mayor que las plantas sin inocular (Figura 2-15).

La cepa 665 que desarrolló una mayor biomasa de nódulos, presentó un mayor PSA que las plantas inoculadas con la cepa E109, si bien las diferencias no fueron significativas. Estos resultados sugieren que los aislados no difieren significativamente de la cepa control E109 en cuanto a la capacidad de fijar nitrógeno.



**Figura 2-15:** Evaluación del peso seco aéreo del ensayo de fijación de nitrógeno.

La correlación entre PSN vs. PSA tuvo un  $r$  de 0,67 (Figura 2-16), indicando una correlación estadísticamente significativa y positiva con  $p < 0,0001$  entre el par de variables analizadas; lo que sugiere que el PSA reflejó la biomasa de nódulos desarrollada por la planta.

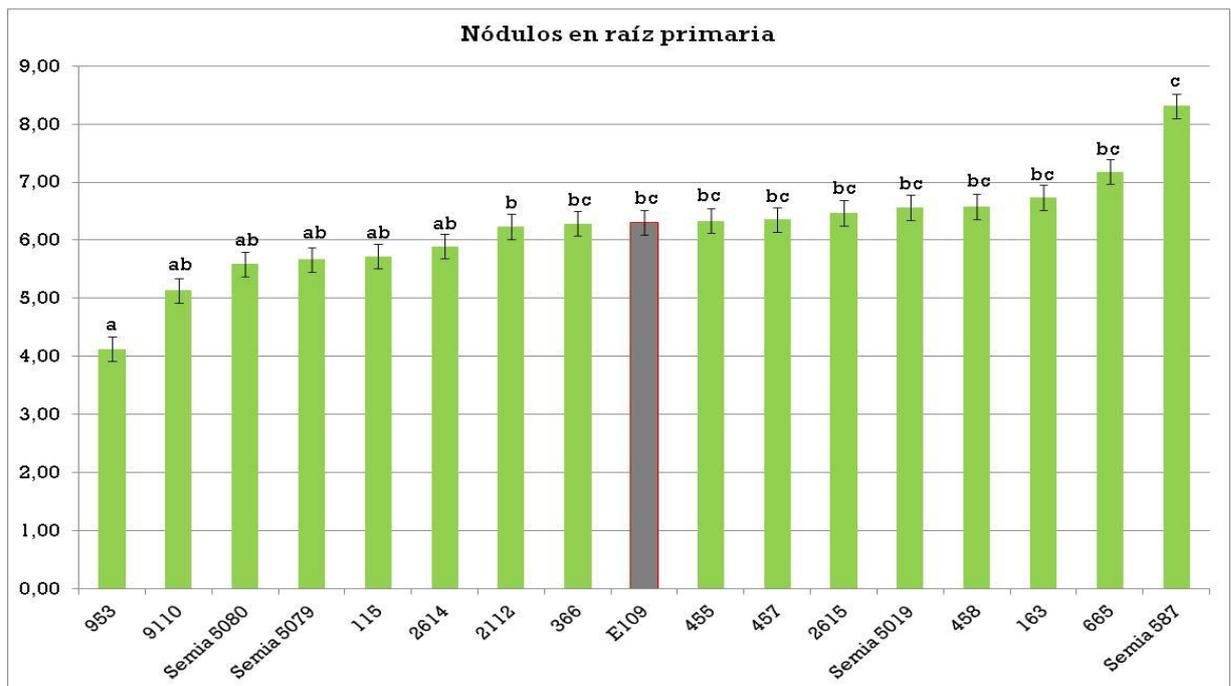


**Figura 2-16:** Correlación entre PSN (mg) y PSA (mg),  $p < 0,0001$  -  $r = 0,67$ .

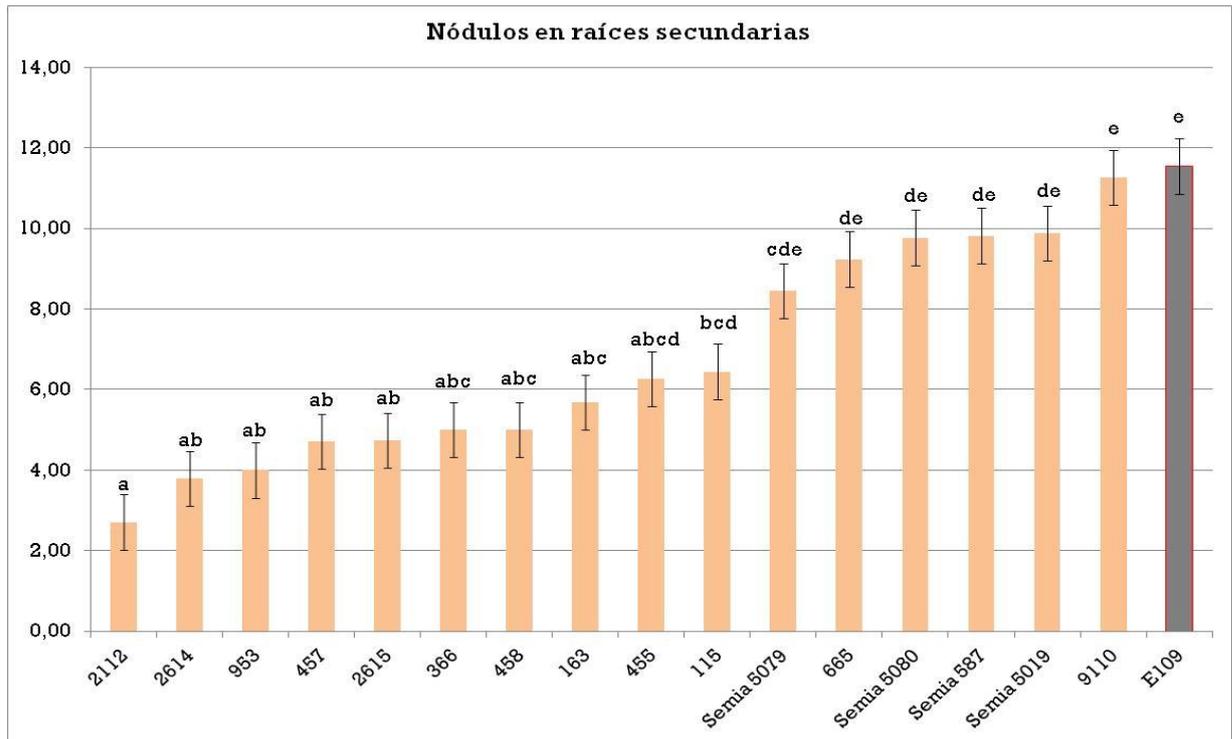
*Distribución de nódulos en la raíz.*

Los análisis realizados se complementaron con la determinación de la ubicación de los nódulos en la raíz primaria y secundaria. Se habla de una ventana de infección que en definitiva sería el reflejo de la velocidad con que la bacteria induce la formación de nódulos (Bhuvaneswari et al., 1980):

La distribución de nódulos en la raíz primaria de las plantas inoculadas con los distintos aislados fue similar al de la cepa E109, excepto para el aislado 953 que presentó menos nódulos en la raíz primaria (Figura 2-17). Se observó que la mayor nodulación en las plantas inoculadas con E109 se centró en el desarrollo de un mayor número de nódulos en las raíces secundarias (Figura 2-18).



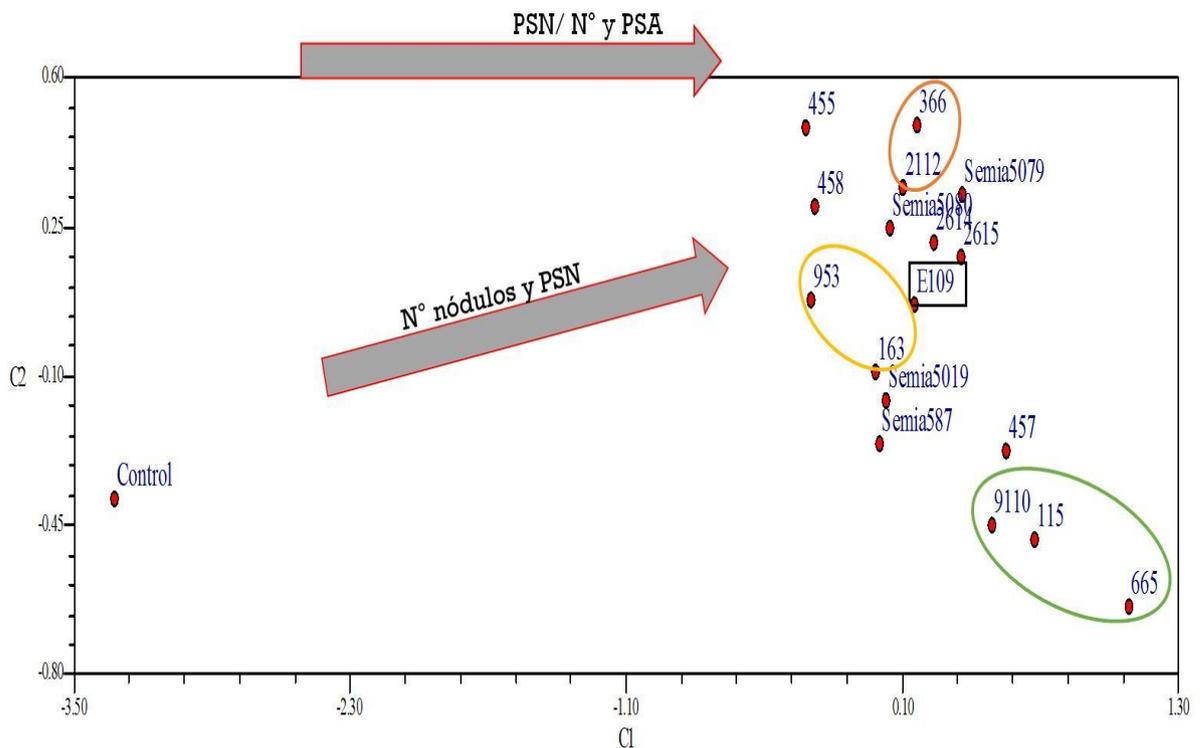
**Figura 2-17:** Distribución de nódulos en la raíz primaria. Número de nódulos por planta ubicados en la raíz primaria.



**Figura 2-18:** Distribución de nódulos en raíces secundarias. Número de nódulos por planta ubicados en raíces secundarias.

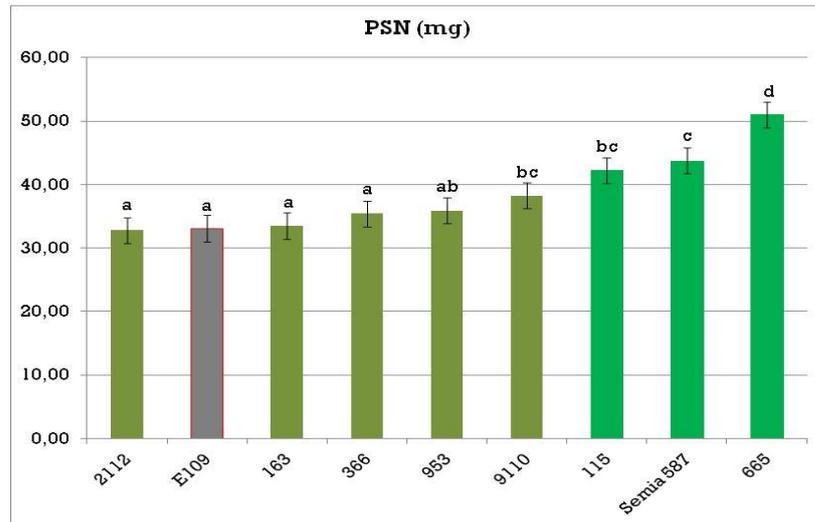
#### *Segundo ensayo de nodulación y fijación de nitrógeno.*

Se repitió el mismo ensayo de nodulación y fijación de nitrógeno en el que se incluyó solo una cepa control de *B. japonicum* (E109) y *B. elkanii* (SEMIA587) y tres aislados, 115, 665 y 9110, que fueron seleccionados en base al primer ensayo por su capacidad para producir mayor PSA; dos de ellos, 366 y 2112, por presentar un menor tamaño de nódulos y los últimos dos, 163 y 953, porque produjeron un menor número de nódulos (Figura 2-19).



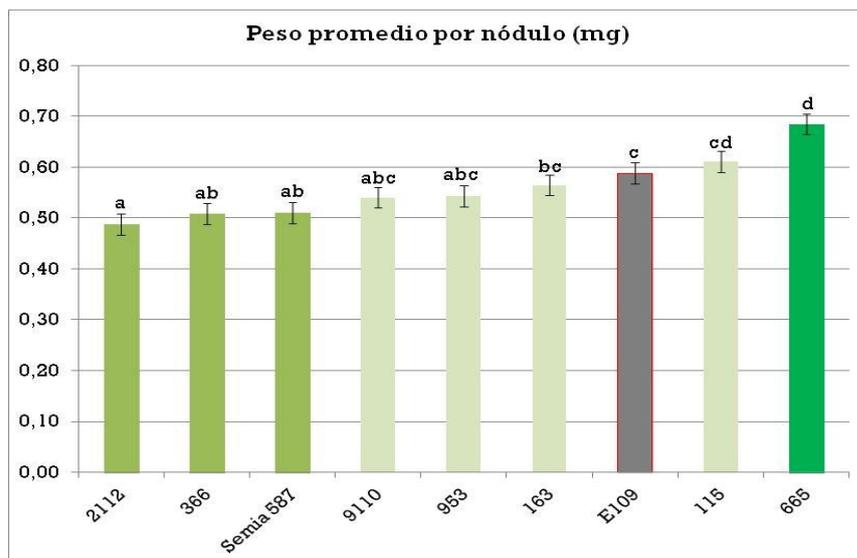
**Figura 2-19:** Análisis de componentes principales. Agrupamiento de los aislados considerando las variables PSN, PSA, N° nódulos y la relación PSN/N° nódulos.

En el segundo ensayo se observó que las plantas inoculadas con los aislados 115, 665 y la cepa control de *B. elkanii* SEMIA587, presentaron una mayor biomasa de nódulos que las plantas inoculadas con E109 (Figura 2-20). Las plantas inoculadas con los aislados 366, 2112, 665 y 115, produjeron más biomasa aérea que las plantas inoculadas con E109 (Figura 2-22). En este ensayo también se incluyó un control sin inocular que no desarrolló nódulos. Aún cuando la muestra de aislados es pequeña se observó cierta variabilidad en la capacidad de fijar  $N_2$ .

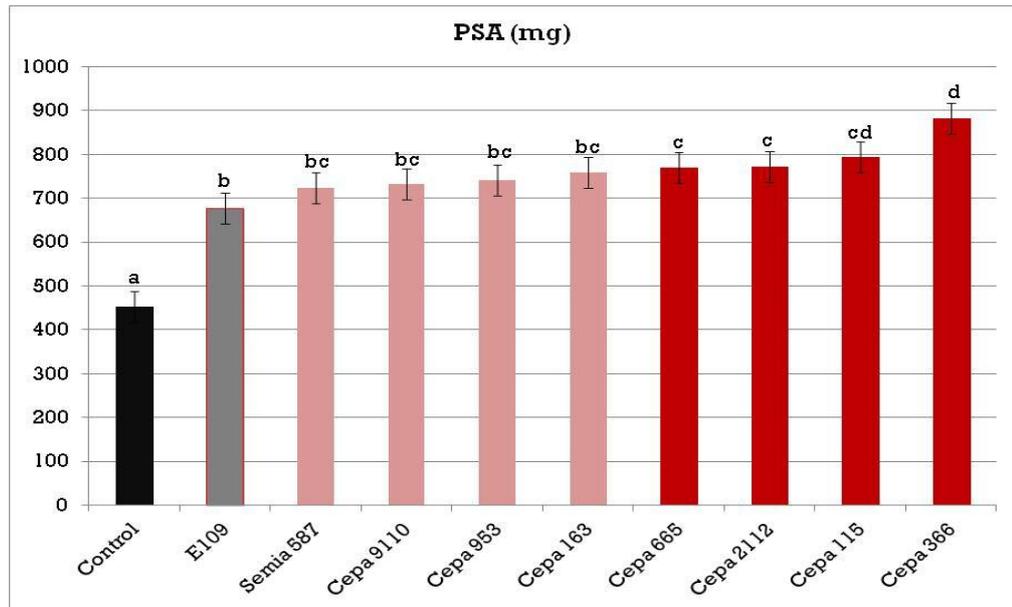


**Figura 2-20:** Peso seco de nódulos (mg) promedio por planta.

Además se observó que los aislados 665 y 115 que produjeron una mayor biomasa nodular, presentaron nódulos de mayor tamaño que los que produjo la cepa E109. En contraposición, los aislados 366 y 2112 produjeron igual PSN que la cepa E109, aunque con nódulos de menor tamaño.

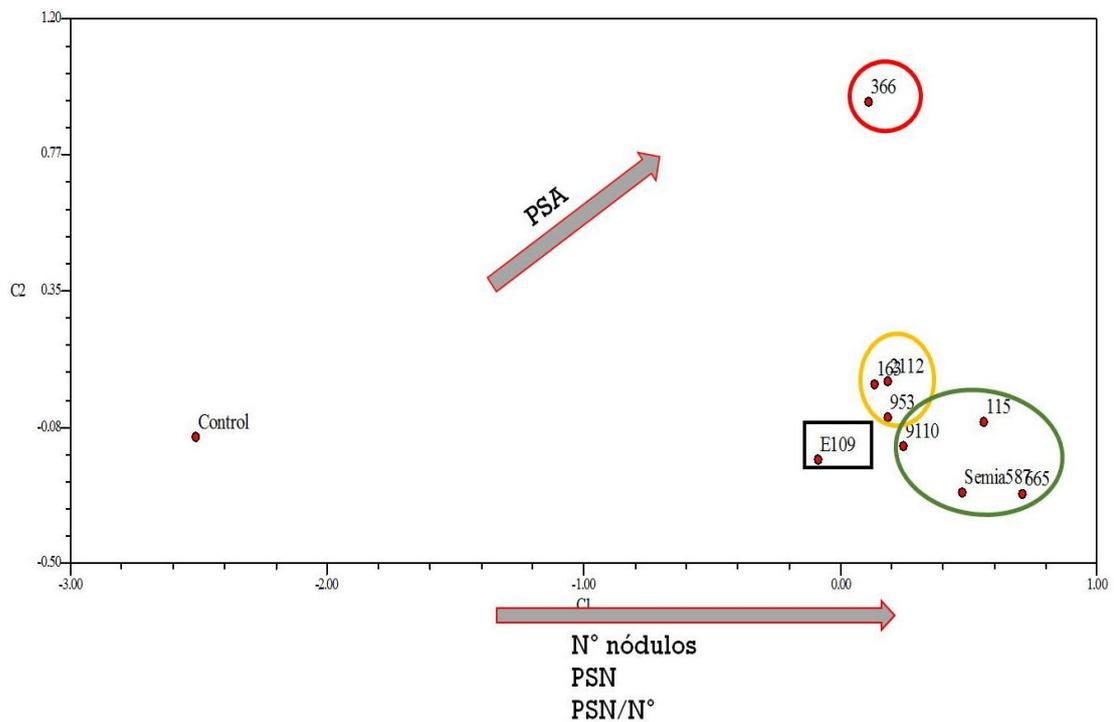


**Figura 2-21:** Peso promedio por nódulo (mg).



**Figura 2-22:** Peso seco aéreo por planta (mg).

Es decir que dentro de este grupo de aislados (163, 366, 2112, 953, 115, 665 y 9110), se pueden distinguir tres fenotipos simbióticos. Uno representado por las cepas 366 y 2112 que se caracterizan por producir una mayor biomasa aérea en las plantas y un tamaño de nódulos menor; otro fenotipo compartido por las cepas 665 y 115, se caracterizó también por una mayor biomasa aérea y nódulos de mayor tamaño. El tercer fenotipo lo comparten el resto de los aislados y la cepa E109, con características intermedias entre los dos fenotipos anteriores. Por otro lado en la figura 2-23, puede observarse que los fenotipos simbióticos descritos con estos parámetros (PSA, PSN, tamaño promedio de nódulos), agrupa a los aislados de suelo 115, 665 y con una distancia un poco mayor al aislado 9110 con el fenotipo de la cepa SEMIA587 (*B. elkanii*).



**Figura 2-23:** Análisis de coordenadas principales. Agrupamiento de los aislados en función de los parámetros PSA, PSN, N° de nódulos y la relación PSN/N° nódulos.

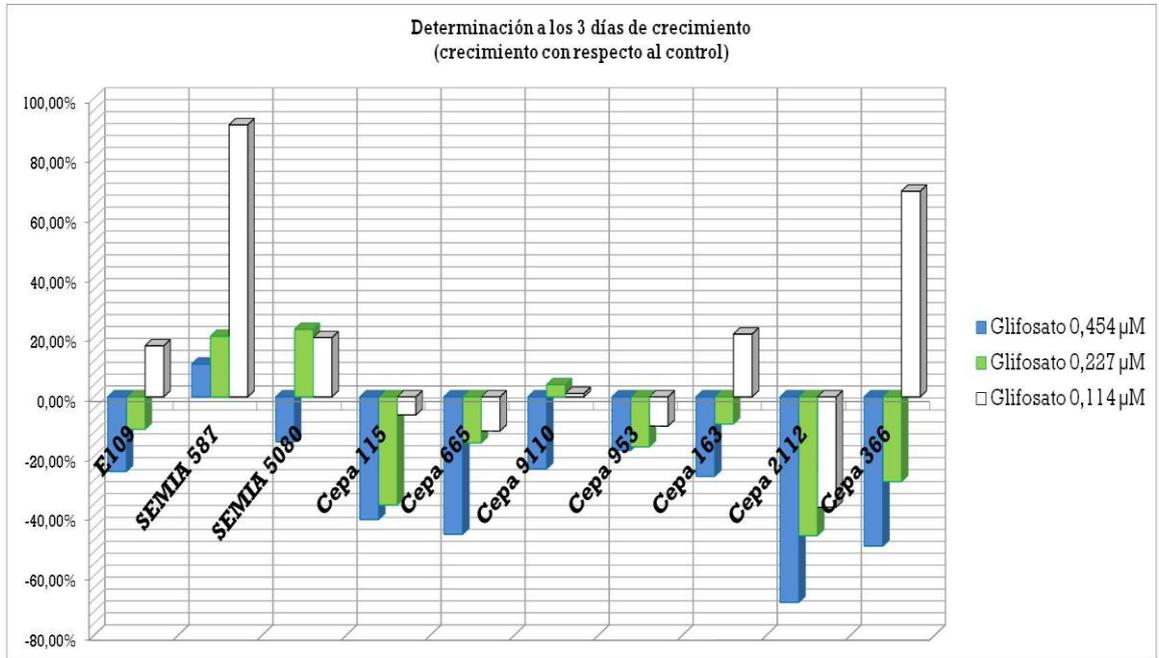
### *Tolerancia al glifosato*

Puesto que en el área de cultivo de la que se realizaron los aislamientos está ampliamente difundido el uso del glifosato, se evaluó el comportamiento de los aislados frente a la presencia del herbicida en el medio de cultivo y se observaron distintas respuestas. Algunas cepas crecieron en presencia de bajas concentraciones de glifosato a mayor velocidad que en ausencia del herbicida; lo que sugiere que probablemente estos utilizaron al herbicida como fuente de P y/o C. A los 7 días de iniciado el cultivo, los aislados 163, 366, 953, 9110, 665, SEMIA587, SEMIA5080 y E109, mostraron este comportamiento.

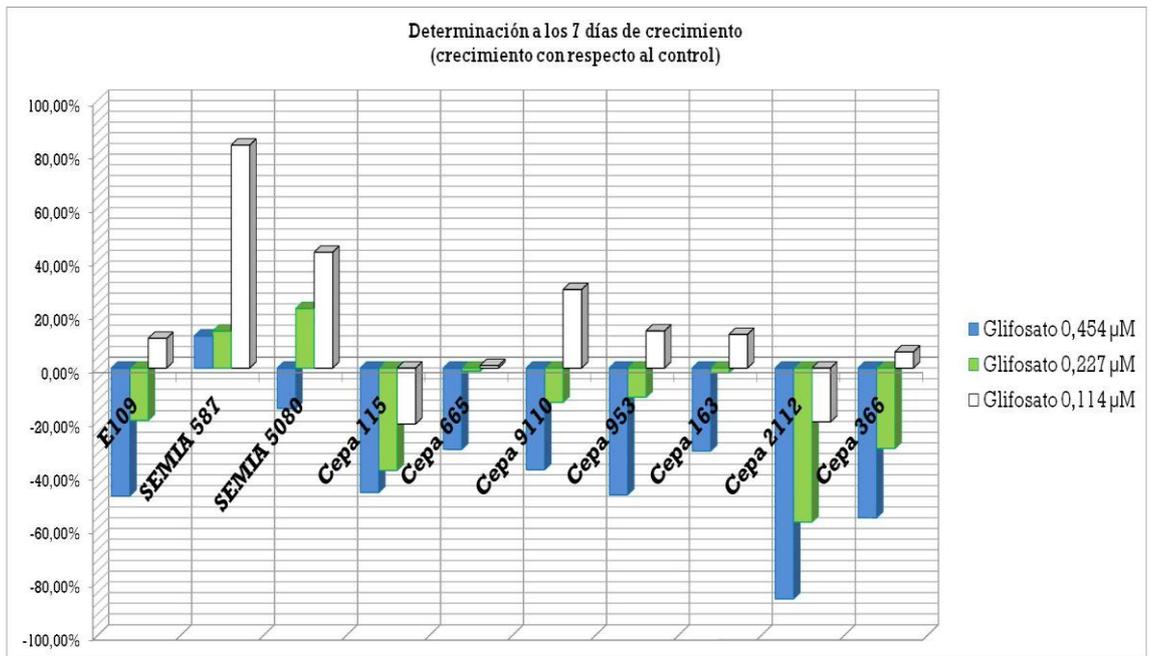
Solo dos de los aislados de suelo no toleraron ninguna de las dosis aplicadas al medio de cultivo, las cepas 115 y 2112, lo que se verificó cuando se determinó el crecimiento midiendo la  $DO_{625nm}$  a los 3 y 7 días de cultivo.

Cuando la dosis del herbicida suplementado al medio fue de  $0,454 \mu M$ , este provocó la inhibición de todos los aislados y de las cepas E109 y SEMIA5080. Sin embargo, SEMIA587 toleró todas las concentraciones de glifosato aplicadas al medio de

cultivo, mostrando mayor velocidad de crecimiento que el control sin herbicida a los 3 (Figura 2-24) y 7 días (Figura 2-25) de cultivo.



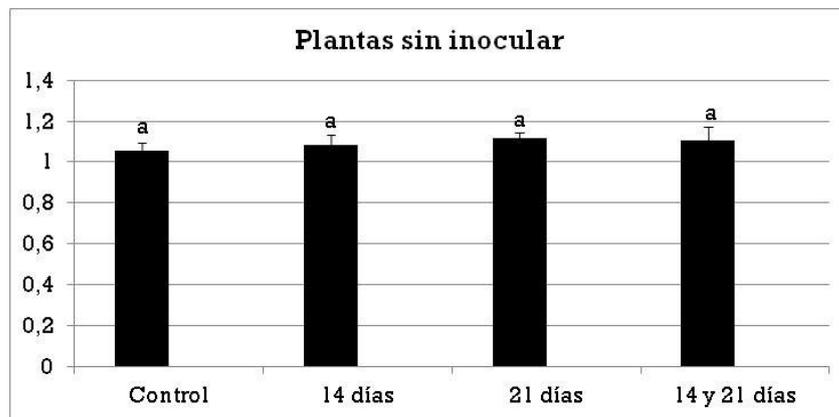
**Figura 2-24:** Medida de DO a 625 nm a los 3 días como estimación del crecimiento bacteriano en medio de cultivo suplementado con tres concentraciones diferentes de glifosato (0,114; 0,227 y 0,454 µM).



**Figura 2-25:** Medida de DO a 625 nm a los 7 días como estimación del crecimiento bacteriano en medio de cultivo suplementado con tres concentraciones diferentes de glifosato (0,114; 0,227 y 0,454 µM).

*Efecto sobre la nodulación y fijación de N<sub>2</sub> de la aplicación de glifosato*

Un grupo de plantas control en este ensayo no se inocularon pero se trataron con el herbicida. En estas plantas, se observó que la aplicación del herbicida (a los 14 días, 21 días y en doble dosis) no alteró el PSA respecto de las plantas control sin inocular y sin tratar con glifosato (Figura 2-26). Este resultado es el esperado tratándose de plantas resistentes al glifosato. Los siguientes tratamientos en los que además de aplicar el herbicida, las plantas fueron inoculadas con los diferentes aislados de rizobios, tuvo como objetivo verificar si la aplicación de glifosato tenía algún efecto sobre la interacción de la bacteria con la planta.

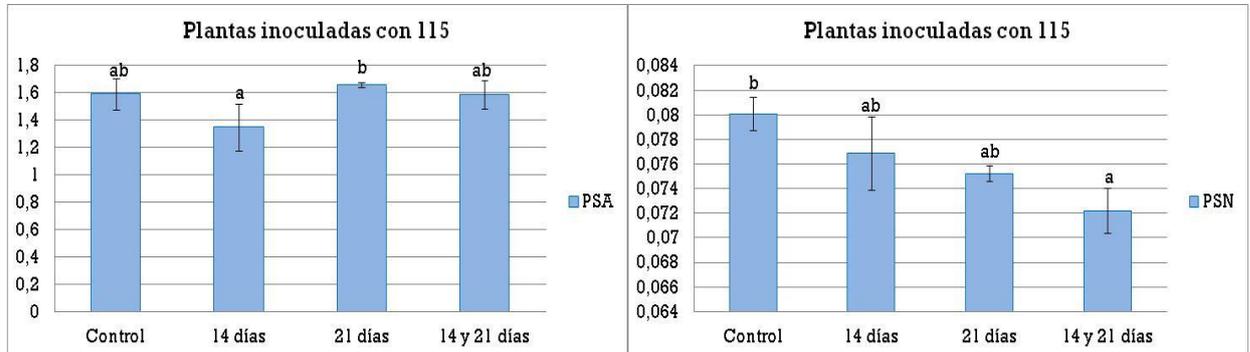


**Figura 2-26:** Peso seco aéreo de plantas sin inocular. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).

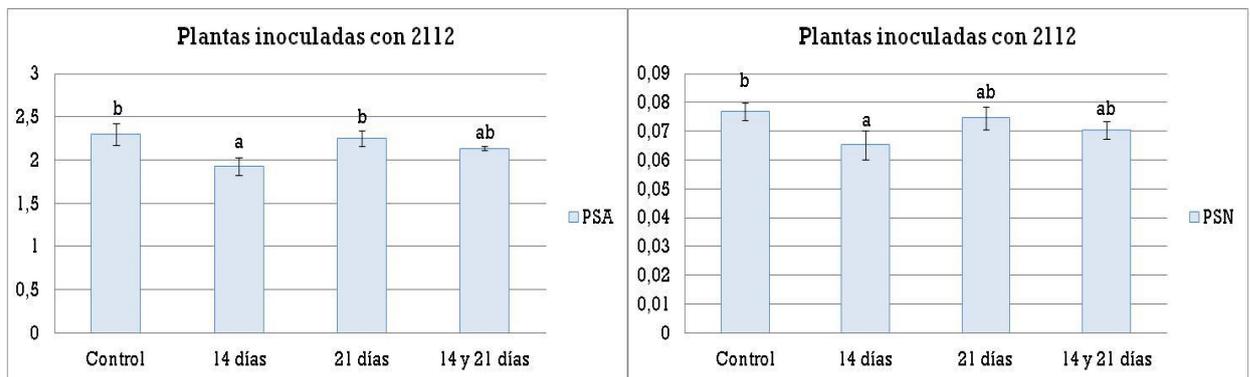
Las plantas inoculadas y tratadas con el herbicida, mostraron tres patrones de comportamiento, determinados por medición del peso seco aéreo de las plantas (PSA) y el peso seco de los nódulos producidos (PSN). Si bien las diferencias en el PSA y/o PSN no fueron significativas en todos los casos, la respuesta de las plantas en función de los efectos de la aplicación del glifosato a los 14 días, 21 días o a la doble aplicación a los 14 y 21 días se puede agrupar en tres fenotipos simbióticos.

Cuando las plantas fueron inoculadas con las cepas 115 (Figura 2-27) y 2112 (Figura 2-28), se observó un efecto negativo de la aplicación de glifosato a los 14 días, reflejado en un menor PSA de las plantas a los 14 días y en las plantas que recibieron la aplicación a los 14 y 21 días. Esto estuvo acompañado además por una menor producción

de biomasa nodular con respecto a los tratamientos controles inoculados con estas mismas cepas pero sin aplicación del herbicida (Figura 2-27 y 2-28).

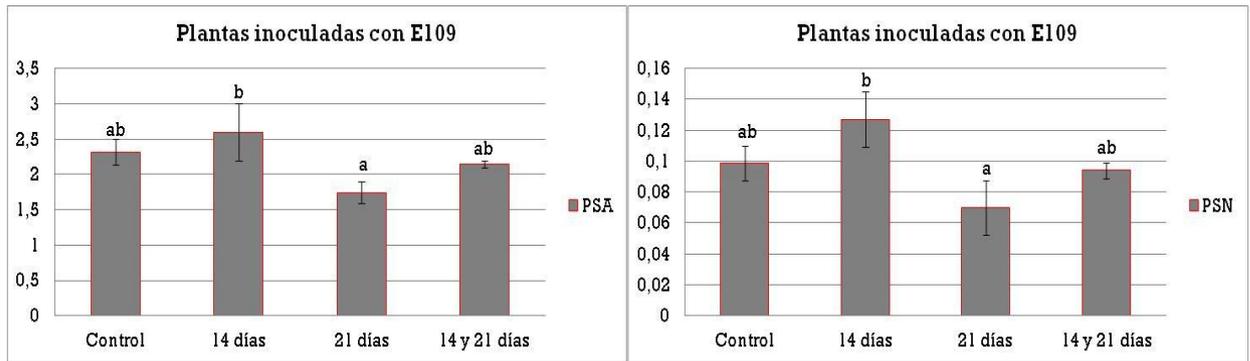


**Figura 2-27:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 115. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).

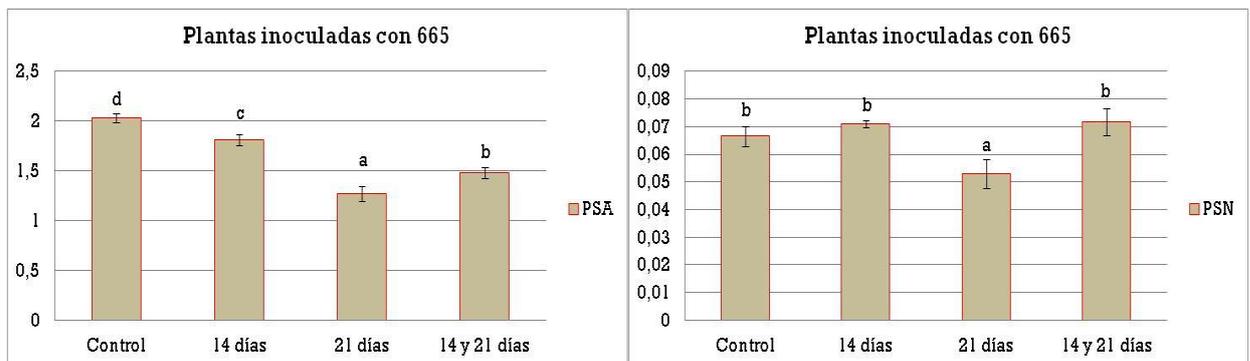


**Figura 2-28:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 2112. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).

En cambio para las cepas E109 (Figura 2-29) y 665 (Figura 2-30), se observó una reducción en el PSA de la plantas cuando el herbicida se aplicó a los 21 días, al igual que en las plantas que recibieron la doble aplicación de glifosato. También se observó una tendencia a producir una menor biomasa nodular en las plantas tratadas a los 21 días.

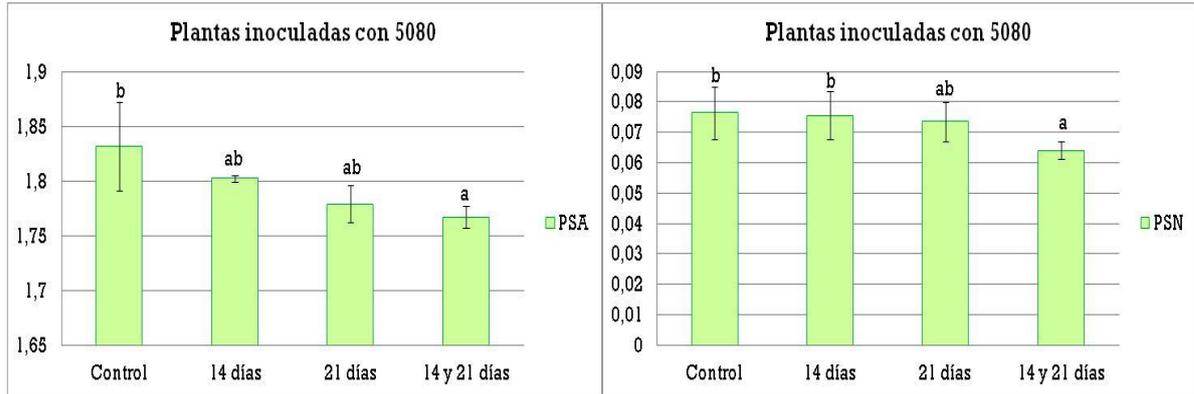


**Figura 2-29:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa E109. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).

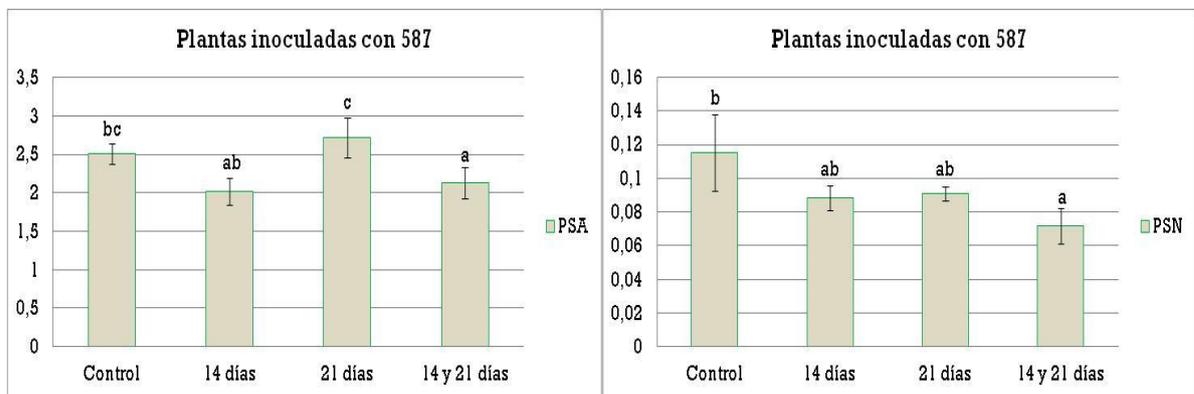


**Figura 2-30:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 665. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).

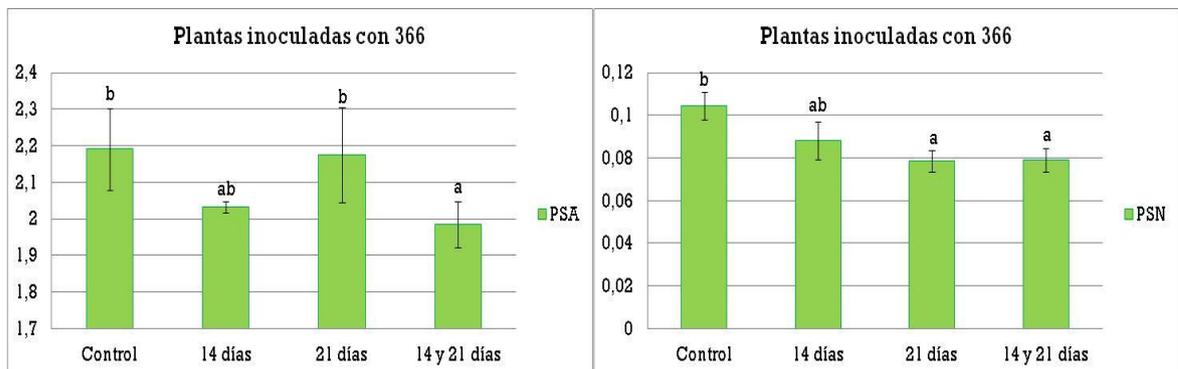
El tercer fenotipo simbiótico observado correspondió a la interacción de las cepas SEMIA5080 (Figura 2-31), SEMIA587 (Figura 2-32), 366 (Figura 2-33), 163 (Figura 2-34), 953 (Figura 2-35) y 9110 (Figura 2-36) con la planta de soja. En estos tratamientos la aplicación del glifosato tuvo un efecto negativo que se reflejó en un menor PSA y un menor PSN, solo cuando las plantas se trataron con dos aplicaciones del herbicida (a los 14 y 21 días).



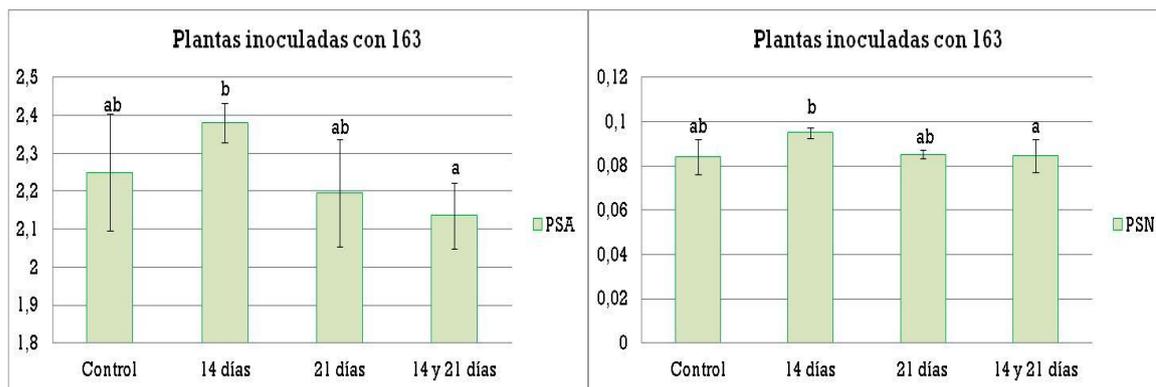
**Figura 2-31:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa SEMIA5080. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).



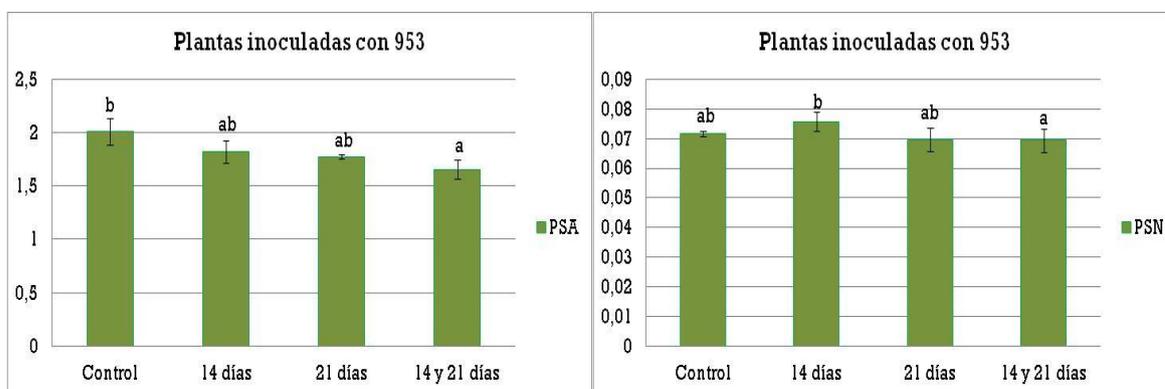
**Figura 2-32:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa SEMIA587. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).



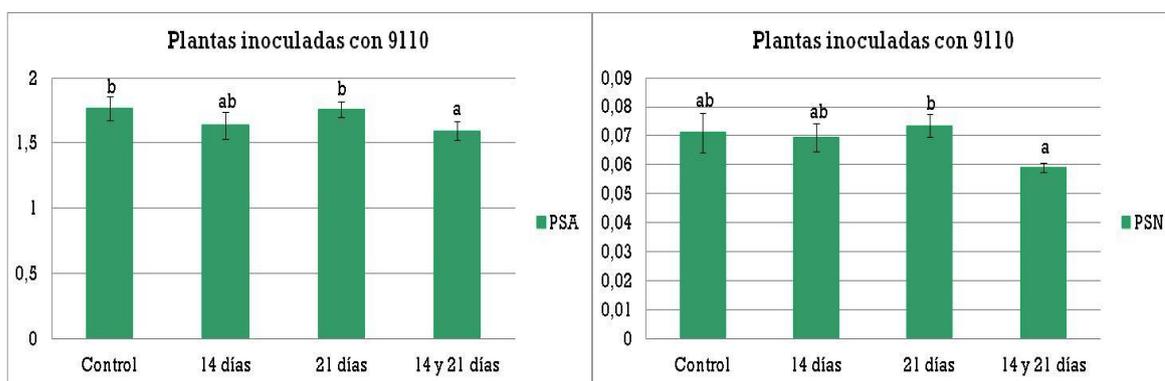
**Figura 2-33:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 366. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).



**Figura 2-34:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 163. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).



**Figura 2-35:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 953. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).



**Figura 2-36:** Peso seco aéreo (PSA) y peso seco de nódulos (PSN) de plantas inoculadas con la cepa 9110. Se muestran los 4 tratamientos: un control sin aplicación de glifosato y los tratamientos en los que las aplicaciones se realizaron a los 14 y 21 días y una doble aplicación (14 y 21 días).

## **Discusión**

Los organismos que interactúan, como es el caso de las plantas y sus simbioses y/o patógenos, evolucionan en conjunto en los ambientes que ocupan (Stukenbrock & McDonald, 2008). Considerando que China es la región de origen de la soja, los suelos de esta región son los que albergan tanto las bacterias simbióticas que fijan N<sub>2</sub> como los patógenos que provocan las principales enfermedades del cultivo (Vinuesa et al., 2008; Martínez-Romero, 2009; Wu et al., 2011). Por ello muchas son las expediciones realizadas a esos lugares con el fin de aislar rizobios simbioses de la soja. Así se llegó a la situación actual en la que se han descrito varias especies que nodulan y fijan N<sub>2</sub> con la soja (Aguilar et al., 2001; Hungría et al., 2005; Munoz et al., 2011).

La soja es un cultivo exótico en la Argentina, por eso hasta el momento de su introducción en el país, los suelos carecían de las bacterias fijadoras de nitrógeno conocidas como bradyrizobios. Este cultivo se incorporó con el proceso de la inoculación, que fue la manera en que los aislados de *B. japonicum* y de *B. elkanii* se incorporaron a los suelos de la Argentina en donde se naturalizaron. Esto, junto con la extensión del cultivo, condujo a que hoy sea difícil encontrar en la Argentina suelos libres de bradyrizobios simbioses de la soja (Gómez et al., 1997; Piccinetti et al., 2013).

En esta tesis se evaluaron las características fenotípicas de aislados de suelo y cepas control, que son las que se utilizan en la formulación de inoculantes comerciales en la región. Además se estudiaron cambios fenotípicos y genéticos que se asocian al proceso de adaptación de los microorganismos al ambiente. Si bien el avance de la taxonomía con las herramientas moleculares condujo a saber que el género *Bradyrhizobium* alberga varias especies, en lo que hace a simbioses de la soja en los suelos argentinos se han naturalizado solo representantes de *B. japonicum* y *B. elkanii* (Gómez et al., 1997). Estas se caracterizan por ser bacterias Gram (-) pleomórficas de 0.5 x 1.2 a 3 µm que contienen gránulos de poli-β-hidroxybutirato, que forman colonias de 1 a 3 mm de diámetro luego de 5 o 6 días de incubación a 28 °C. Sin embargo, se distinguen entre sí por el tamaño de las colonias, la resistencia a antibióticos, composición de EPS, producción AIA y utilización de distintas fuentes de carbono (Boone et al., 2005; Kuykendall, 2005).

Entre 200 aislados provenientes de suelos con historia del cultivo de soja, se estudiaron doce que se destacaron por su capacidad para fijar nitrógeno (López et al.,

2010; Pastorino et al., 2011). Ocho de los aislados presentaron, en cultivos *in vitro*, características similares a las cepas control de *B. japonicum* E109, SEMIA5079 y SEMIA5080. Estas desarrollaron colonias mucosas de 3 mm de diámetro luego de un periodo de incubación de 7 días. Otros cuatro aislados junto con las cepas control de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019, desarrollaron colonias más pequeñas y translúcidas en el mismo período de incubación. *B. japonicum* desarrolla en el mismo período de tiempo colonias de mayor tamaño que *B. elkanii* (Batista et al., 2007). Por otro lado estas dos especies producen exopolisacáridos distintos. Los EPS de *B. japonicum* se componen de manosa, galactosa, glucosa, azúcares y ácido galacturónico en una proporción de 1:1:2:1, mientras que *B. elkanii* sintetiza EPS compuestos únicamente de ramnosa y ácido glucurónico en una proporción de 3:1 (Huber et al., 1984; An et al., 1995). Esta diferencia en la constitución puede explicar la distinta apariencia de las colonias. En síntesis, si bien es necesario confirmar los datos con análisis moleculares, las dos características fenotípicas descritas sugieren que los doce aislados se pueden agrupar en dos grupos definidos de *Bradyrhizobium*. Es decir, que los suelos muestreados aparentemente contienen cepas naturalizadas de dos de las especies que hacen simbiosis con la soja *B. elkanii* y *B. japonicum*. Estos resultados y los de Pastorino (comunicación personal) confirman la presencia de estas dos especies en los suelos argentinos.

Al evaluar la cantidad de EPS producidos por estas cepas, se encontraron diferencias en función del medio de cultivo en que fueron crecidas. Cuando la determinación de EPS se realizó en un medio rico (YEM), solo los aislados 953, 665, 2112, y 455 produjeron una mayor cantidad de EPS que la cepa de referencia E109. Resultados que se vieron modificados cuando el carácter se evaluó en medio mínimo, en el que 366, 9110, 2615, 457, 163 y E109 aumentaron la producción; mientras que algunas cepas disminuyeron o no modificaron su producción. Es decir que una de las características que varía en los aislados es la producción de EPS. Batista et al (2007), analizando la descendencia de bacterias a los 7 años de su ingreso al suelo, describieron que los aislados de *B. japonicum* como *B. elkanii* se diferenciaron de las cepas parenterales en la producción de exopolisacáridos.

La formación de biofilm así como la autoagregación bacteriana son dos procesos que favorecen la etapa temprana de la nodulación, ya que seguramente estos procesos están relacionados con la adhesión al pelo radicular (Rinaudi & Giordano, 2010; Sorroche et al., 2012). Sin embargo, también se ha encontrado que condiciones desfavorables de crecimiento o de baja actividad metabólica podrían inducir la agregación de bacterias

que normalmente crecen de forma dispersa. En este contexto, la autoagregación puede reflejar una estrategia de supervivencia que se activa bajo condiciones ambientales desfavorables (Bogino et al., 2013). También está claro que son dos procesos influenciados por la producción de EPS (Sorroche et al., 2012). Siendo la supervivencia una de las características clave de los rizobios y habiéndose reportado relaciones entre la formación de biopelículas y la producción de EPS (Sánchez Contreras et al., 2007), se consideró interesante evaluar además de la producción de EPS, la formación de biofilm y autoagregación y la supervivencia de los aislados sobre semilla. Así, la autoagregación se observó como un carácter variable entre los aislados si bien para todas las cepas el valor superó el 55 %. En cambio la formación de biofilm mostró diferencias más marcadas entre las cepas, siendo 115, 665, 455 y 458 las que además de las controles (E109 y SEMIAS) mostraron una mayor capacidad de producción de biofilm.

Esto nos lleva a pensar que habiéndose encontrado variabilidad en la producción de EPS dependiendo de las cepas, del medio y de las condiciones de cultivo para la determinación *in vitro* y del ambiente rizosférico en la nodulación, también resultaría que la producción de biofilm y la autoagregación, podrían ser distintas por parte de las bacterias en contacto con la raíz con respecto a lo evaluado en el laboratorio. Por esta razón se evaluó el efecto de exudados de semillas (IF), en ambos procesos. Solo se encontró que la formación de biofilm y la autoagregación fue inducida en las cepas (2112, 163, 953, 2615). Para dos de estos aislados (2112 y 953), los altos niveles de producción de EPS se correlacionaron con una mayor producción de biofilm y mayor porcentaje de autoagregación cuando fueron crecidos en presencia de exudados de semillas. Lo que sugiere que hay diferencias metabólicas entre los aislados que resultan en fenotipos distintos de formación de biofilm y autoagregación. Es conocido que si bien la producción de biofilm está asociada a la síntesis de EPS, más que la cantidad influye el largo de las cadenas de los polímeros y, por otro lado, otros polisacáridos y compuestos de superficie celular cumplen también roles claves en la maduración de los biofilm, entre los que se incluye a los factores de nodulación cuya síntesis dependen de la presencia de flavonoides (Rinaudi & Giordano, 2010). Esto explicaría la falta de correlación encontrada entre la producción de biofilm, la autoagregación y la producción de EPS y el efecto de la adición de IF al medio de cultivo.

La capacidad de supervivencia de los aislados, que presentó diferencias entre ellos y en relación a la cepa control E109, se correlacionó con una mayor producción de EPS en medio mínimo para las cepas con mayor supervivencia como 163, 457, 2615, 9110

y 366. En particular el aislado 366 presentó una supervivencia 4 veces superior al control. La mayor capacidad de supervivencia del aislado 366 no estuvo asociada a una mayor capacidad de formación de biofilm o autoagregación; pero si se observó una disminución en la capacidad de formar biopelículas cuando se evaluó la influencia de los IF. Es de destacar que las cepas con mayor capacidad de supervivencia en el mayor tiempo ensayado fueron además las cepas que aumentaron la producción de EPS en presencia de baja concentración de fuentes carbonada, que es quizás el ambiente más típico que encuentra una bacteria en el suelo. Estas cepas con mayor supervivencia, no perdieron la capacidad de nodular luego de los tiempos de almacenado ensayados en la supervivencia. También se observó que aislados que no sobrevivieron más que unas pocas horas cuando se inocularon en semillas, 2112, 458 y 665, produjeron grandes cantidades de EPS en medio EMA, producción que disminuyó en el medio mínimo. La mayor resistencia a la desecación que podrían aportar los EPS, está relacionada con la capacidad de supervivencia, aunque la relación es compleja ya que la producción de EPS *in vitro* depende fuertemente de la composición del medio de cultivo (Frayse et al., 2003). El suelo es un medio muy complejo y variable, condiciones que no son posibles de representar *in vitro* y por ello no son extrapolables a los estudios *in vitro*. Estas características que están relacionadas con la supervivencia y competitividad de los aislados naturalizados, mostraron una gran diversidad que podría estar vinculada con adaptaciones adquiridas en el establecimiento como saprófitos en los suelos.

Tan importante como las características de supervivencia y competitividad que estos aislados alóctonos pudieran haber adquirido en la vida saprofítica, es el hecho de que conserven la eficiencia de fijación de nitrógeno. A lo largo de este capítulo, se analizaron 12 aislados alóctonos y estos mostraron una capacidad de fijación de N<sub>2</sub> similar a la cepa de referencia E109. Sin embargo, cuatro de las cepas, 665, 2112, 115 y 366, produjeron una mayor biomasa de la parte aérea con respecto al control; siendo 665, 115 y 9110 al igual que SEMIA587 las cepas que produjeron una mayor biomasa nodular mostrando diferencias significativas con E109. Esto indica que los aislados de suelo demostraron tener un buen potencial de fijación de nitrógeno en condiciones de laboratorio, con la ventaja de que son cepas adaptadas a las condiciones de suelos del área de cultivo.

Además se evaluó la tolerancia de las cepas y el efecto en la fijación de nitrógeno de un herbicida de uso común en los campos sojeros. El Glifosato [N-(fosfometil) glicina] es un herbicida no selectivo de amplio espectro que inhibe la síntesis de

aminoácidos aromáticos (Zablotowicz R. & Reddy, 2007; dos Santos et al., 2005). Este suele aplicarse al cultivo de soja RR en post-emergencia y puede afectar a los simbioses de la soja por su efecto sobre la síntesis de aminoácidos, debido a que altera el balance energético o a la toxicidad de compuestos intermediarios de la ruta del shikimico. El glifosato es un herbicida que se ha demostrado puede actuar como fuente de fósforo (P) y/o carbono (C) para el crecimiento de los microorganismos del suelo, en particular algunas especies de la familia de las *Rhizobiaceae* aumentan su tasa de crecimiento en presencia de glifosato (Zablotowicz & Reddy, 2004; Liu et al., 1991). Sin embargo, cepas como USDA110, USDA123 y USDA138 han sido reportadas como sensibles a glifosato en medios libres de aminoácidos aromáticos (Moorman et al., 1992). Al analizar la tolerancia al herbicida de los aislados de suelo, se encontró que cuatro de ellos (366, 953, 163 y 9110) toleraron la dosis mínima aplicada al medio de cultivo, e incluso mostraron una mayor tasa de crecimiento. Estos mismos aislados solo se vieron afectados en la capacidad de fijación de nitrógeno cuando las plantas fueron tratadas con doble dosis del herbicida durante el ensayo de fijación.

Los resultados de este capítulo, demostraron que existe diversidad fenotípica y en las características simbióticas en los aislados nativos entre sí y con respecto a los controles de cada especie (*B. japonicum* y *B. elkanii*). De este primer análisis resultan de particular interés los aislados como **665**, **366**, **2112** y **9110** por su mayor eficiencia de fijación, sumándose a este grupo aislados como **953** y **163** por su mayor tolerancia y eficiencia de fijación frente a la presencia de glifosato (al igual que 366 y 9110). También vale la pena destacar que la cepa 366 mostró mayor capacidad de supervivencia sobre semillas, y las cepas 2112 y 953 mostraron una mayor producción de EPS, siendo estas dos últimas junto a 163 las únicas que tuvieron un efecto positivo en los procesos de formación de biofilm y autoagregación frente a la exposición a exudados de semillas.

En el siguiente capítulo se analiza la diversidad genotípica de los aislados. En función de esto y de la identificación de los aislados seleccionados en este capítulo se acotarán futuros estudios a las cepas dentro de este grupo que pertenezcan a la especie *B. japonicum*.

***Capítulo 3: Caracterización  
genotípica de aislados naturalizados***

## **Introducción**

La biodiversidad de las especies es una de las claves para explicar la existencia de representantes de una especie, que se adaptan y se establecen en ambientes con características contrastantes. Se basa, entre otras cosas, en la variabilidad o diversidad genética que ocurre en los organismos. Esto se define como las variaciones heredables, que ocurren entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una misma especie, que muchas veces conduce a la estructuración geográfica de las poblaciones. Por otro lado, la biodiversidad también se genera como parte de los procesos evolutivos de las especies (Piñero, 2008). Los estudios de biodiversidad están vinculados a cambios y con esto a la genética evolutiva que suele impactar sobre los procesos productivos agrícolas. Los recientes avances en genética molecular permitieron a los científicos estudiar especies y comunidades del suelo de un amplio rango de hábitats y áreas geográficas con mayor profundidad (Rademaker et al., 2005; Zhang et al., 2012). Si bien los cultivos *in vitro* de microorganismos pueden ser apropiados para llevar a cabo estudios genéticos o fisiológicos detallados de microorganismos, los investigadores estiman que solo el 1 % del total de especies bacterianas pueden ser cultivadas (Nakatsu, 2005). Los estudios de diversidad son una herramienta que permite evaluar la capacidad de respuesta de las poblaciones y especies a los cambios ambientales, a conocer la riqueza genética y distribución geográfica y a plantear estrategias de aprovechamiento de los recursos genéticos disponibles. La fijación biológica de nitrógeno es uno de los procesos biológicos más estudiados. Dentro de este contexto, la fijación biológica ha sido objeto de estudios profundos de la diversidad de los rizobios, ya que esto resulta clave para la selección de organismos con capacidades superiores de fijación de N<sub>2</sub>. Por este y otros motivos, la sistemática de rizobios está en constante evolución y frecuentemente aparecen nuevas especies o se reclasifican otras (Piñero, 2008).

En la segunda mitad del siglo XX, se demostró que las bacterias se agruparon en grupos taxonómicos que se basan en caracteres fenotípicos estables, como las características morfológicas y cuantitativas de la célula bacteriana, aspectos fisiológicos y otras características metabólicas. Tales enfoques fenotípicos pronto enfrentaron la competencia de enfoques genotípicos, como es la composición de bases del ADN (mol % de contenido de GC) y la hibridación ADN:ADN de todo el genoma (DDH – DNA:DNA Hybridization) (Silva & Vinuesa, 2007). El estándar que se adoptó para considerar que dos aislados pertenecen a la misma especie fue que debían tener al menos un 70 % de

similitud de sus genomas (*gold estándar*) y se ha utilizado el 3 % divergencia en secuencia del gen *rrn* como punto de corte para separar especies (Stackebrandt & Goebel, 1994; Silva & Vinuesa, 2007). En la actualidad son pocos los laboratorios que realizan ensayos de hibridación de ADN-ADN, ya que estos son onerosos y técnicamente exigentes en comparación con la secuenciación rápida y fácil de pequeñas secuencias, tales como el gen de ARN ribosomal 16S (*16S rDNA*). Este cambio ha llevado a una actualización de la definición de especie "en lo que hace a los organismos procariotas se considera que es un grupo de cepas que se caracterizan por un cierto grado de coherencia fenotípica, que muestran 70 % de unión ADN-ADN y más de 97 % de identidad de secuencia de ARN ribosómico 16S (rRNA)" (Chan et al., 2012).

Más recientemente, la posibilidad de secuenciar los genomas completos, han provisto a la taxonomía bacteriana de nuevas herramientas como por ejemplo la identidad de nucleótidos promedio (ANI – Average nucleotide identity), que surge al comparar por pares las secuencias de los genomas de dos cepas. ANI presenta una fuerte correlación con los valores DDH (Goris et al., 2007; Richter & Rosselló-Mora, 2009), con un valor ANI de  $\geq 95$  % correspondiente al 70 % de similitud en DDH (Kim et al., 2014).

La taxonomía moderna utiliza un enfoque polifásico, en el que una especie bacteriana representa "un grupo monofilético y de organismos con cierta similitud a nivel del genoma en relación a diversas características independientes, lo que hace que sea una herramienta de diagnóstico de propiedades fenotípicas discriminativas" (Rosselló-Mora & Amann, 2001). El inconveniente de este enfoque radica en el hecho de que está basado en características fenotípicas, a su vez relacionadas con el crecimiento de cultivos puros, que no se puede aplicar a especies bacterianas no cultivables (Rappé & Giovannoni, 2003), además son técnicas de difícil estandarización en comparación con las modernas técnicas de secuenciación masiva (Konstantinidis et al., 2006; Chan et al., 2012).

Diversos elementos son los que generan una presión evolutiva en los genomas bacterianos: la constante acumulación de mutaciones puntuales o pequeñas inserciones/deleciones, la influencia de la recombinación homóloga en algunos linajes, y el papel clave de ganancia/pérdida de genes por transferencia horizontal, que podrían destruir señales filogenéticas (Silva & Vinuesa, 2007). Estas variaciones genéticas ocurren con distinta frecuencia en diferentes linajes bacterianos. Por ejemplo, las

secuencias del gen *16S rDNA* se ha demostrado que no refleja la verdadera divergencia del genoma entre dos cepas (Chan et al., 2012), muy probablemente debido a que no muta libremente. Tal es así que se ha demostrado que la secuencia de la región espaciadora interna no transcripta (ITS) es más variable, lo que aporta más información para la evaluación taxonómica de las cepas de *Bradyrhizobium* (Kwon et al., 2005). Sin embargo, si se considerara que la taxonomía bacteriana podría, y debería, abandonar enfoques fenotípicos para confiar exclusivamente en el análisis de datos de las secuencias de los genomas, esto conduciría a desafiar conceptos y metodologías.

En la actualidad la definición de especie bacteriana se basa en el diagnóstico de similitud entre las cepas. Es una concepción tipológica de las especies ya que se siguen considerando entidades definidas por atributos típicos o esenciales (Mayr, 1970; Ward, 1998). Se designan cepas “*tipo*” y sus caracteres fenotípicos y genotípicos se consideran comunes a todos los organismos que pertenecen a esa especie. El concepto tipológico ignora el hecho de que las especies están compuestas de poblaciones naturales con una organización interna que les provee de una estructura que va más allá de una mera agregación de individuos (Silva & Vinuesa, 2007). El reemplazo del pensamiento tipológico por el pensamiento poblacional ha sido una de las mayores revoluciones conceptuales en biología, pero aún no se ha incorporado a la sistemática bacteriana.

Los rizobios se han agrupado en 13 géneros que incluyen unas 98 especies de  $\alpha$  y  $\beta$ -proteobacteria a los que se conoce como  $\alpha$ -rizobios y  $\beta$ -rizobios (<http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>). Los rizobios fijadores de nitrógeno que forman nódulos con la soja pertenecen al grupo de las  $\alpha$ -Proteobacterias, familia Rhizobiaceae. Estas bacterias pertenecen a los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer* o *Bradyrhizobium*. Investigaciones recientes han demostrado la existencia de nuevas especies, algunas de las cuales probablemente tuvieron origen en la transferencia horizontal de genes simbióticos y rearrreglos que ocurrieron con posterioridad.

El género *Bradyrhizobium* fue descrito por Jordan en 1982, este incluye a bacterias que establecen simbiosis con varias especies de leguminosas. Se caracterizan por un crecimiento lento y porque alcalinizan los medios de cultivo con manitol como fuente de carbono. En los últimos años, se han profundizado los estudios genéticos de representantes de este género, incluyendo marcadores moleculares que revelaron altos niveles de diversidad genética (Menna et al., 2009; López & Balatti, 2012). A pesar de su

alto nivel de diversidad tres son las especies de simbioses de soja de crecimiento lento que se han descrito, [*Bradyrhizobium japonicum* (Jordan, 1982), *B. elkanii* (Kuykendall et al., 1992) y *B. liaoningense* (Xu et al., 1995)].

Varias son las herramientas moleculares que han sido utilizados para caracterizar y agrupar cepas de *Bradyrhizobium*. Entre ellos se incluyen el análisis de restricción de fragmentos polimórficos (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) (Minamisawa et al., 1992, Sadowsky et al., 1991). Si bien esta técnica ha sido útil para identificar y establecer relaciones entre los organismos, es una técnica laboriosa que por otro lado brinda información limitada en líneas isogénicas cercanas de bradyrizobios (Judd et al., 1993).

Los genomas de las bacterias procariontas se ha demostrado que contienen secuencias repetidas que se encuentran con diversa frecuencia, entre las que se pueden mencionar elementos de inserción, operones rRNA, genes tRNA, entre otros. Estas secuencias cumplen un rol clave en la evolución de los organismos, debido a que suelen ocurrir rearrreglos de ADN que resultan en deleciones, duplicaciones e inversiones de secuencias del genoma (Lupsky & Weinstock, 1992). La amplificación de regiones palindrómicas extragénicas repetitivas (REP-Repetitive Extragenic Palindromic) (Versalovic et al., 1991) y de las secuencias estables conocidas como BOX (Van Belkum et al., 1998), son herramientas útiles para caracterizar genomas bacterianos. Estas secuencias repetitivas invertidas son altamente conservadas, tienen baja homología entre sí, y habitualmente se encuentran en transcritos intergénicos, pero no en regiones traducidas (Vachot-Griffin & Thies, 2005). La posición relativa de estas regiones en el genoma bacteriano, se conserva en las cepas estrechamente relacionadas, pero cambian su ubicación en las diversas especies y/o géneros. Es decir que, los patrones de bandas generados por PCR – basadas en secuencias repetitivas de aislados bacterianos, han permitido diferenciar especies, subespecies e incluso cepas (Rademaker et al., 2005). La amplificación de las regiones genómicas que se ubican entre secuencias REP o BOX a veces generan un patrón típico para las especies y otras veces para los aislados (De Bruijn, 1992; Versalovic et al., 1991; Versalovic et al., 1992).

El genoma de *B. japonicum*, contiene un inusualmente alto número de secuencias repetitivas (RS – repetitive sequence) entre las que se han descrito RS $\alpha$  y RS $\beta$  (Sameshima et al., 2003). En *B. japonicum* y probablemente en el resto de las especies de *Bradyrhizobium* estas secuencias se ubican frecuentemente en los sitios del genoma que

contienen los genes que codifican las enzimas de fijación de nitrógeno (genes *nif* y *fix*) (Kaluza et al., 1985). Estas secuencias repetitivas tienen características estructurales similares a las de los elementos de inserción de los procariotas (Minamisawa et al., 1998) y han sido asociadas con mecanismos naturales de recombinación o rearrreglos de los genomas. Esto y el hecho de que en la naturaleza es frecuente la aparición de mutantes espontáneos que difieren en su capacidad para fijar nitrógeno (Kuykendall, 2005) sugieren que rearrreglos del genoma en los que estas secuencias juegan un rol clave, es el mecanismo a través del cual se generan mutantes naturales en los suelos.

Las regiones repetitivas de los genomas están conservadas y por ello se han utilizado para la identificación y/o caracterización de cepas (Vachot-Griffin & Thies, 2005). En *B. japonicum* las regiones repetitivas del genoma RS $\alpha$  y RS $\beta$  también han sido utilizadas para caracterizar cepas (Annapurna et al., 2007). Hahn & Hennecke (1987) demostraron que estas regiones repetitivas en ciertas cepas son variables y además demostraron la ocurrencia de mutaciones naturales de *Bradyrhizobium* a partir de la recombinación de secuencias RS $\alpha$ . Esto puede generar la delección de fragmentos de ADN, pudiendo ser estos cambios, responsables de alteraciones en la capacidad de fijación de nitrógeno, si bien el fenotipo de estos mutantes no fue estudiado.

La diversidad de las poblaciones alóctonas de bradyrizobios de soja ha sido evaluada por varios métodos: serología, patrones de bandas de proteínas, resistencia intrínseca a los antibióticos, composición de ácidos grasos, taxonomía numérica y técnicas moleculares que evalúan cambios a nivel del genoma (Fuhrmann, 1989; Noel & Brill, 1980; Kuykendall et al., 1988; Hartmann et al., 1992). Entre estas metodologías, las “huellas dactilares” de hibridaciones con secuencias repetitivas RS $\alpha$  y RS $\beta$  han permitido discriminar entre individuos de una población. Estudios previos con RS $\alpha$ - y RS $\beta$ -fingerprints sugieren que las poblaciones alóctonas de bradyrizobios de soja están compuestas de bacterias que poseen estructuras genómicas muy heterogéneas. Por otra parte, los análisis RS-fingerprints se correlacionaron con especies *Bradyrhizobium* y genotipos *hup*, lo que sugiere que esta técnica refleja la historia de la evolución y los antecedentes genéticos de los bradyrizobios (Hartmann et al., 1992; Minamisawa et al., 1992; Minamisawa et al., 1999).

Muchos estudios han reportado un alto nivel de diversidad de las cepas naturalizadas de *Bradyrhizobium* en ecosistemas contrastantes, en diferentes continentes, y asociada a distintas prácticas agrícolas. Así en estudios realizados con aislados

asiáticos noduladores de soja de diversos suelos, se encontraron cinco linajes (*B. japonicum* la, *B. elkani*, *B. yuanmingense*, *B. liaoningense* y un nuevo linaje). Este trabajo reveló que los aislados de *B. japonicum* la mostraban niveles de polimorfismos más bajos que el resto de los linajes analizados (Vinuesa et al., 2008). En Brasil, Ferreira et al. (2000) asociaron la diversidad encontrada en los bradyrizobios de suelo al tipo de labranza y el sistema de rotación de cultivos. Los efectos positivos de la siembra directa, sobre todo en condiciones tropicales, podrían atribuirse a varios factores, como la temperatura más baja y mayor contenido de humedad del suelo, la conservación de los agregados del suelo y un mayor contenido de carbono, favoreciendo a la biomasa del suelo y a muchas clases de microorganismos, incluyendo rizobios. Hay incluso reportes de aumentos en la supervivencia de rizobios, el crecimiento y la diversidad, en la actividad de inducción de genes de nodulación, en la nodulación, la distribución de nódulos en el perfil del suelo, y en las tasas de fijación de N<sub>2</sub> cuando se ha implementado la siembra directa (Ferreira et al, 2000;. Hungría & Vargas, 2000; Kaschuk et al., 2006).

Además del tipo de labranza, la leguminosa también actuaría alterando la población de rizobios y la diversidad, sobre todo debido a los efectos de la rizósfera sobre los microorganismos (Pena-Cabriales & Alexander, 1983; Xie et al., 2012). Sin embargo estudios de diversidad genética que no se reflejaron en la variabilidad de genes *nif*, indicarían que la variabilidad genética parecería estar asociada principalmente con la adaptación, capacidades saprófitas, y la competitividad, y no con la efectividad simbiótica, ya que la similitud de genes simbióticos fue mayor que la de regiones conservadas del ADN (Batista, 2007). Por último, la nodulación de la leguminosa también puede representar un mecanismo de supervivencia de rizobios (Ferreira et al., 2000). Un inadecuado manejo del suelo, reduciría la diversidad de los bradyrizobios. Se ha registrado que la adición de fertilizantes al suelo reduce la diversidad de los rizobios (Ferreira et al., 2000).

Sin embargo, la mayor diversidad de los bradyrizobios podría ser el resultado de la convivencia de las cepas en el suelo. Estudios posteriores demostraron que es probable que la diversidad fisiológica y genética de los bradyrizobios aumente aun cuando los individuos no se encuentren en contacto. En trabajos desarrollados en ambientes controlados de laboratorio y con cultivos puros, se encontró divergencia entre las cepas progenitoras y sus subcultivos explicados por una recombinación genética intra-poblacional (Torres et al., 2012).

Así, trabajos realizados en otros países de la región demostraron que las poblaciones autóctonas aisladas de suelos con historial de cultivo de soja poseen altos niveles de polimorfismo en comparación con las cepas de los inoculantes que les dieron origen (Hungria et al., 2006, Loureiro et al., 2007, Batista et al., 2007). Por lo tanto, es probable que las poblaciones autóctonas de los suelos argentinos con historia de cultivo de soja también sean diversas, aunque el genotipo de E109 debería ser el predominante, debido al extenso uso que se hace de la biofertilización.

En esta sección se analiza la diversidad genotípica de una colección de aislados mediante marcadores moleculares del tipo Box A1R, REP y RS  $\alpha$  los cuales ya han sido utilizados exitosamente por diversos autores (Batista et al., 2007, Barcellos et al., 2007, Melchiorre et al., 2011). Los resultados se analizaron con el software SynGene. Además se realizó el análisis por Southern blot de la distribución de regiones repetitivas RS $\alpha$  y RS $\beta$  en el genoma de los aislados en estudio.

### **Hipótesis del capítulo**

*La presencia de rizobios en suelos donde fueron introducidos artificialmente, proviene exclusivamente de las cepas utilizadas en inoculantes comerciales que se han naturalizado, y por lo tanto son cepas estrechamente relacionadas.*

*Los aislados en estudio corresponden a distintas cepas de las especies *Bradyrhizobium japonicum* y *B. elkanii*.*

### **Objetivo del capítulo**

*Establecer la relación de los rizobios aislados de suelo con los que se han inoculado y analizar además la diversidad de los mismos.*

## ***Materiales y métodos***

### *1. Cepas bacterianas y cultivos*

Las cepas bacterianas utilizadas en esta parte del trabajo se describen en el capítulo 2, apartado 1. Las condiciones y medios de cultivo utilizados se detallan en el capítulo 2, apartado 3.

### *2. Aislamiento de ADN de *Bradyrhizobium*.*

Se utilizó el kit comercial *AquaPure genomic DNA isolation* (Bio-Rad). Se recolectaron 5 ml de cultivo de *Bradyrhizobium* y se lavaron con 1 ml de Sarkosil al 0,1 % en TE. La lisis se provocó adicionando de 0,6 ml de “*Lysis Solution*” luego se incubó durante 10 min a 80 °C. Se dejó enfriar a temperatura ambiente y se añadieron 30 µl de “*Solution RNase*”. Se mezcló por inversión de los tubos y se incubó 1-2 hs a 37 °C. Luego se adicionaron 0,2 ml de “*Protein Precipitation*” y se agitó vigorosamente durante 20 s. Se incubó en hielo 10 min. La muestra se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo.

El ADN se precipitó añadiendo 0,6 ml de isopropanol frío, se agitó por inversión la mezcla total y se incubó durante 10 min a -20 °C. Se centrifugó 10 min y se lavó el sedimento con 0,2 ml de etanol 70 %. Luego, el ADN se resuspendió en 50 µl de agua bidestilada.

#### *2.1. Lisado de colonias*

Se resuspendió en 0,1 ml de agua desionizada estéril una colonia de *Bradyrhizobium*. Luego se centrifugó durante 2 min a 13000 rpm. Se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó dos veces con 0,1 ml de agua. Tras el último lavado, las células se resuspendieron en 0,1 ml de agua y se incubaron durante 10 min a 85-90 °C. Se centrifugó 2 min a 13000 rpm y una alícuota del sobrenadante (2-4 µl aprox.) se utilizó como molde para las reacciones de amplificación.

### *3. Manipulación y amplificación de ADN*

#### *3.1. Digestión con enzimas de restricción*

La digestión del ADN se realizó en las condiciones de pH y temperatura recomendadas por los proveedores (Promega, Sigma, Roche). Se utilizaron 5 U de

enzima/ $\mu\text{g}$  de ADN, de manera que la digestión sea completa. La digestión se realizó durante 12 hs. Las digestiones con dos enzimas de restricción se realizaron en un buffer compatible para ambas. Cuando esto no fue posible, se realizó primero la digestión con la enzima que requirió un buffer de menor fuerza iónica.

### 3.2. PCR

Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction, PCR). La desnaturalización se realizó a 94 °C durante 30-45 s; al comienzo del programa de PCR se incluyó un primer ciclo de desnaturalización de 3 min. La temperatura de hibridación varió en función de las secuencias de los cebadores entre los 55-60 °C y el tiempo estándar fue de 30 s. El tiempo de extensión se ajustó en función del tamaño del amplicón objeto del estudio y del tipo de enzima usada (*Taq* polimerasa ~ 1Kb/1min). Dependiendo de la finalidad se utilizaron distintas polimerasas: *High Fidelity*® (Roche) o *Pfu* polimerasa (Promega), o la adición de un *enhancer* (Inbio) para la obtención de fragmentos largos, mientras que para comprobaciones de rutina se utilizó *Taq* polimerasa (Inbio).

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25  $\mu\text{l}$  conteniendo 10-100 ng de ADN molde, 25 pmol de cada uno de los cebadores específicos, 0,1 mM de desoxinucleótidos, buffer 1X y 2 U de ADN polimerasa. La amplificación se realizó en un termociclador *Termocycler*® y el programa empleado varió dependiendo del objetivo.

La purificación de productos de PCR (eliminación de cebadores y sales) se realizó mediante columnas *MicroSpin*™ S-300HR (GE healthcare) o con el uso del *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen). En casos en los que no se requirió un mayor grado de pureza de los amplicones, se precipitaron con PEG - NaCl (PEG-polietilenglicol).

### 3.3. Multiplex

La reacción multiplex consistió en una reacción de amplificación que se realizó con dos pares de primers (sar/sal y nol/noe). Un par de primers amplifica un fragmento de ADN de 730 pb que corresponde a genes *nolBT* de *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* y el otro par amplifica un fragmento de 900 pb homólogo a *RS $\alpha$*  en *Bradyrhizobium*. Esta reacción discriminó entre cepas de *S. fredii* y *Bradyrhizobium* (Pastorino et al., 2003). Las condiciones de reacción se detallan en la tabla 3-I.

### 3.4. PCR de colonia

Se utilizó como ADN molde una colonia picada desde la placa con un palillo estéril que se agitó dentro de la mezcla de reacción de PCR.

### 3.5. RFLP de genes *nifDK* y *nifH*

Los genes *nifD* (1170 pb), *nifK* (1850 pb) y *nifH* (885 pb) se amplificaron con dos pares de primers homólogos a la secuencia *nifD* y *nifH* de *B. japonicum* y *B. elkanii*.

La secuencia del gen *nifD* se ubica en el genoma de *B. japonicum* USDA110 en las posiciones 1907825 – 1909327 pb (Fedorov et al., 2008) y tiene un tamaño de 1503 pb, de los cuales se amplificó con los primers NifD-1f y NifD-1r una región interna de 1170 pb.

El gen *nifH* se ubica en el genoma de *B. japonicum* en la posición 1928567 – 1929451pb. Este tiene un tamaño de 885 pb, y los primers se ubican en las posiciones 28/50 y 809 /788 de la secuencia blanco (Laguerre et al., 2001) de manera que el tamaño del fragmento amplificado fue de 782 pb. Los primers NifH-f y NifH-r tienen en sus secuencias algunas bases degeneradas de manera de ampliar la capacidad de amplificación de las mismas.

La secuencia del gen *nifK* se ubica en el genoma de *B. japonicum* USDA110 en la porción delimitada por las posiciones 1909394 – 1911144 pb, tiene un tamaño de 1556 pb. Se amplificaron 1850 pb que incluyeron las regiones flanqueantes del gen utilizando los primers NifK-f y NifK-r.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 15 µl, conteniendo 10 ng de ADN genómico molde; buffer de reacción 1X (50 mM KCl; 10 mM Tris-HCl, pH 9,0 a 25 °C; 0,1 % Triton X 100); 0,05 µM de cada primer; 20 µM de cada dNTP; 1,5 mM Cl<sub>2</sub>Mg; 1 U *Taq* ADN polimerasa (Highway Molecular Biology).

Se utilizó un termociclador *MiniCycler Hot Bonnet*, M&J Research modelo V1.0. Las condiciones de la reacción fueron: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 94 °C por 3 min, seguido por ciclos de desnaturalización - annealing - extensión como se describen en la tabla 4-II; con un ciclo de extensión final a 72 °C por 2 min.

La restricción del gen *nifD* se realizó con la enzima *EcoRV*. La restricción in silico de la secuencia de *B. japonicum* USDA 110 generó tres fragmentos de 858, 192 y 120 pb.

El gen *nifH* fue digerido con *NaeI*, y la digestión in sílico considerando la secuencia de USDA110 generó tres fragmentos de 171, 102 y 509 pb. La restricción del gen *nifK* se realizó con la enzima *HinfI*. La restricción in sílico de la secuencia de este gen de *B. japonicum* USDA110 generó 5 fragmentos de 52, 123, 162/164, 581 y 768 pb.

Tabla 3-I: Condiciones específicas de reacciones de PCR del capítulo.

PCR	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Ciclos	Extensión final
NifK	95 °C, 4 min	94 °C, 1 min	58 °C, 45 seg	72 °C, 2 min	28	72 °C, 5 min
NifH	94 °C, 3 min	94 °C, 1 min	57 °C, 1 min	72 °C, 2 min	35	72 °C, 5 min
NifD	94 °C, 3 min	94 °C, 5 seg	52 °C, 20 seg	72 °C, 90 seg	30	72 °C, 5 min
Multiplex	95 °C, 3 min	95 °C, 45 s	65 °C, 1 min	-	29	72 °C, 5 min
BOX	95 °C, 3 min	94 °C, 1 min	52 °C, 1 min	65 °C, 8 min	35	68 °C, 16 min
REP	95 °C, 6 min	95 °C, 1 min	40 °C, 1 min	65 °C, 8 min	30	65 °C, 16 min
RS $\alpha$	95 °C, 4 min	94 °C, 1 min	55 °C, 1 min	72 °C, 1 min	25	72 °C, 5 min
ITS	94 °C, 3 min	94 °C, 45 s	60 °C, 1 min	72 °C, 90 s	30	72 °C, 5 min
RS $\alpha$ sonda y RS $\beta$ sonda	94 °C, 3 min	94 °C, 15 s	60 °C, 15 s	72 °C, 30 s	30	72 °C, 5 min

#### 4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en esta parte del trabajo fueron sintetizados por: Operon molecules for life ([www.operon.com](http://www.operon.com)) y Ruralex-Fagos.

Oligos	Secuencia (5'-3')	Fragmento amplificado	Referencia
Sar	GGCTCGGCTCTGTCGTTGTATGC	RS $\alpha$ , 900 pb	Hartmann et al., 1996
Sal	AGCGGGCGCGGATAGTTCTGTTG		
nolBT - F	TGGGCAAGCGACGCTGCCGG	<i>nolXWBTUV</i> locus, 730 pb	Pastorino et al., 2003
nolBT - R	CGCTCTTGCAACTGGGTATA		
Box1AR	CTACGGCAAGCGACGCTGACG	Elementos repetitivos	De Bruijn, 1992
Rep-f	IIICGICGICATCIGGC	Región repetitiva extragenética Palindromica	Versalovic et al., 1991
Rep-r	ICGIC'TTATCIGGCC'TAC'		
RS-17	ACGCATACAACGACAGAGCC	Region repetitiva RS $\alpha$	Minamisawa et al., 1998
RS-18	TCAAATCGCGCTGCAACGTC		
R16-1	CTTGACACACCGCCCGTCA	ITS, 1289 pb	Soon-Wo Kwon, 2005
R23-3R-r	GGTACTTAGATGTTTCAGTTC		
RS $\alpha$ - F sonda	ATGTTGTCGGCCTCTATG	~500 pb	Este trabajo
RS $\alpha$ - R sonda	ACTTGTCCGCCGTGAAATG		
RS $\beta$ - F sonda	TTGTTGCCGCGGATTGAAG	~500 pb	Este trabajo
RS $\beta$ - R sonda	CGTCCCTGATTGTAGAAG		
RS $\beta$ - F	AACTCGAGGCTGCTGAAC TG	RS $\beta$ , 500 pb	Este trabajo
RS $\beta$ - R	CCGCGGT CATGATCTTTCTA		
NifD - lf	GIGGITCGGCYTA YGCMGG	<i>nifD</i> , 1170 pb	Fedorov et al., 2008
NifD-1r	CCC AIGARTGCATYTGICGGAA		
Nif H-f	TACGGNAARCGSGNATCGGCAA	<i>nifH</i> , 782 pb	Laguerre et al., 2001
Nif H-r	AGCATGTCYTC SAGYTCNTCCA		
Nif K-f	ATCACGGTTATGACGGCTTTGCG	<i>nifK</i> , 1850 pb	Este trabajo
Nif K-r	TGAACTCATCCTGCTTCTCTCAGGG		

## 5. Electroforesis

### 5.1. Electroforesis en geles de agarosa no desnaturalizantes.

El análisis de productos de PCR, de ADN total o de fragmentos de restricción se llevo a cabo mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1 % en TAE 1X: [Tris-HCl 40 mM, EDTA Na<sub>2</sub> 2 mM, ácido acético glacial 0,1142 % (v/v)]. El voltaje fue de 100 V (determinados procedimientos requirieron velocidades inferiores). Como buffer de carga se utilizó una solución 6X (1 µl por cada 5 de muestra) de 0,25 % (p/v) de azul de bromofenol y glicerol 45 % (v/v).

El revelado de los geles de agarosa se realizó por inmersión de los mismos en una solución de bromuro de etidio 1 mg/ml en agua durante 15-20 min. Las fotografías de los geles se realizaron con el analizador de imágenes SynGene y fueron procesadas con el software PCGene Tools SynGene.

### 5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes.

Cuando los fragmentos de los patrones de digestión de ADN fueron de tamaños pequeños estos se resolvieron en electroforesis vertical en geles de poliacrilamida desnaturalizantes por la adición de urea 8M. El buffer de electroforesis fue TBE 1X. Se prepararon secuencialmente, esto es, primero se procedió a la disolución completa de la urea por calentamiento; después se mezclaron el resto de los componentes en las proporciones adecuadas para finalmente añadir el agente iniciador y el catalizador (25,2 g de urea, 6 ml TBE 10X, 9 ml de Acri/Bis 40 % completando con agua hasta un volumen final de 60 ml; 20 µl de TEMED y 600 µl de APS 10 %).

### 5.3. Marcadores de peso molecular

Los marcadores de peso molecular fueron en todos los casos comerciales:

- Marcador  $\lambda$ /HindIII o marcador II: ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima HindIII. Está compuesto por 8 fragmentos que abarcan desde los cientos de nucleótidos hasta más de 20 Kb. También se dispuso marcado con digoxigenina en las hibridaciones ADN-ADN (Roche®).
- Marcador III: ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima HindIII y EcoRI. Está compuesto por 13 fragmentos que abarcan desde los cientos de nucleótidos hasta

más de 20 Kb. También se dispuso marcado con digoxigenina en las hibridaciones ADN-ADN (Roche®).

- Marcador  $\Phi$ 29: ADN del fago con el mismo nombre digerido con *Hind*III. El patrón de digestión se compone de 14 fragmentos entre 72 y 4370 pb (Roche®).
- Marcador 100-1000: Compuesto por 10 fragmentos de ADN de tamaños de 100 a 1000 pb (Inbio).

#### 6. *Análisis bioinformático*

El análisis con el software PCGene Tools SynGene se basó en el estudio de presencia/ausencia de banda en los geles de agarosa con una tolerancia del 1-2 %. Los geles fueron normalizados en función de un marcador de peso molecular. Este estudio depende de las posiciones de cada banda en el gel, por lo cual se aseguró la reproducibilidad de los perfiles obtenidos en una serie de repeticiones. Además las reacciones fueron realizadas con ADN molde extraído de los cultivos bacterianos y por PCR desde colonia, incluyendo en todos los casos las cepas controles mencionadas anteriormente. Una vez obtenidas todas las fotografías de los geles, se procedió a realizar el análisis de los perfiles de bandas. Se ajustaron los porcentajes de los parámetros denominados tolerancia y posición del software PCGene Tools Syngene. Estos dos parámetros hacen referencia a los límites del software para interpretar que dos bandas son diferentes, es decir acepta hasta un cierto valor (determinado por el usuario) de diferencia de posición por encima y por debajo entre dos bandas para seguir tomándolas como si se tratara de la misma banda. En tal sentido, Vinuesa (2008) propone utilizar valores de optimización y tolerancia de 1,5 a 2 % respectivamente, aunque se pueden encontrar en la bibliografía valores de tolerancia que llegan al 5 %, dependiendo de la población estudiada (Batista et al., 2007). Los dendrogramas se obtuvieron con el algoritmo UPGMA (Sneath y Sokal, 1973) y el coeficiente DICE.

#### 7. *Secuenciación y análisis de secuencias*

Para la secuenciación de fragmentos amplificados o construcciones presentadas en este trabajo se recurrió al servicio de secuenciación de ADN MacroGen Inc por el método de Sanger (Sanger et al., 1977).

Para la comparación de secuencias e identificaciones, así como para la búsqueda de nuevas secuencias en las bases de datos se utilizó el algoritmo BLAST® (Basic Local

alignment Search Tool) disponible en la página web del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

## 8. Técnica de hibridación de ácidos nucleicos

Al realizar la determinación del patrón de regiones repetitivas de las cepas, se extrajo el ADN total a partir de 5 ml de un cultivo bacteriano incubado durante 5 días a 28 °C en agitación a 120 rpm, con el kit comercial *AquaPure genomic DNA isolation* (Bio-Rad). Se realizaron 4 digestiones de 5 µl del ADN total resultante en un volumen final de 30 µl con las enzimas *Bam*HI y *Sa*II.

Una alícuota de ADN genómico digerido (10 µl), de cada cepa, se analizó en un gel de agarosa 0,8 % en TAE de 30 cm de longitud. La electroforesis se realizó a 50 V durante 24 horas de manera de obtener una eficiente separación de las bandas de ADN en función del tamaño.

### 8.1. Hibridación ADN-ADN (*Southern Blot*)

#### 8.1.1. Transferencia alcalina por vacío

El ADN total digerido y separado en el gel de agarosa se transfirió a una membrana *biodine*® cargada positivamente. La transferencia se realizó en medio alcalino (NaOH 1M) por vacío (sistema *VacuGene*™ XL de Pharmacia). La rotura del ADN se provocó por exposición prolongada (15-20 min) del gel de agarosa, a los rayos UV en el transiluminador.

Para evitar el depósito de sales la membrana, se embebió en agua desionizada y luego se equilibró con 20 x SSC [1 x SSC: NaCl 150 mM, citrato sódico 15 mM, pH 7,0] durante 5 min. Se preparó el sistema de transferencia según las instrucciones de los proveedores evitando la formación de burbujas de aire entre la membrana y el gel. Se conectó el vacío y, una vez comprobada la estanqueidad del sistema, se cubrió con NaOH 1M. El sistema se mantuvo a 55 mbar durante 1-2 h. La fijación del ADN a la membrana se llevó a cabo por calor a vacío envuelta en papel Whatman 3MM (120 °C 35 min, 70 cm Hg).

### 8.1.2. Marcaje de la sonda

Las sondas correspondientes a las regiones repetitivas RS $\alpha$  y RS $\beta$  se sintetizaron amplificando a partir de ADN molde de la cepa *B. japonicum* E109 con los cebadores RS $\alpha$ -F/R y RS $\beta$ -F/R citados en el apartado 4 de este capítulo y ambas sondas fueron de un tamaño aproximado de 400-500 pb.

La marcación de la sonda se realizó con digoxigenina acoplada a un dUTP. Para sintetizar la sonda se utilizó como molde ADN purificado de gel luego de la amplificación. Con este molde se realizó una mezcla de reacción de PCR a la que se le adicionó digoxigenina-11-dUTP (Roche) en una concentración final de 0,1 mM. La reacción consistió en 30 ciclos del PCR. El amplicón se purificó en columnas *MicroSpin*<sup>TM</sup> *S-300HR* (GE healthcare). En paralelo se utilizaron controles sin DIG para comprobar el retraso en la migración en gel como consecuencia de la incorporación de la marca.

La sonda se diluyó a una concentración final de 60 ng del ADN/ml de solución de prehibridación. La membrana se cubrió totalmente con 5-10 ml de esta solución. Estas soluciones de hibridación se conservaron a -20 °C y se reutilizaron en sucesivas ocasiones.

### 8.1.3. Hibridación, lavados y revelado

Este proceso se realizó en un horno de hibridación *Hybridiser*<sup>®</sup> *HB-1D* (Techne). La membrana se incubó en una solución de prehibridación (20 ml/100 cm<sup>2</sup>) compuesta por 5 x SSC, sarkosil 0,1 %, SDS 0,02 %, formamida 50 % y solución de bloqueo (Roche) al 2% durante 2 horas a 42 °C. Simultáneamente se desnaturalizó la sonda mediante ebullición durante 10 min y posteriormente se pasó a hielo (5-10 min). Se desechó la solución de prehibridación y se añadió la solución de hibridación con la que se incubó a 42 °C toda la noche.

Luego de la incubación, se retiró la sonda y se procedió con los lavados y el revelado de la hibridación. Se realizaron dos lavados de 5 min a temperatura ambiente con 50 ml de 2 x SSC/SDS al 0,1 % (p/v), seguido de 2 lavados durante 15 min a 68 °C con 0,1 x SSC/SDS 0,1 % (p/v). Luego se enjuagó con 50 ml de buffer de lavado [0,3 % de Tween-20 en buffer 1 (ácido málico 0,1 M, 0,15 M de NaCl, pH 7,5)] para eliminar los restos de detergente antes de proceder con el bloqueo de la membrana.

La detección de la sonda se realizó con anticuerpos anti-digoxigenina conjugados con la enzima fosfatasa alcalina. La enzima desfosforila sustratos quimioluminiscentes como el CSPD y genera un intermediario que emite luz. Para que los anticuerpos no se fijen inespecíficamente se bloqueó la membrana añadiendo 30 ml de una solución de bloqueo [Blocking Reagent (Roche) 1 % (p/v) en buffer 1] con la que se incubó durante 30 min. Luego se retiró esta solución y se añadieron 20 ml de solución de bloqueo en los que se habría diluido 1:10000 el anticuerpo Anti-DigoxigeninAP (Roche) y se incubó durante 30 min. El exceso de anticuerpo se eliminó mediante dos lavados sucesivos con el buffer de lavado y la membrana se incubó con 50 ml de buffer 2 [Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, pH 9,5] durante 5 min. Luego se añadieron 5 ml de una dilución 1:100 del CSPD (Roche) en buffer 3 y se incubó nuevamente durante 5 min. Se dejó secar la membrana, se envolvió en plástico transparente y se incubó a 37 °C durante 15 min para desencadenar la reacción de la enzima.

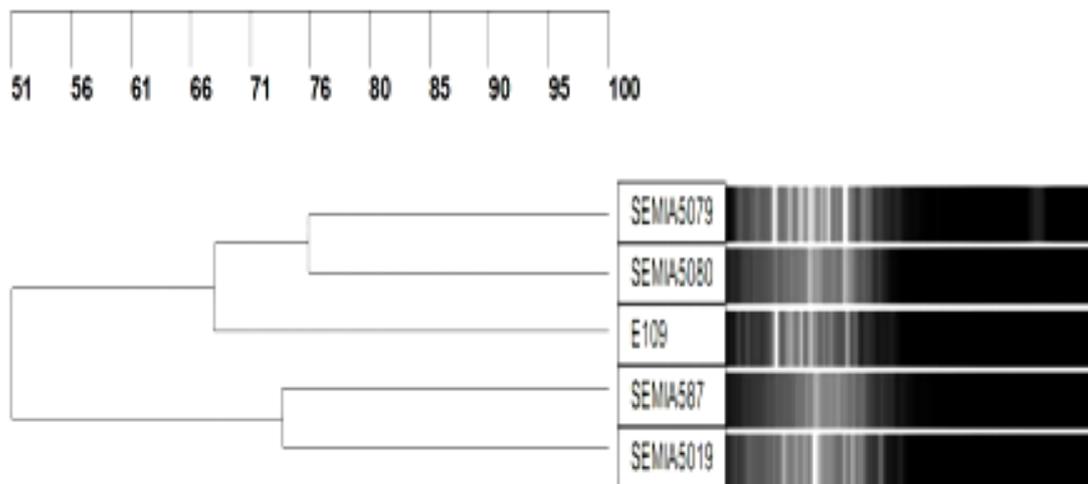
La luz emitida por el sustrato fue captada por una película Kodak X Omat. Se realizaron dos tipos de exposiciones: una de corta duración que capta los momentos de mayor emisión del sustrato (4-6 h) y otra que detectó señales débiles (24 h). El revelado de estas películas se realizó del modo tradicional con una solución de revelado y una solución de fijación según las indicaciones del fabricante.

## Resultados

El análisis de la diversidad genética de los simbiontes de soja se realizó con varios marcadores moleculares los que en conjunto revelaron la diversidad que es probable encontrar en los suelos.

### *Cepas control*

La combinación de los fingerprints generados por los marcadores REP, BOX y Multiplex-RS $\alpha$ , generó patrones de bandas que diferenciaron los genomas de las cinco cepas de uso comercial en las formulaciones de inoculantes de Brasil, Uruguay y Argentina (Figura 3-1). En el dendrograma de la figura 3-1 se observan dos clados, uno correspondiente a *B. japonicum* que incluye a E109, SEMIA5079 y SEMIA5080 y otro que incluye a SEMIA587 y SEMIA5019 correspondiente a *B. elkanii*.<sup>1</sup>



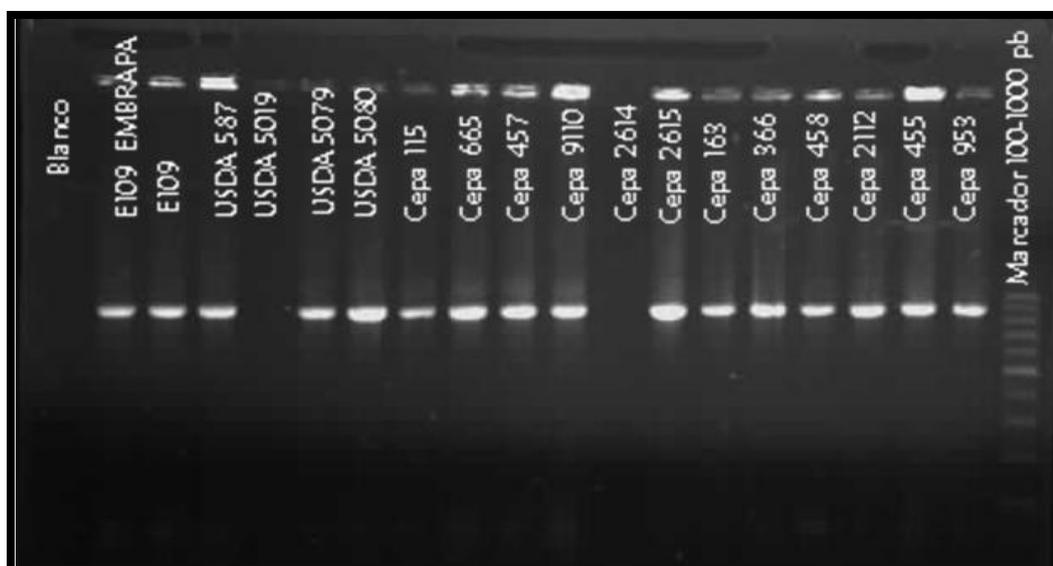
**Figura 3-1:** Fingerprints de las cepas control generado con las secuencias BOX, REP y RS $\alpha$ . Los perfiles fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene y normalizados considerando la posición de las bandas con respecto a las bandas de un marcador de peso molecular considerando un 1 % de tolerancia.

<sup>1</sup>Trabajo publicado: López, S. M., & Balatti, P. A. (2012). Closely related strains of *Bradyrhizobium* contained in commercial inoculates of soybean are identified by a set of PCR reactions. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011.

### Análisis de los fingerprints del total de aislados

#### Multiplex

El ADN molde de los aislados y las cepas controles, se utilizaron para realizar la reacción de multiplex-PCR descrita en materiales y métodos. Esta reacción generó para cada aislado una única banda de 900 pb (Figura 3-2). Tal como se describió anteriormente la presencia de esta banda y la ausencia de la banda de 730 pb, indica que las cepas pertenecen al género *Bradyrhizobium*. Si bien en la figura 3-2 esta banda de 900 pb no aparece para las cepas SEMIA5079 y 2614, la reacción se repitió y también resultó en la amplificación de la banda de 900 pb.



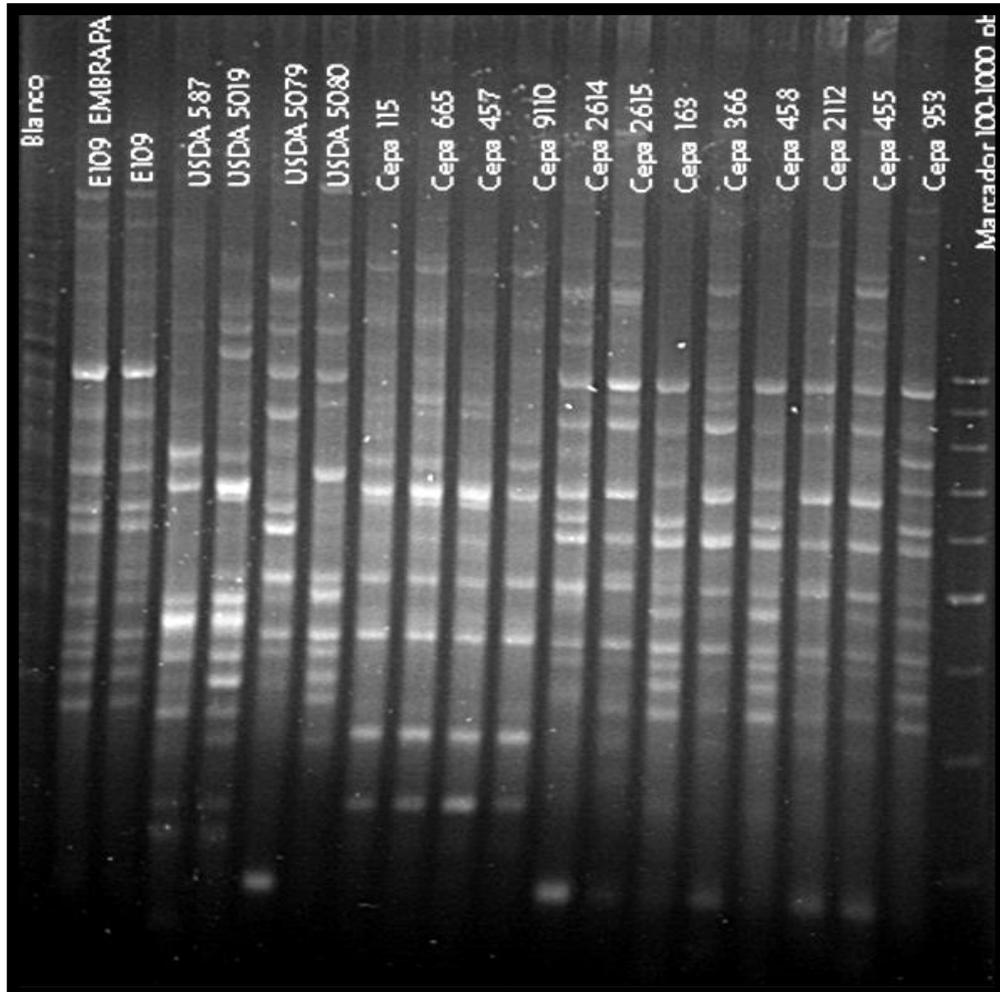
**Figura 3-2:** Reacción multiplex  $RS\alpha$ -*noIB*. Los productos de reacción se resolvieron en gel de agarosa de 1 %.

#### “Fingerprints”- Huella digital

Los aislados se caracterizaron a nivel del genoma de la misma manera que se hizo con las cepas control con marcadores BOX (Figura 3-3), REP (Figura 3-5) y Multiplex PCR- $RS\alpha$ . Estos análisis mostraron la diversidad genética de los aislados estudiados.

La amplificación con primer BOXAR1 generó patrones de bandas que incluyeron amplicones que varían en tamaños de 1500 a 100 pb con los que se construyó un

dendrograma usando el algoritmo UPGMA y el coeficiente Dice y fijando una tolerancia del 1 % (Figura 3-4).



**Figura 3-3:** PCR BOX. Perfiles de bandas obtenidos por PCR con ADN de las cepas en estudio. Gel de agarosa de 2 %.

En el dendrograma de la figura 3-4 se observa que las cepas se agrupan en dos clusters principales I y II, con un nivel de similitud de aproximadamente 40 %. El cluster I incluye a las cepas control de *Bradyrhizobium japonicum* E109, SEMIA5079 y SEMIA5080. Este cluster se divide en el IA que incluye a los aislados 953, 458, 163 y las cepas utilizadas en la formulación de inoculantes comerciales, y el cluster IB incluye cinco aislados de bradyrizobios.

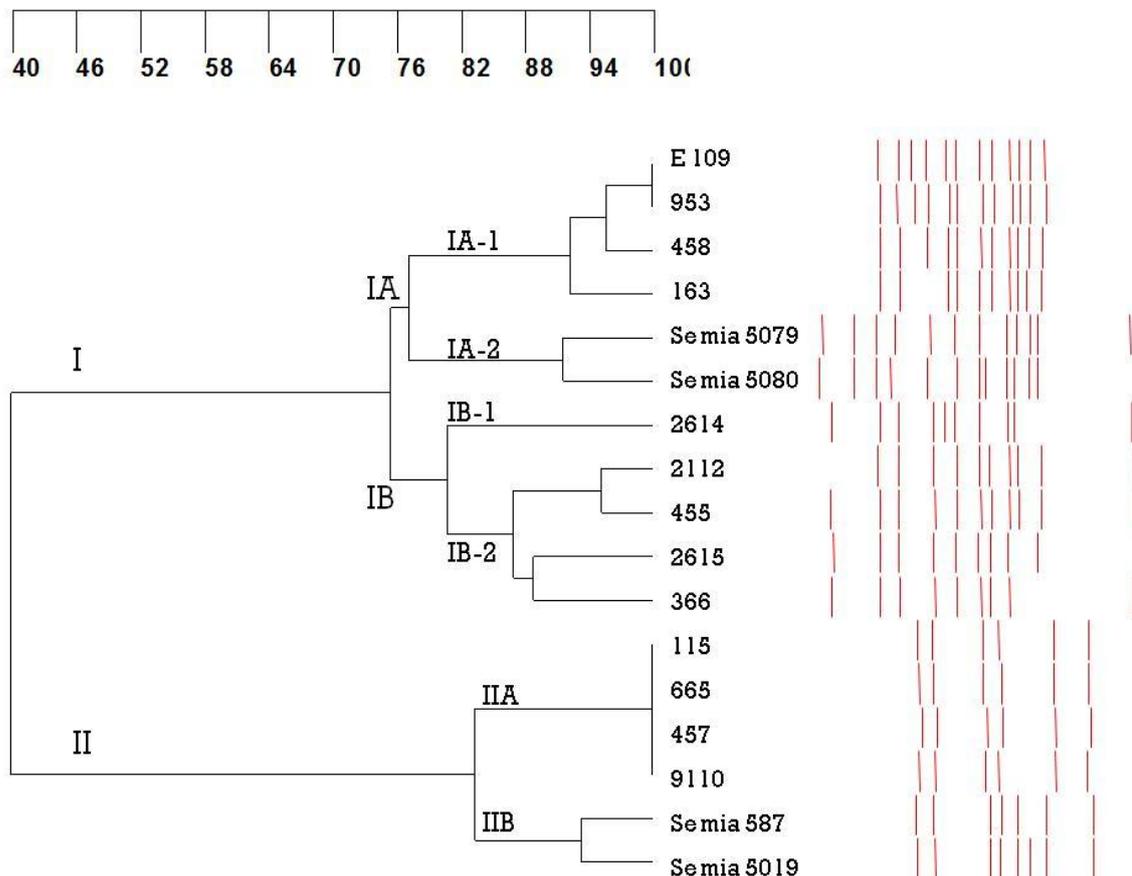
En el subcluster IA se encuentran agrupados la cepa control E109 con los aislamientos 953, 458 y 163, con un nivel de similitud de aproximadamente 90 % (IA-1).

El subcluster IA-2, que tiene un nivel de similitud del 76 % con el IA-1, agrupa solo a las cepas SEMIA5080 y SEMIA5079.

En el subcluster IB, se observan dos subclusters el IB-1 que incluye un solo aislado 2614 y el IB-2 que incluye cuatro aislados 2112, 455, 2615 y 366.

El cluster II se divide en el subcluster IIA que contiene cuatro aislados de idéntico haplotipo 115, 665, 467 y 9110 y el cluster IIB que solo incluye a las cepas comerciales SEMIA587 y SEMIA5019. Los individuos del cluster IIA y IIB tienen un nivel de similitud del 82 %.

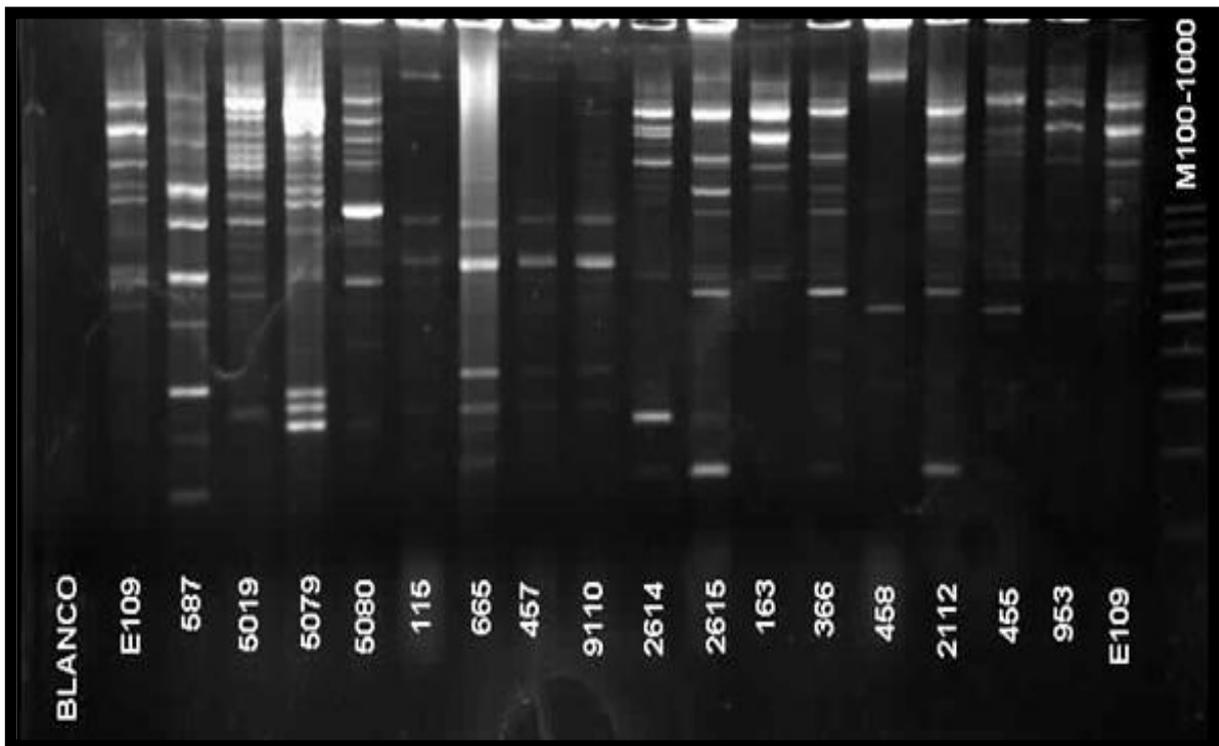
En síntesis el cluster I incluye cepas que probablemente son aislados de *B. japonicum* y el cluster II de *B. elkanii*.



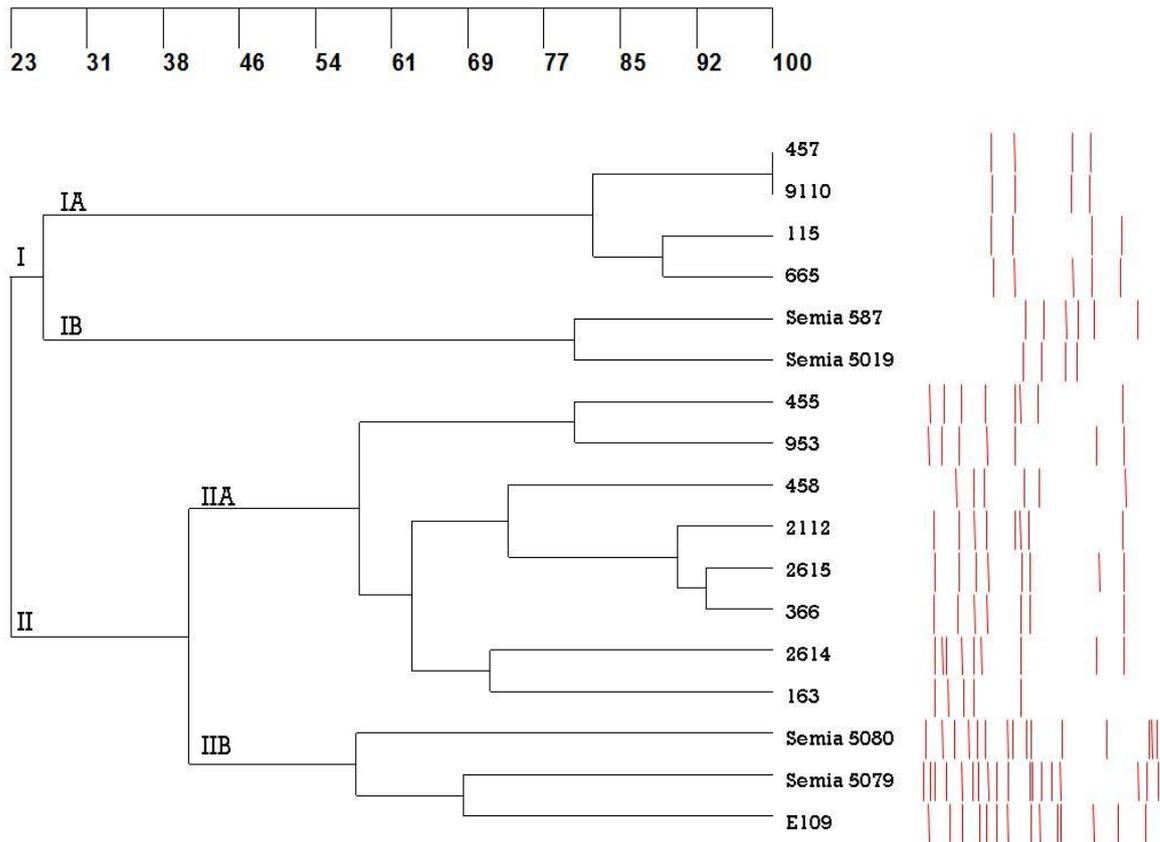
**Figura 3-4:** Dendrograma de los aislados de suelo y las cepas de *B. japonicum* (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019), basado en la huella digital de ADN con BOX AR1. Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 1 % de tolerancia.

En la figura 3-5 se muestra el gel de la reacción de amplificación con primers REP. Los patrones REP presentaron tal cual se ve en la figura, un menor número de bandas que los fingerprints realizados con primers BOX, sin embargo demostraron tener el mismo nivel de resolución para distinguir las diferencias entre cepas.

En el dendrograma de la figura 3-6 se distinguen dos clusters principales cluster I y cluster II. El cluster I incluye a cuatro aislados y las dos cepas control de *B. elkanii* que se agrupan en el subcluster IA y IB, respectivamente. El otro cluster principal II, contiene a las cepas de *B. japonicum* SEMIA5080, SEMIA5079 y E109 y a ocho aislados de bacterias fijadoras de nitrógeno de crecimiento lento, si bien el agrupamiento de los mismos fue distinto en relación a lo generado con los marcadores BOX. Aún así, el agrupamiento también sugiere que el cluster I agrupa a las cepas de *B. elkanii* y el cluster II a las de *B. japonicum*.

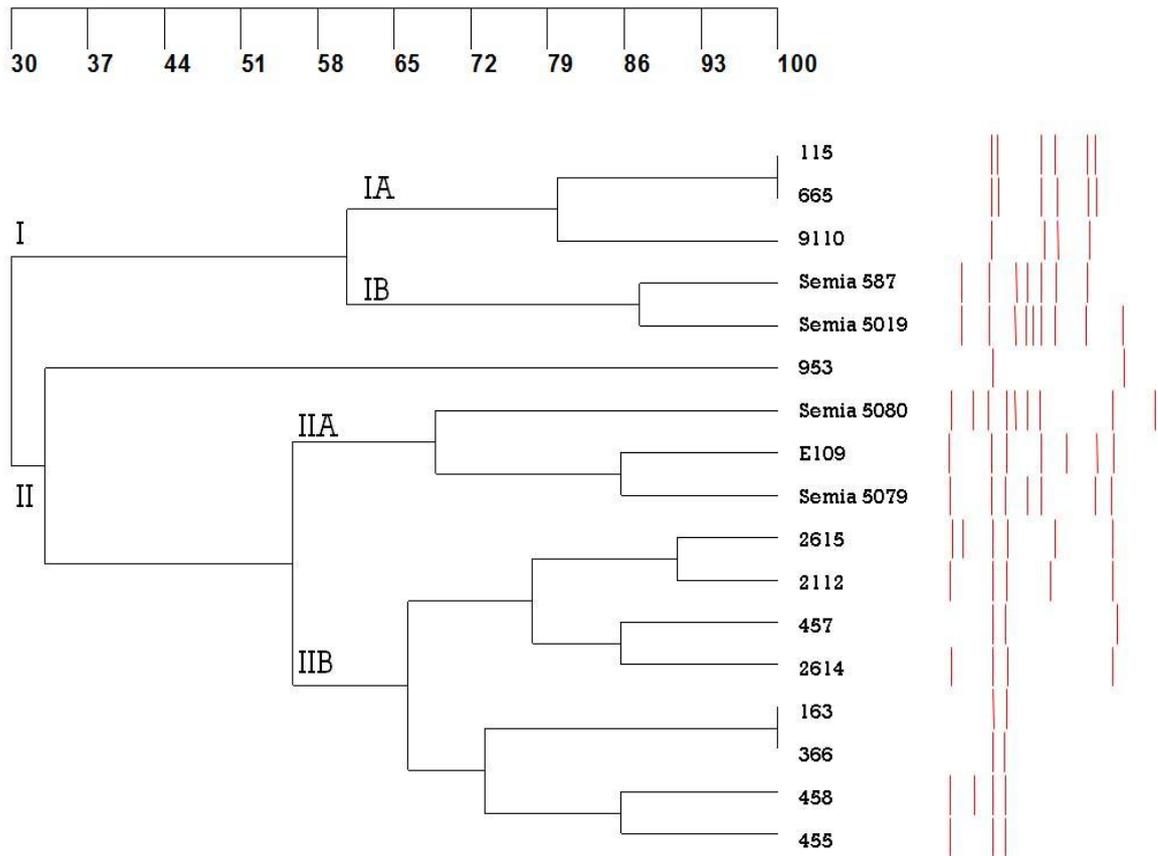


**Figura 3-5:** Reacción REP-PCR. Perfiles de bandas obtenidos con primers REP para las cepas en estudio. Gel de agarosa de 1,5 %.



**Figura 3-6:** Dendrograma de los aislados de suelo y las cepas *B. japonicum* (E109, SEMIA5079 y SEMIA5080) y *B. elkanii* (SEMIA587 y SEMIA5019), basado en la huella digital de ADN primers REP. Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 2 % de tolerancia.

Otro marcador molecular utilizado fueron las amplificaciones realizadas con primers homólogos a las regiones repetitivas  $RS\alpha$ . En este caso el análisis de los patrones de amplificación de los aislados también generó un agrupamiento con dos clusters (Figura. 3-7). El I incluyó tres aislados de los suelos 115, 665 y 9110 y las cepas control de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019. El cluster II agrupó a las cepas control de *B. japonicum* en un subgrupo y el resto de los aislados de suelo en un grupo con un alto nivel de similitud. En este caso a diferencia de los otros dendrogramas el aislado 457 aparece como más estrechamente relacionado con los aislados identificados como cercanos a *B. japonicum*.



**Figura 3-7:** Dendrograma construido con los patrones de amplificación de regiones repetitivas  $RS\alpha$ . Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 2 % de tolerancia.

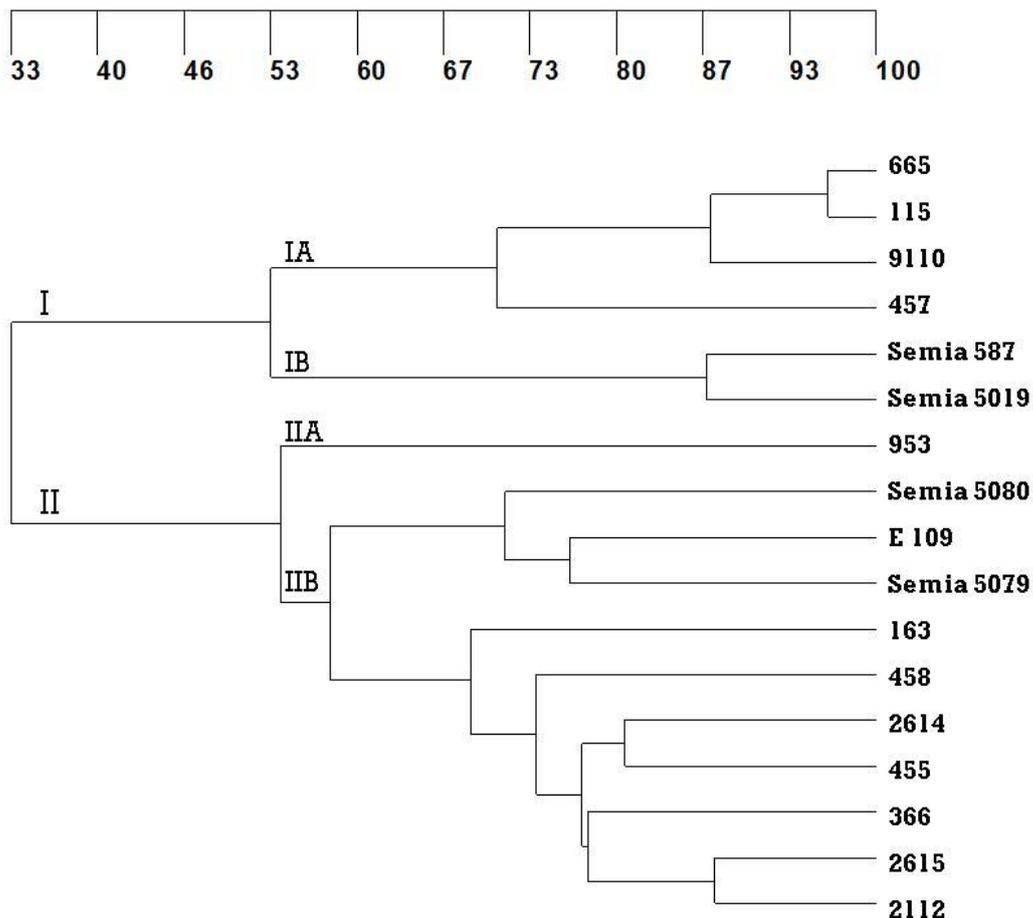
Con el fin de agrupar las cepas con mayor precisión se realizó el análisis conjunto de los patrones de amplificación BOX, REP y  $RS\alpha$ . Así se generó el dendrograma que se presenta en la figura 3-8. Este también agrupa las cepas en dos grandes grupos el I y II con un nivel de similitud del 33 %. En el cluster I se generaron dos grupos el IA que agrupa a los aislados de los suelos que tienen niveles de similitud del 70 %. El otro subgrupo el IB incluye a las cepas control de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019. En síntesis los individuos agrupados en el cluster I estarían estrechamente relacionados y por lo tanto muy probablemente son todos *B. elkanii*.

En el cluster II se distinguen dos subgrupos uno que incluye el aislamiento 953 que aparece como más distante del resto de las cepas y las cepas control de *B. japonicum* con las que tiene solo un 53 % de similitud. El resto de los aislados se agruparon en el

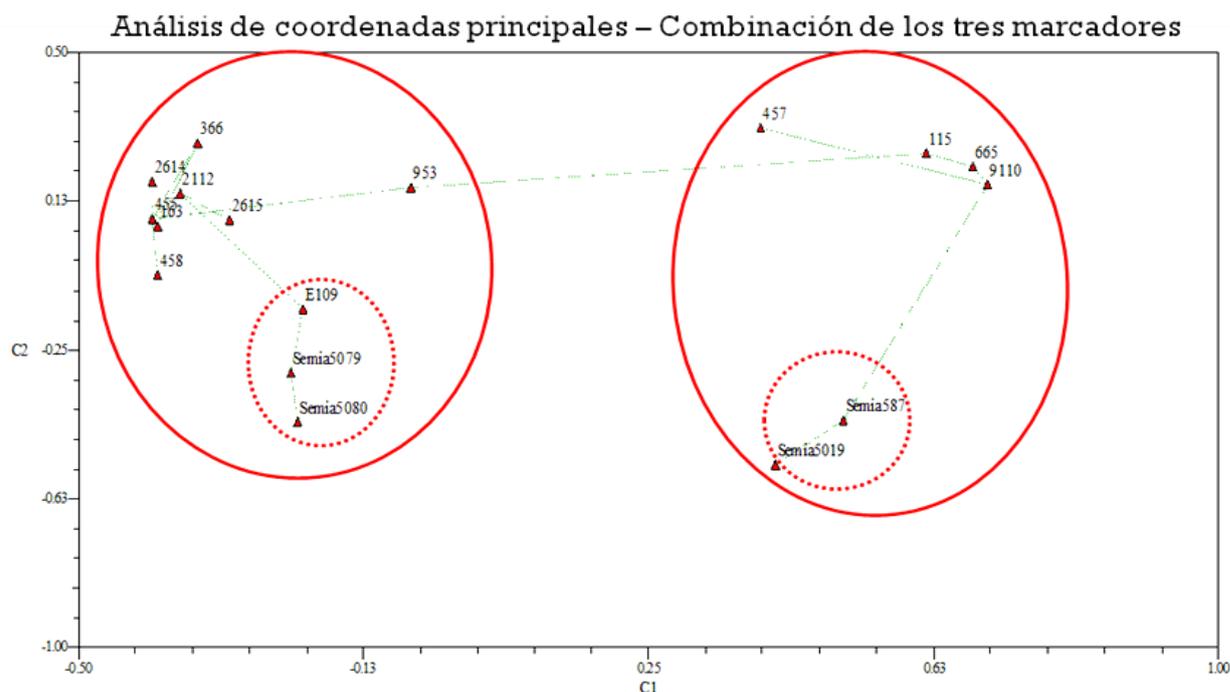
subcluster IIB. En síntesis todos los aislados que se agruparon en el cluster II se sugiere son probablemente *B. japonicum*.

Es decir que los resultados descriptos estarían indicando que los suelos muestreados contendrían aislados de *B. elkanii* y *B. japonicum*. Vale la pena mencionar que los inoculantes comerciales que en algún momento se utilizaron y otros que se utilizan en la actualidad, contenían o contienen representantes de alguna de estas dos especies.

En la figura 3-8 se presenta el gráfico que surgió de realizar un análisis de coordenadas principales. Este gráfico muestra nuevamente que un grupo de aislados está estrechamente relacionado con *B. japonicum* y otro con *B. elkanii*. Más aún, no se presentan individuos que no tengan relación estrecha con estos dos grupos.



**Figura 3-8:** Dendrograma obtenido por la combinación de los fingerprints BOX, REP y RS $\alpha$ . Los datos fueron analizados con el software PCGene Tools Syngene mediante el algoritmo UPGMA y el coeficiente DICE, considerando un 2 % de tolerancia.



**Figura 3-9:** Análisis de coordenadas principales, obtenido a partir de la matriz de similitud generada por combinación de los patrones BOX, REP y  $RS\alpha$ .

#### *Estudio de los genes codificantes de la enzima Nitrogenasa*

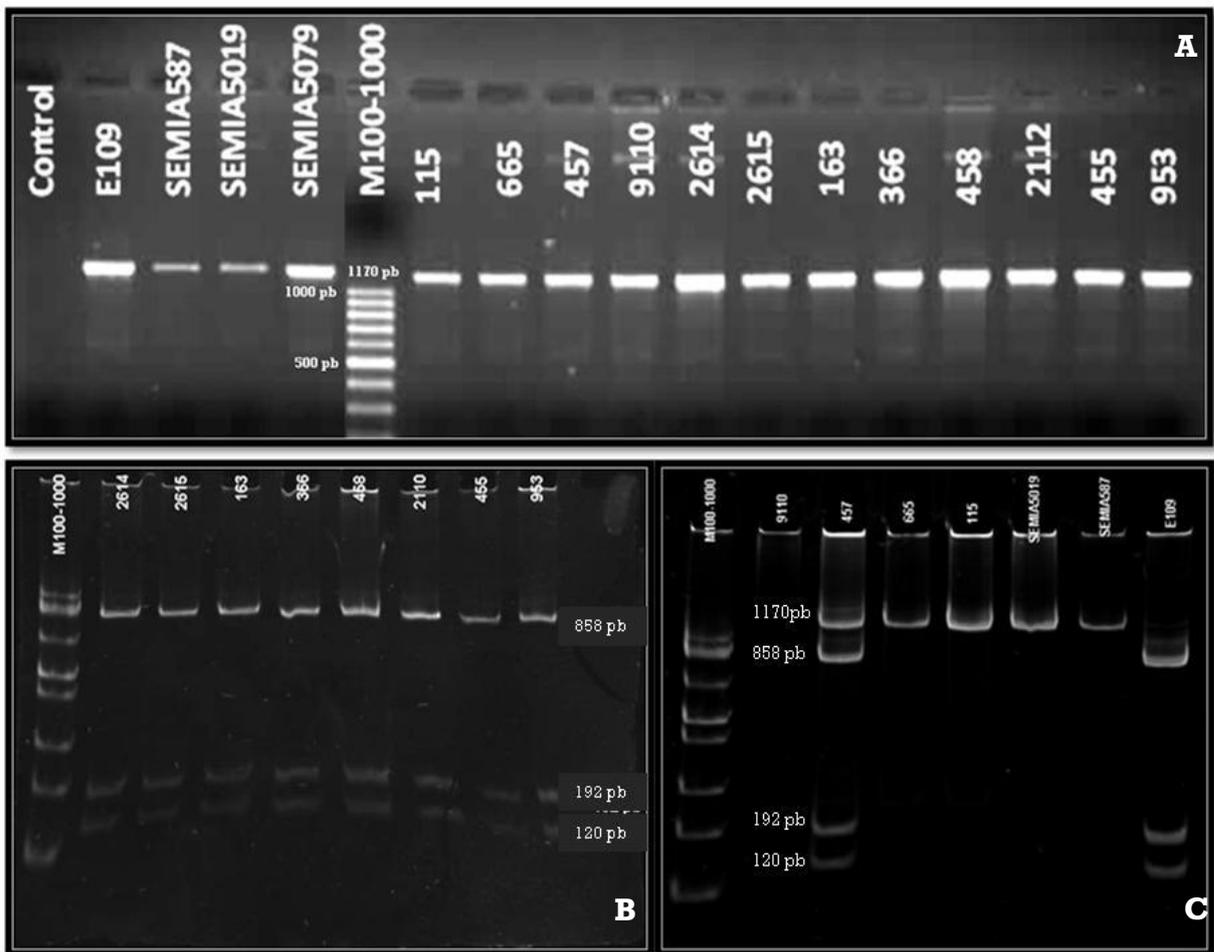
Los fragmentos amplificados de los genes de fijación de nitrógeno que codifican las subunidades  $\alpha$  (*nifD*) y  $\beta$  (*nifK*) del componente I de la nitrogenasa (proteína MoFe o dinitrogenasa) y el gen que codifica las dos subunidades idénticas del componente II (*nifH*) (proteína Fe o dinitrogenasa reductasa) se restringieron cada uno, en reacciones independientes, con dos enzimas de restricción (*EcoRV* y *NaeI*). En primer lugar se destaca que *B. japonicum* y *B. elkanii* tienen patrones de restricción propios. La sumatoria del tamaño de las bandas obtenidas en la restricción dio un tamaño final similar al del fragmento amplificado. Todo esto se confirmó a priori con el análisis in silico sobre la base de la secuencia de USDA110.

#### *Amplificación y restricción de la secuencia parcial del gen nifD*

Los amplicones de los 12 aislados generados con los primers homólogos al extremo 5' y 3' de *nifD* (Tabla 3-I), tuvieron un tamaño aproximado de 1170 pb, que

corresponde a la secuencia parcial interna del gen *nifD* cuya secuencia completa es de 1503 pb.

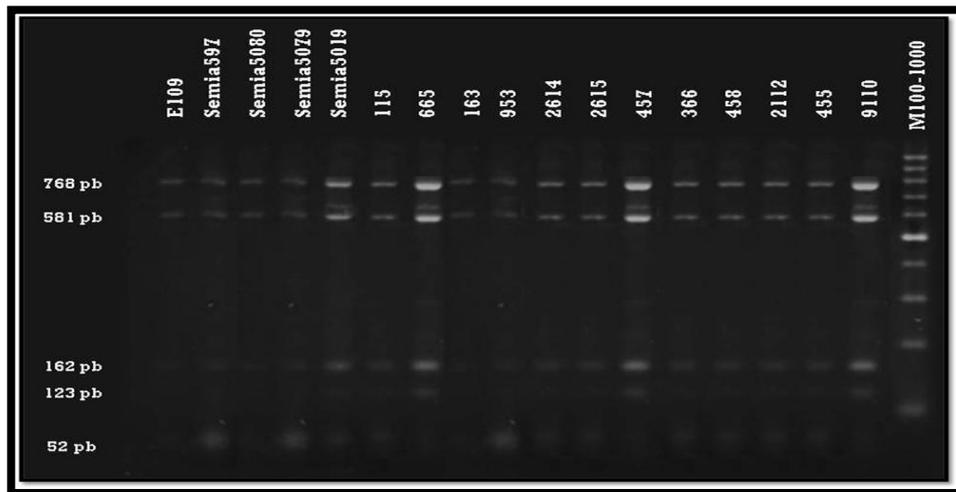
Los amplicones purificados fueron digeridos con *EcoRV*. Mientras que la digestión de los amplicones de E109, SEMIA5079, 2614, 2615, 163, 366, 458, 2112, 455, 457 y 953 presentaron un patrón de tres bandas de 858, 192 y 120 pb, similar al que se obtuvo por análisis in silico de restricción de *B. japonicum*; los amplicones de las cepas 115, 665 y 9110 no presentaron sitio de corte para la enzima por lo que solo se observó una banda de 1170 pb producto de la amplificación, lo que fue similar a lo obtenido con las cepas control de *B. elkanii*. La suma de las bandas del patrón obtenido completa tamaño del fragmento amplificado de 1170 pb.



**Figura 3-10:** (A) Amplificación del gen *nifD*. El fragmento amplificado de 1170 pb, se separó por electroforesis en un gel de 1 % de agarosa. (B-C) Productos de la digestión del fragmento amplificado con la enzima *EcoRV*.

### Amplificación y restricción de la secuencia del gen *nifK*

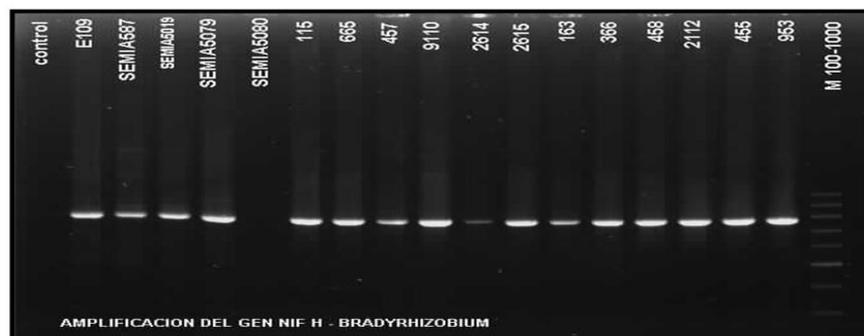
De acuerdo a la secuencia de USDA110 descrita por Kaneko et al. (2002), el gen *nifK* (1556 pb) está centrado en una secuencia de 1850 pb que fue amplificada a partir de ADN genómico de los 12 aislados de suelo y de las cepas controles seleccionadas para este trabajo. La PCR con los primers homólogos al extremo 5' y 3' de este fragmento generó una única banda del tamaño esperado, cuya digestión con *Hin*I generó un patrón único de 5 bandas.



**Figura 3-11:** RFLP del amplicón del gen *nifK* de las 17 cepas, con la enzima *Hin*I. La restricción generó 6 bandas de 768 pb, 581 pb, 164 /162 pb, 123 pb y 52 pb cuya sumatoria se corresponde con el tamaño del fragmento amplificado (1850 pb)

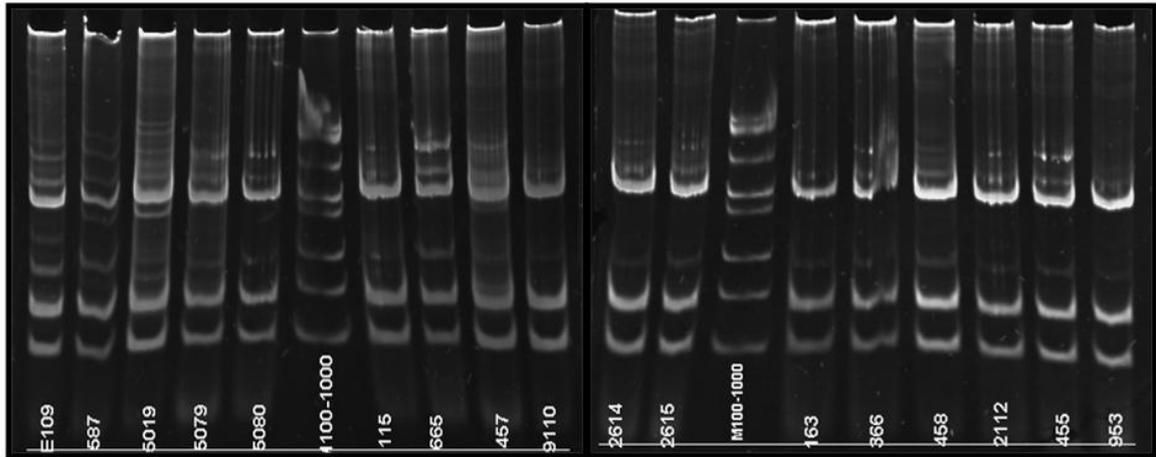
### Amplificación y restricción de la secuencia parcial del gen *nifH*

El gen *nifH*, es otro gen conservado en los rizobios y objeto de estudio en este trabajo. La reacción de PCR generó un fragmento de 782 pb independientemente de cuál fue la cepa que dio origen al ADN genómico utilizado como molde (Figura 3-12).



**Figura 3-12 .** Amplicón del gen *nifH*. El fragmento amplificado de 782 pb, se separó por electroforesis en un gel de 1 % de agarosa.

Los amplicones se purificaron y restringieron con la enzima *NaeI*. Esta restricción generó 3 bandas de 509, 171 y 102 pb, que coincide con los fragmentos que se generaron en la digestión in silico, los que en conjunto representan el mismo número de bases que el amplicón de origen. También en este caso las cepas de *B. japonicum* y de *B. elkanii* comparten el patrón de restricción.

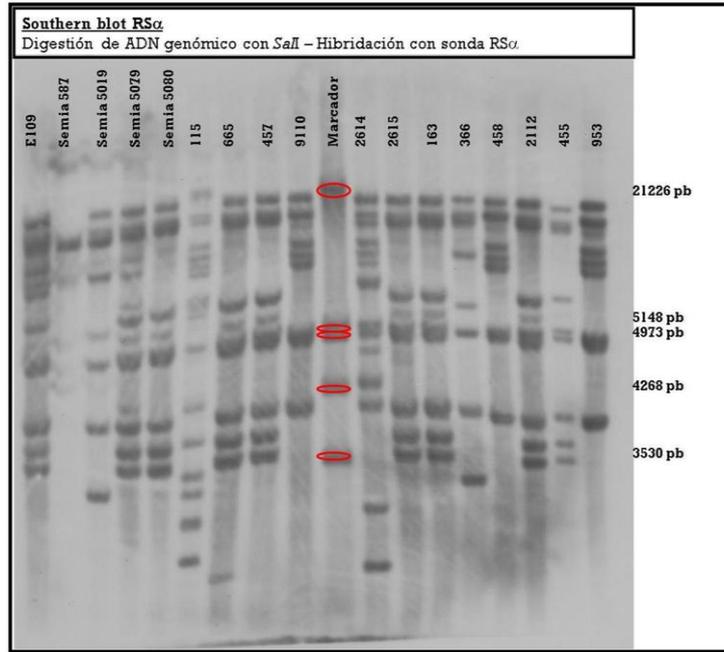


**Figura 3-13:** RFLP del amplicón del gen *nifH* con la enzima *NaeI*

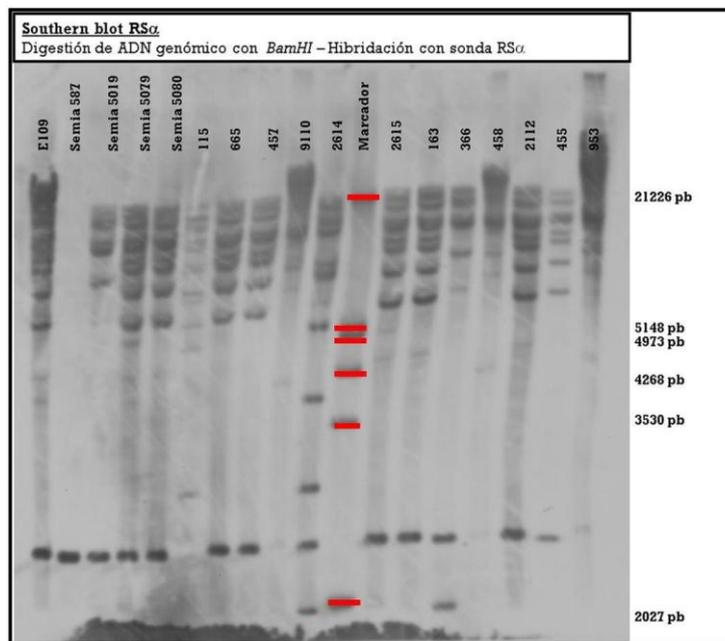
#### *RFLP con sondas marcadas de RS $\alpha$ y RS $\beta$*

Con el objetivo de analizar la diversidad de los aislados se incluyó además un análisis por RFLP con sondas de regiones repetitivas. Se analizó la distribución de regiones repetitivas RS  $\alpha$  y  $\beta$  en ADN genómico que fue digerido con *BamHI* y *SaII*.

En las figuras 3-14 y 3-15, se observan los perfiles de bandas generados por hibridación con la sonda marcada RS $\alpha$  sobre las digestiones de ADN genómico con la enzima *SaII* y *BamHI*, respectivamente.

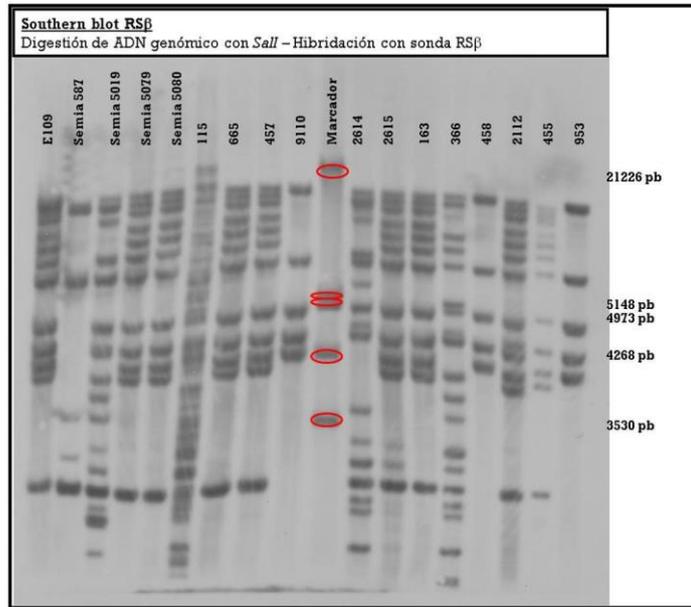


**Figura 3-14:** Southern blot de las digestiones de ADN genómico con *SaII*, hibridación con la sonda *RSα* marcada con digoxigenina.

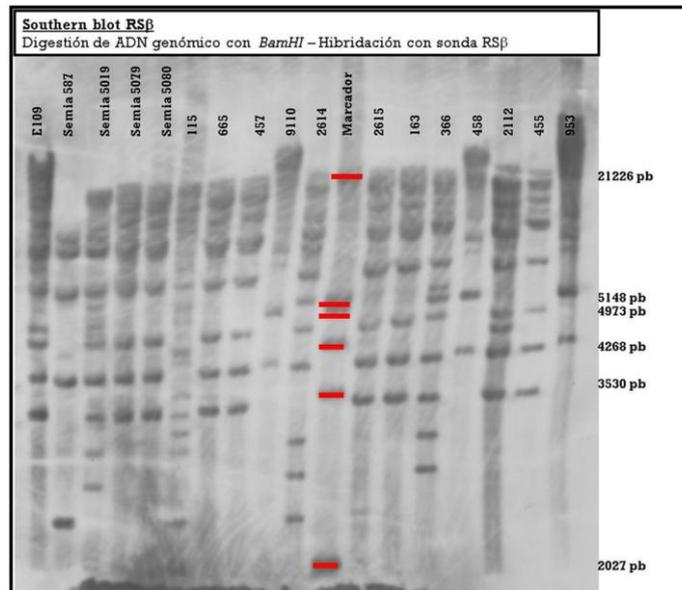


**Figura 3-15:** Southern blot de las digestiones de ADN genómico con *BamHI*, hibridación con la sonda *RSα* marcada con digoxigenina.

En las figuras 3-16 y 3-17, se observan los perfiles de bandas generados por hibridación con la sonda marcada RS $\beta$  sobre las digestiones de ADN genómico con la enzima *SalI* y *BamHI*, respectivamente.



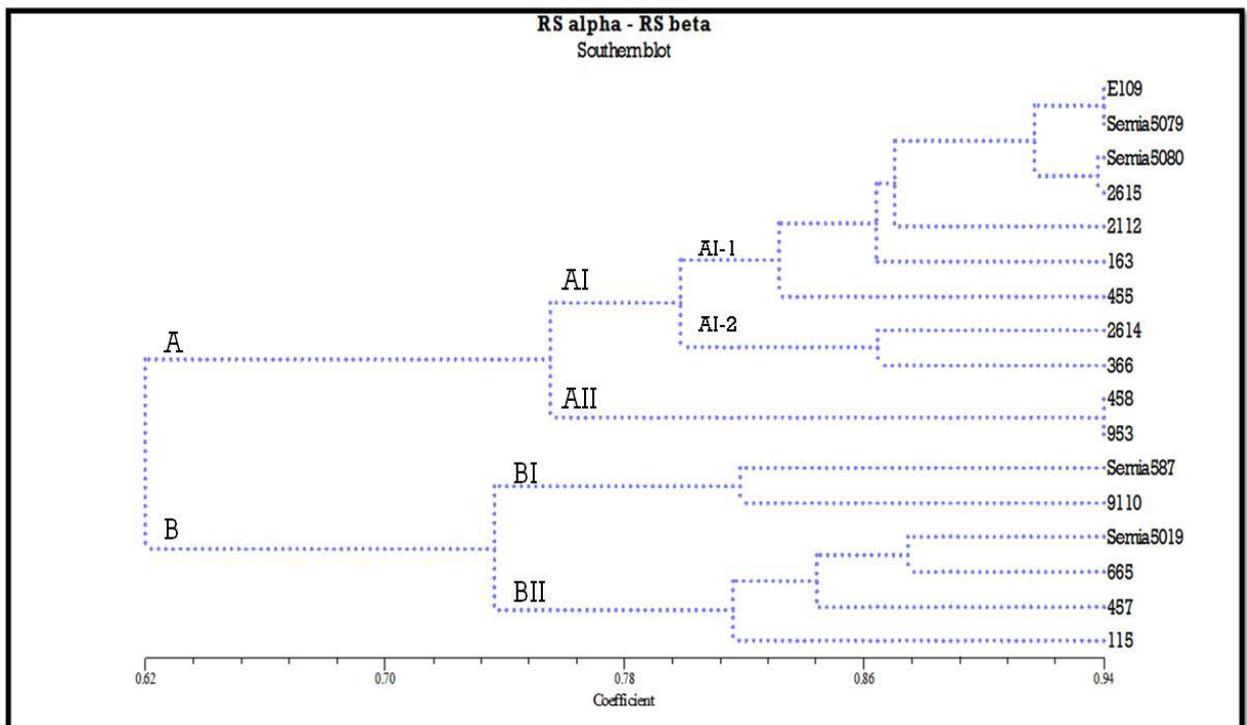
**Figura 3-16:** Southern blot de las digestiones de ADN genómico con *SalI*, y posterior hibridación con la sonda RS $\beta$  marcada con digoxigenina.



**Figura 3-17:** Southern blot de las digestiones de ADN genómico con *BamHI*, y posterior hibridación con la sonda RS $\beta$  marcada con digoxigenina.

Los patrones de bandas se analizaron con el software NTSys. Cada banda fue tratada por separado como un putativo locus, y se anotó como presente (1) o ausente (0). Las estimaciones de similitud se basaron en coeficiente de DICE (Dice, 1945). El análisis de conglomerados se basó en el método de agrupamiento no ponderado utilizando medias aritméticas (UPGMA) de software NTSYS-pc (Rohlf, 1992). El dendrograma fue creado con la opción TREE de NTSYS y la bondad de ajuste de la agrupación de los datos se calculó utilizando la COPH y procedimientos MXCOMP (Rohlf, 1992). En el dendrograma (Figura 3-18) se observan con un 62 % de similitud, dos cluster (A y B). En uno de ellos, cluster B, se agruparon las cepas controles de *B. elkanii* y en el cluster A las cepas control de *B. japonicum*. En el cluster A se distinguen dos subgrupos, AI que incluyó a los aislados 2615, 2112, 163, 455, 2614, y 366 junto a las cepa control de *B. japonicum* (E109, SEMIA 5079 y SEMIA 5080); con una similitud del 75 % con el subcluster AII que agrupo a 458 y 953.

El cluster B se subdividió con más de un 70 % de similitud en dos subcluster que incluyó por un lado a SEMIA 587 y 9110 en BI, y a los aislados 115, 665 y 457 con SEMIA 5019 en el subcluster BII.



**Figura 3-18:** Dendrograma generado con la combinación de los perfiles obtenidos con las sondas marcadas  $RS\alpha$  y  $RS\beta$ . NTSYS software, coeficiente DICE, UPGMA.

*ITS*

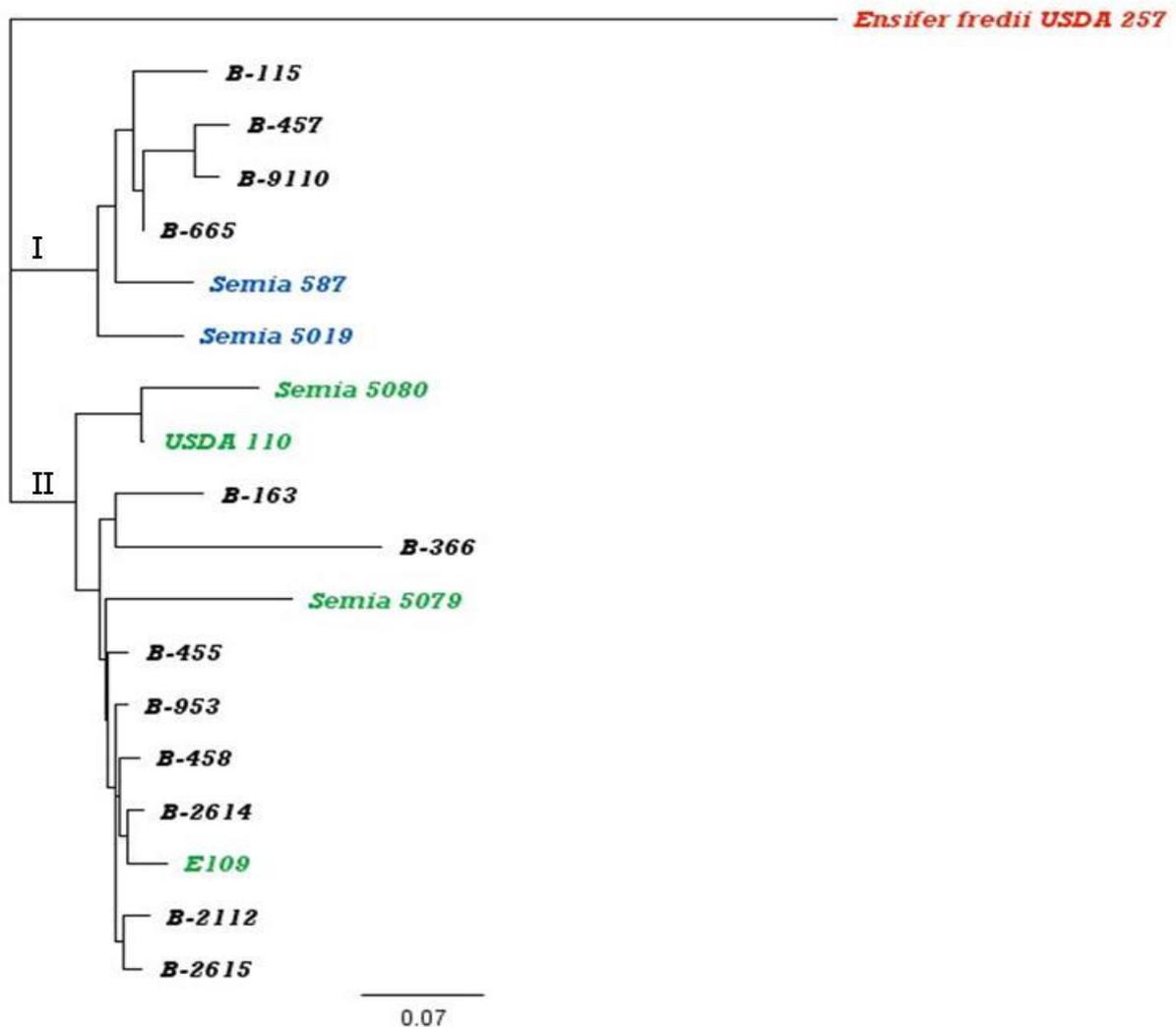
Entre las moléculas universales que se han utilizado y se utilizan para establecer la identidad de las bacterias se destacan la secuencia completa de la unidad pequeña de los genes ribosomales *16S rDNA*. Sin embargo, el grado de conservación de la misma es tal que no parece ser una herramienta ideal para la de identificación. En virtud de esto se ha recomendado utilizar la secuencia del espaciador interno no transcrito (ITS) (Willems et al., 2003; Vinuesa et al., 2005). Por ello, con un par de primers homólogos al extremo 5' y 3' del ITS se procedió a amplificar la secuencia. Las secuencias de los aislados (GenBank accession numbers: GI390136076 a GI390136091) se analizaron con la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search tools) de la base de datos National Center for Biotechnology Information (NCBI). Este análisis mostró que la secuencia del ITS de los aislados B115, B457, B9110 y B665 así como las cepas SEMIA587 y SEMIA5019 son homólogas a la secuencia de *B. elkanii* (cepa tipo), ya que el alineamiento del 100 % de la secuencia tuvo un porcentaje de homología que varió entre el 89 y 93 %.

El mismo análisis mostró que las secuencias de las cepas E109, SEMIA5080, SEMIA5079 y los aislados B163, B366, B455, B953, B458, B2614, B2112 y B2615 son homólogas a la secuencia de la cepa tipo de *B. japonicum*. Más aún, el alineamiento de las secuencias mostró un porcentaje de identidad entre el 94 y 98 % con E109, considerando una cobertura entre el 96 y 100 %. Solo el aislado 366 que tuvo una cobertura de la secuencia del 96 %, presentó un bajo nivel de homología que fue del 88 %.

Luego de este análisis preliminar se trabajó con los archivos fasta de las secuencias, las que se procesaron con el software MEGA6. Las secuencias de todos los aislados homólogos a *B. elkanii* y a *B. japonicum* se cargaron, incluyéndose además la secuencia de USDA110 (Kaneko et al., 2002) y la secuencia del ITS de USDA257 *Ensifer fredii* como outgroup. Con las mismas se hizo una alineación múltiple con el Clustal W, luego de lo cual se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico Neighbor-joining. En la figura 3-19 se presenta el dendrograma y se puede observar que los aislados de bradyrizobios y las cepas control nuevamente se agruparon en dos grandes grupos. El cluster I agrupa a las cepas de *B. elkanii* SEMIA587 y SEMIA5019 y a los aislados B115, B457, B9110 y B665, confirmando tal cual lo sugerían el resto de los marcadores moleculares que estos aislados de suelo son *B. elkanii*. Más aún, el dendrograma sugiere

que SEMIA587 tiene como ancestro a SEMIA5019 y que los cuatro aislados están más próximos evolutivamente a la cepa SEMIA587.

El cluster II incluye a las cepas SEMIA5080, SEMIA5079, E109 y a USDA110. Este cluster también contiene a los demás aislados de suelo. Sin embargo, vale la pena destacar que USDA110 y SEMIA5080 forman un cluster separado del resto de las cepas. El resto de las cepas se agruparon en un cluster que incluye a las cepas SEMIA5079 y E109. Dos aislados el B163 y el B366 tendrían un origen común y más distantes del resto. Por otro lado, los aislados B455, B953, B458, B2614, B2112, B2615 y la cepa E109 aparecen agrupadas y mostrando cierta distancia de la cepa SEMIA5079.



**Figura 3-19:** Árbol filogenético generado con el software Geneious 8.0.2 utilizando el modelo Neighbor-joining, modelo de distancia genética Tamura-Nei, considerando como grupo externo la secuencia ITS de la cepa USDA 257 (*Ensifer fredii*).

## **Discusión**

Antes de la expansión del cultivo de la soja en el mundo y en la Argentina entre los años 1960 y 1980, se asumió que los suelos de los países que introdujeron el cultivo como Canadá, Brasil y Argentina carecían de los rizobios simbiotes de la soja, es decir *Bradyrhizobium japonicum* (Boddey & Hungría, 1997; Hungría et al., 1998; Brutti et al., 1998; Prevost & Bromfield, 2003; Grange et al., 2004; Pastorino et al., 2011). En la actualidad los suelos de estos tres países contienen rizobios simbiotes de la soja naturalizados. Es así, que se ha descripto que las poblaciones naturalizadas presentan considerables niveles de diversidad. Esta diversidad sería el resultado de cambios que ocurren en las bacterias en su proceso de adaptación a las condiciones del suelo de los ambientes en donde fueron introducidos (Hungría et al., 1996; Boddley y Hungría, 1997; Hungría et al., 1998; López et al., 2013). Adicionalmente, la introducción de cepas de Bradyrizobios por medio de los inoculantes comerciales aumenta la posibilidad de ocurrencia de transferencias genética entre los organismos autóctonos y los naturalizados, hecho que se ha demostrado ocurre con cierta frecuencia en los suelos (Sullivan et al., 1995; Ferreira & Hungría, 2002; Barcellos et al., 2007). Por otro lado, las poblaciones naturalizadas de rizobios también pueden sufrir introgresiones de cepas que llegan en la semilla de soja contaminada con rizobios (Hagen & Hamrick, 1996; Pérez Ramírez et al., 1998). En cualquier caso los resultados de los análisis de la composición de las poblaciones de rizobios de los suelos han dado resultados contrastantes, es decir mientras que algunos sitios presentan una diversidad considerable, otros presentan poblaciones homogéneas (Obaton et al, 2002; Batista et al., 2007; Parker & Kennedy, 2006; Yokoyama et al., 2006; Pastorino et al., 2011).

En diversos estudios, algunos realizados en suelos de la China que contienen poblaciones autóctonas de bacterias Gram (-) que nodulan la soja (Yang et al., 2006), y otros que se realizaron en lugares en donde los rizobios que nodulan soja fueron introducidos, se ha encontrado que las poblaciones de rizobios presentan niveles de variabilidad relevantes (Rodríguez Quiñones, 1992; Minamisawa, 1992; Chen et al 2000; Parker & Kennedy, 2006; Pastorino et al., 2011; Bizarro et al., 2011). Al mismo tiempo, Obaton et al (2002) demostraron que las cepas introducidas en los suelos son estables varios años después de su introducción y ellos no detectaron intercambios entre las cepas incorporadas a los mismos. Estos resultados fueron diametralmente opuestos a lo encontrado por Parker y Kennedy (2006) que demostraron la existencia de intercambios genéticos entre representantes de *B. japonicum* y *B. elkanii*. Es decir que en los suelos el

intercambio de material genético se produce, si bien la frecuencia con que ocurre esto por el momento no parece tener un patrón de comportamiento.

En la Argentina, cuando se comenzó a expandir el cultivo de la soja, los cultivos se biofertilizaron con inoculantes comerciales formulados unos con un aislado de *B. elkanii* y otros con un aislado de *B. japonicum*. Así en los suelos cultivados se naturalizaron representantes de estas dos especies (González et al., 1994; Pastorino et al., 2011). La presencia de bacterias pertenecientes a dos especies y el tiempo transcurrido desde la naturalización de las mismas probablemente sean responsables al menos en parte del nivel de diversidad encontrado, y que se verificó en los estudios de diversidad realizados con el grupo de aislados seleccionados para esta tesis.

Es clave conocer la diversidad de las poblaciones de los suelos con historia del cultivo de la soja ya que la introducción exitosa de nuevas cepas con los inoculantes comerciales es factible cuando se conocen los potenciales competidores (Botha et al., 2004). Pero además, la diversidad de los suelos es una fuente de selección de cepas que debido a mutaciones naturales o recombinaciones pueden adquirir una capacidad simbiótica superior a la de las cepas que les dieron origen, con la ventaja de que las mismas se encuentran adaptadas a los ambientes de cultivo de la soja. Por ello un análisis sistemático de las cepas naturalizadas con marcadores moleculares que muestren la diversidad de los mismos, si bien no es novedoso, es clave para identificar nuevas bacterias para promover el crecimiento de las plantas. De hecho los aislados estudiados mostraron características de adaptación diferenciales a las cepas parenterales que probablemente hayan adquirido durante el proceso de naturalización, conservando la capacidad de fijación de nitrógeno. Por esta razón se considera que podrían ser una fuente para seleccionar nuevas cepas.

El objetivo inicial del screening fue identificar la diversidad a nivel genético entre las cepas que fueron seleccionadas por sus características fenotípicas y sus capacidades superiores de fijación de nitrógeno, y considerando que el número de cepas fue bajo se utilizaron diversas herramientas moleculares para el análisis.

Los primeros análisis se realizaron con los primers REP y BOX. Los genomas de las bacterias de la misma manera que los genomas de otros organismos contienen secuencias repetitivas cuyas funciones no se han dilucidado completamente. En las bacterias se han descrito regiones extragénicas palíndromos (REP) (Versalovic et al., 1991; De Bruijn, 1992), y regiones BOX (Martin et al., 1992). En relación a las REP el

alineamiento de genomas de diversas bacterias permitió identificar la secuencia de 38 pb conteniendo 6 posiciones degeneradas que incluye además un loop de 5 pb entre ambos lados del palíndromo conservado. Las secuencias BOX si bien se describieron inicialmente en bacterias Gram (+) también se las encuentra en las Gram (-). Estas secuencias están constituidas por tres subunidades box A (59 pb), box B (45 pb) y box C (50 pb) y por lo tanto tiene aproximadamente 154 pb. Estas secuencias repetitivas guardan algunas similitudes con las REP en cuanto a que se ha propuesto estarían involucradas en la expresión de genes.

El análisis de la diversidad de las cepas comerciales de *Bradyrhizobium* y de los 12 aislados en estudio con los primers REP y BOX, mostró en primer lugar que mientras que algunos aislados (2614, 2615, 163, 366, 458, 2112, 458 y 953) a nivel genético son semejantes a *B. japonicum*, otros son genéticamente similares a *B. elkanii*, independientemente del marcador molecular utilizado. Este resultado es esperable considerando las cepas introducidas a través de los inoculantes comerciales de soja. Las 17 cepas se agruparon en 13 perfiles generados por las secuencias BOX que separaron además a los representantes de cada especie con un nivel de similitud del 40 %. Los marcadores REP generaron 16 haplotipos distintos a un nivel de similitud del 23 % entre representantes de cada especie. Se ha reportado que estos dos marcadores si bien están relacionados con la plasticidad del genoma (Koeuth et al., 1995; Delihias, 2011), también han sido asociados a cambios regulatorios de la expresión de genes (Koeuth et al., 1995; Versalovic et al. 1991). Esto sugiere que los aislados estudiados podrían diferenciarse a través de un análisis de expresión diferencial de genes simbióticos.

*Bradyrhizobium* es un género que se caracteriza porque contienen en su genoma secuencias repetitivas como  $RS\alpha$ ,  $RS\beta$ ,  $RS\delta$ ,  $RS\epsilon$ , entre otras (Hahn et al., 1984; Hahn & Hennecke, 1987; Kaluza et al., 1985; Kaneko et al., 2002). Entre estas, las secuencias  $RS\alpha$  se encuentran en distinto número de copias en el genoma, se las han encontrado próximas a la región *nifD* y con frecuencia en alto número en la isla simbiótica, y han sido asociadas a la duplicación de fragmentos del genoma de *Bradyrhizobium* (Kaluza et al., 1985; Parker et al., 2002). El análisis de la diversidad del genoma de los aislados con  $RS\alpha$ -PCR, generó resultados similares a los obtenidos con los marcadores REP y BOX, mostrando 15 haplotipos que se separaron en dos grupos con un nivel de similitud del 30 % entre los representantes de las especies *B. japonicum* y *B. elkanii*. Más aún, el análisis del genoma de los aislados con sondas marcadas de las secuencias repetitivas  $RS\alpha$  y  $RS\beta$ , mostraron los mismos resultados y discriminaron 14 haplotipos. El conjunto de estas

secuencias fueron útiles para separar a los aislados de *Bradyrhizobium* en al menos dos grupos, uno de cepas de *B. elkanii* y el otro de *B. japonicum* (López & Balatti, 2012). La combinación de los marcadores mostró que cada aislado presentó un haplotipo que lo caracteriza.

Si bien se ha utilizado el *16S rADN* como herramienta para la identificación de organismos, su alto grado de conservación no permite que se evidencien variaciones entre aislados. Con el fin de evaluar la similitud de los aislados y confirmar la identidad de los mismos se analizaron las secuencias del ITS de los mismos. Los resultados confirmaron que 8 aislados pertenecen a *B. japonicum* y que otros 4 son *B. elkanii*, lo que reafirma lo observado con los agrupamientos generados con los marcadores moleculares REP, BOX, RS $\alpha$  y RS $\beta$  e incluso el agrupamiento preliminar obtenido en función de las características fenotípicas. Además, se encontró que la cepa comercial SEMIA 5080 tiene un ITS altamente homólogo a USDA110, que fuera recientemente reclasificada como *B. diazoefficiens*, y ambas cepas forman un cluster separado del resto de los *B. japonicum*.

También se analizó por RFLP a los amplicones que contienen las secuencias de los genes de fijación de nitrógeno *nifD*, *nifK* y *nifH*. Estos genes se encuentran en la isla simbiótica (Kaneko et al., 2002) y próximos a secuencias RS $\alpha$ , con lo cual es posible estén sujetos a cambios o recombinaciones (Kaluza et al., 1985; Hahn & Hennecke, 1987). Los resultados confirman las diferencias que ya han sido reportadas en cuanto a las diferentes secuencias de *nifD* en *B. japonicum* y *B. elkanii* (Parker et al, 2002). Por otro lado, que los genes *nifK* y *nifH* son similares en las dos especies. Por lo tanto este análisis de restricción aporta nuevas evidencias a los resultados obtenidos con la secuencia del ITS, que confirman la presencia de *B. japonicum* y *B. elkanii* en los suelos y al mismo tiempo demuestran que al menos en lo que hace a estos genes, si bien es una restricción, no se observaron diferencias entre los aislados.

En conclusión el análisis de diversas regiones del genoma de los bradyrizobios de suelo y la secuencia del ITS de estos, demuestra que mientras ocho aislados pertenecen a *B. japonicum*, otros cuatro son de *B. elkanii*. Es decir que estos aislados seguramente descienden de las dos especies de rizobios introducidas a los suelos por medio de los inoculantes comerciales.

La diversidad genética estaría relacionada con la diversidad observada a nivel de los fenotipos que fueron descritos en el capítulo anterior. Considerando el rol que tienen las secuencias repetitivas en la plasticidad del genoma y que gran parte de los mismos se encuentran en la región simbiótica, es probable que las capacidades diferenciales de los organismos para fijar nitrógeno sean el reflejo de rearrreglos entre regiones repetitivas, si bien es claro que esto no ocurrió con los genes *nifD*, *nifK* y *nifH*. Sin embargo, no se pueden descartar la ocurrencia de mutaciones naturales en otros genes estructurales y/o regulatorios provocadas por la presión de selección de los ambientes que son los que desencadenan procesos adaptativos. Entre las herramientas que se han desarrollado sobre la base de los conocimientos generados por los estudios moleculares de los genomas, en este trabajo se utilizó un conjunto de herramientas complementarias que permitieron establecer la identidad de los aislados y además establecer la variabilidad. Los análisis de RFLP de los genes *nifH*, *nifD* y *nifK* y las secuencias ribosomales transcriptas no codificantes (ITS) condujeron a la identificación de los aislados.

Trabajos realizados en otros países de la región demuestran que las poblaciones autóctonas aisladas de suelos con historial de cultivo de soja poseen un alto polimorfismo en comparación con las cepas de los inoculantes (Hungria et al., 2006, Loureiro et al., 2006, Batista et al., 2007). En el caso de los suelos argentinos se puede concluir, en base al análisis de diversidad de los aislados de este trabajo, que estos también contienen poblaciones autóctonas diversas. Aquellas derivadas del genotipo de E109 parecerían predominar sobre los representantes de *B. elkanii*, debido a que los inoculantes se han formulado fundamentalmente con *B. japonicum*. De hecho en el conjunto de aislados de suelo analizado se cumple que el genotipo predominante fue el de las cepas de *B. japonicum*, ya que 8 de los 12 aislados fueron agrupados por los diversos marcadores utilizados, en el cluster correspondiente a las cepas E109, SEMIA 5079 y SEMIA 5080.

En el capítulo 2 los estudios en lo que hace a la producción de EPS, la formación de Biofilm, la autoagregación, la supervivencia y la capacidad de fijar nitrógeno demostró que los aislados, 665, 9110, 163, 366, 2112 y 953 son los que aparecen con un mayor potencial. Los análisis moleculares con secuencias repetitivas, ITS y genes de fijación de nitrógeno demostraron que los aislados **163, 366, 2112 y 953** son *B. japonicum* y por ello se seleccionaron para proseguir los estudios a nivel de la isla simbiótica

***Capítulo 4: Análisis estructural de la  
isla simbiótica.***

## **Introducción**

El desarrollo de nuevas técnicas de biología molecular, la automatización de ciertos procesos y el impacto que esta ha tenido sobre la aceleración con que se genera información, permite entre otras cosas realizar análisis poblacionales con genomas completos. Esto ha provocado cambios en las estrategias para estudiar la genética de los organismos vivos, entre ellos las bacterias (Kaneko et al., 2002; Kaneko et al., 2011; Chan et al., 2012). El conocimiento de la secuencia de los genomas y el análisis funcional que se genera sobre la base del genoma, han demostrado ser herramientas claves para establecer diferencias estructurales y funcionales entre los organismos. Hasta el momento se conoce el genoma de más de 6000 bacterias, estando en proceso la secuenciación del genoma de varios cientos de otras especies. Entre los genomas que se han secuenciado más de 600 corresponden a las  $\alpha$ -Proteobacterias, de los cuales 81 son del género *Bradyrhizobium* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Las secuencias de los genomas es información clave para el análisis de expresión de los genes. Estos conocimientos constituyen una herramienta importante para analizar la evolución de los genomas a través de lo que se conoce como genética comparativa (Kaneko et al., 2002), que permite contrastar la organización de los genomas en diversas especies. Entre los rizobios *Bradyrhizobium japonicum* es, por lo menos en la actualidad, es una de las especies bacterianas más importantes para la agricultura, ya que nodula la soja (*Glycine max*), cultivo que ocupa grandes extensiones en el mundo. *B. japonicum* cepa USDA110, se aisló originalmente de nódulos de soja en Florida, EE.UU. en 1957 (Keyser – Griffin, 1987) y ha sido ampliamente utilizada en estudios de genética molecular, fisiología y ecología, debido a su capacidad de adaptación a los ambientes y también a su capacidad de fijar nitrógeno. El genoma de la cepa USDA110 de *Bradyrhizobium japonicum*, está constituido por un cromosoma circular de 9.105.828 pb que se caracteriza por tener un porcentaje de GC de 64,1 % (Kaneko et al., 2002). La secuencia del genoma de *B. japonicum* USDA110 ha sido comparada con la de *Mesorhizobium loti* y *Sinorhizobium meliloti*, encontrándose que *B. japonicum* contiene 6376 genes (77 %) que mostraron una significativa similitud con las secuencias de los genes tanto de *M. loti* como de *S. meliloti*. Solo el 23 % de los genes de *B. japonicum* no se encontraron en los otros rizobios analizados (Kaneko et al., 2000; Galibert et al., 2001; Kaneko et al., 2002).

*Islas genómicas e isla simbiótica*

Una isla genómica (IG) es una región que forma grupos de genes accesorios que codifican diversas funciones y características. La adquisición de tales elementos genéticos, confiere a la bacteria ventajas adaptativas en relación a otras bacterias con las que debe competir para colonizar y habitar el mismo nicho ecológico. La mayoría de las IGs contienen elementos integradores que suelen insertarse en el genoma a donde llegan por transferencia horizontal (Kaneko et al., 2002; Kaneko et al., 2011). Estas inserciones en los genomas bacterianos, a menudo suceden en varios genes de ARNt. Así resulta que el gen ARNt queda flanqueando la secuencia insertada en ambos extremos.

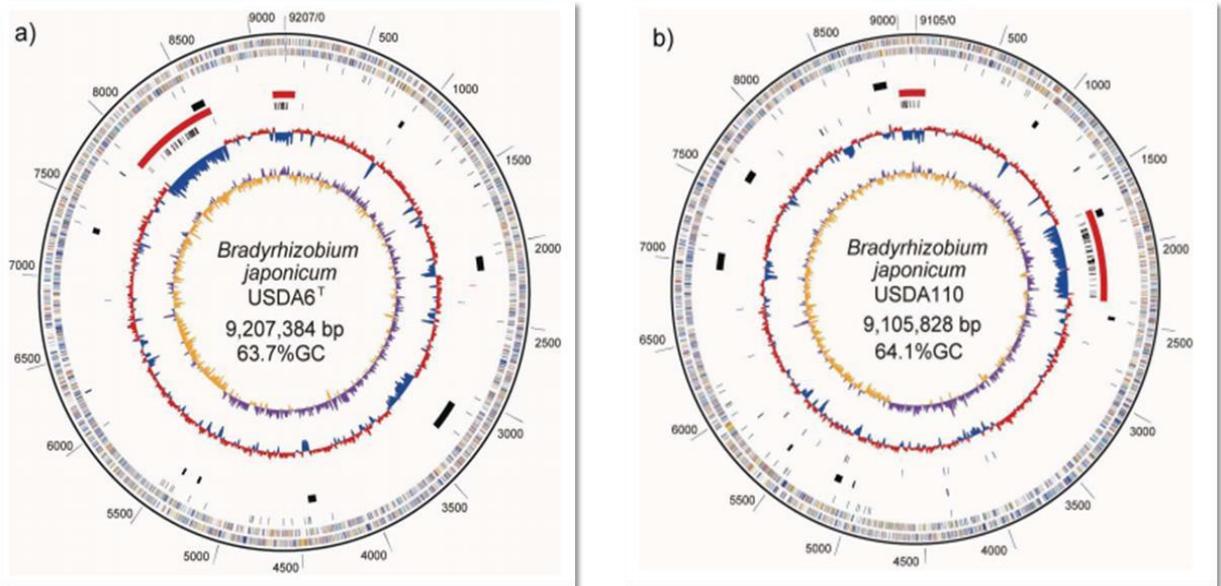
Un ejemplo de isla genética lo constituye la isla simbiótica ancestral que contienen los rizobios fijadores de nitrógeno, de un tamaño aproximado de 860 Kb. Este se ha dividido en tres regiones por reordenamientos del genoma (Kaneko et al., 2011). Kaneko y colaboradores describieron la isla simbiótica de *B. japonicum*, ésta tiene un tamaño de 680 Kb que en contraposición con el resto del genoma, tiene un bajo contenido de GC (59,4 %). La isla incluye una secuencia que codifica genes involucrados en la relación simbiótica de 410 Kb reportada anteriormente por Göttfert et al. (2001). En un extremo de esta región de 680 Kb se encontró un ARNt, y a 3,528 pb de distancia de esta isla simbiótica de 680 Kb, un segmento de 45 pb de la porción 3'-terminal del mismo ARNt flanqueando un segundo segmento de 6 Kb, también con contenidos bajos de GC. Estas regiones además de contener un bajo % de GC, concentran el 60 % de los elementos de inserción (ISs). Otra región que vale destacar tiene 201 Kb, muestra características similares a las descritas y se ubica en las coordenadas 8975 Kb. Esta secuencia, por su similitud con la isla simbiótica, se propuso que sería el tercer segmento que se origino a partir de un ADN ancestral común, que probablemente se ha transferido lateralmente (Kaneko et al., 2002).

En la región de 680 Kb se describieron 655 genes putativos de proteínas. Además se encontró en este fragmento de ADN gran parte de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno. El 46 % de los genes putativos en esta región (301 genes), tienen una alta homología con las secuencias de genes de nodulación y fijación de nitrógeno que ya fueron descritos cuyas funciones además son conocidas. Esto incluye dos clusters de genes que se ubican en las coordenadas 1907825-1935084 [*nifDKENX-nifS-nifB-nifH-fixBCX*] y 2175594-2199393 [*nolZY-nolA-nodD2-nodDIYABCSUIJ-nolMNO-nodZ-fixR-nifA-fixA*] (Kaneko et al., 2002).

Por otro lado, en el genoma de USDA110 también se describe la presencia y distribución de las secuencias de inserción en el genoma. Un total de 104 copias de ISs fueron clasificadas en 20 grupos ( $RS\alpha$ ,  $RS\beta$ , FK1, IS1632, ISB20, ISB27, IS Bj 2 a 15), cada uno de los cuales comprende entre 1 y 15 miembros, que se clasifican en base al tipo y número de transposasas. Dentro de estos 20 grupos de secuencias de inserción, se encontraron 7 grupos mayoritarios que incluyen a las secuencias repetitivas  $RS\alpha$  (1-15) y  $RS\beta$  (1-12). Es de destacar que el 60 % de las secuencias de inserción se han descrito están localizadas en la isla simbiótica (Kaneko et al., 2002). Hahn y Hennecke (1987) describieron la organización transcripcional de los genes de fijación de nitrógeno que fue además confirmada cuando se dispuso de la secuencia completa del genoma (Kaneko et al., 2002). Estos se agrupan en dos clusters, en el cluster I se encuentra los genes que codifican proteínas estructurales de la nitrogenasa (genes *nifDK* y *nifH*) y varios genes *nif* y *fix*, acumulándose en este fragmento las secuencias repetitivas (Hahn & Hennecke, 1987). La presencia de estas secuencias indicaría que en esta región del genoma se podrían dar rearrreglos con mayor frecuencia. Esto incluye, cambios genéticos, deleciones espontáneas o, como ha sido demostrado a partir del trabajo de Hahn y Hennecke (1987) un crossover recombinacional entre dos copias de  $RS\alpha$ , resultando en la deleción de una larga región de ADN genómico (Hahn & Hennecke, 1987; Kuykendall et al., 1997).

En la Argentina la producción de inoculantes ha utilizado sólo algunas cepas de *Bradyrhizobium japonicum* que han sido seleccionadas hace mucho tiempo. Sobre la base de las diferencias geográficas y climáticas de sus hábitats, el género *Bradyrhizobium* ha mantenido un alto grado de diversidad genética (Kuykendall, 2005). Considerando los diversos estudios de identificación y clasificación de *Bradyrhizobium japonicum*, la cepa USDA6<sup>T</sup> también se ha utilizado como cepa tipo de esta especie bacteriana. USDA 6<sup>T</sup> fue aislada originalmente de nódulos de un cultivo de soja en Japón, y fue ingresada en la colección de cultivos en 1929 y desde entonces ha sido utilizada en diversos trabajos de investigación (USDA ARS National Rhizobium Germplasm Resource Center). USDA6<sup>T</sup> forma nódulos que fijan nitrógeno efectivamente en soja (Kaneko et al., 2011). Sin embargo, siendo que la secuencia de nucleótidos del genoma de la cepa USDA110 se determinó antes en 2002, este ha sido el genoma que se ha utilizado como modelo con el fin de investigar las actividades y capacidades de los simbioses de la soja. Años más tarde, el análisis de hibridación genómica comparativa de USDA6<sup>T</sup> con USDA110, demostró que existen variaciones genómicas entre estas dos cepas (Itakura et al., 2009).

Es así que a partir de 2011 se dispone también del genoma completo de esta cepa, lo que permitió profundizar los estudios comparativos.



Representación esquemática de los cromosomas circulares de *B. japonicum* (a) USDA6<sup>T</sup> y (b) USDA110. La escala exterior al mapa indica la localización genómica (en Kb). Las barras en el segundo círculo hacia el interior del esquema muestra la posición de los putativos genes codificantes de proteínas en ambas direcciones. Los putativos genes están representados 18 colores. El tercer círculo hacia adentro indica las posiciones de los genes estructurales de ARN. En el cuarto círculo, las barras negras indican áreas de putativas islas genómicas insertadas en genes de tARN. Tres barras rojas dentro del quinto círculo representan regiones correspondientes a la posible isla simbiótica. El sexto círculo muestra la distribución de las secuencias de inserción (Iss), como barras negras. Los círculos más internos muestran los valores GC sesgo (amarillo y morado) y el porcentaje promedio de GC (azul y rojo), respectivamente. Fuente: Kaneko et al., 2011

La secuencia de nucleótidos completa del genoma de USDA6<sup>T</sup> indica que el cromosoma circular contiene 9.207.384 pb de las cuales un 63,67 % son GC. El tamaño del genoma es similar al de USDA110 (9105828 pb). La comparación de la secuencia del genoma completo de USDA6<sup>T</sup> y USDA110, mostró que hay un alto nivel de conservación de las secuencias en tres regiones de cada genoma. En el caso de USDA110, la isla incluye una secuencia de 680 Kb (isla simbiótica A), y otra región adyacente con bajo contenido de % GC (59,2 %) conocida como isla simbiótica putativa B (Kaneko et al., 2002). Una situación bastante similar a USDA110 fue encontrada en el genoma USDA6<sup>T</sup>. En el genoma de USDA6<sup>T</sup>, se describe la presencia de una región de ADN de 695 Kb con bajo contenido de GC (59 %), con notables características compartidas con la de USDA110. Esta región incluye la mayor parte de los genes *nif* y un 45 % de las secuencias de inserción descriptas en su genoma se concentran en esta región simbiótica. En el

genoma de USDA6<sup>T</sup> se describen otras dos regiones con estas características (IS y bajo %GC), lo que sugiere que una antigua isla simbiótica más grande pudo haberse dividido en tres más pequeñas (isla A de 695-kb en las coordenadas 7,920-8,614 Kb; isla B de 4-kb en las coordenadas 2,248- 2252 Kb, y la región de 164 Kb isla C en las coordenadas 9,114-0-70 Kb) (Kaneko et al., 2011).

Con el avance de las nuevas tecnologías de secuenciación, hoy se conocen los genomas de otros aislados. Entre ellos se incluye el de la cepa E109 una de las rizobacterias más utilizadas en Argentina desde 1970 (Torres et al., 2015), que es una cepa derivada de USDA138 y que corresponde al serogrupo *Bradyrhizobium japonicum* USDA6. Después de la evaluación, selección y reisolamiento de nódulos de soja, la cepa fue rebautizada E109. Este genoma se compone de 8.233 secuencias codificantes de proteínas. De manera similar a otras especies del género *Bradyrhizobium*, *B. japonicum* E109 contiene dos operones ribosómicos idénticos y completos. Se identificaron un total de 54 genes de ARNt que representan 45 especies de ARNt. Considerando como base la comparación con la secuencia del genoma de USDA6<sup>T</sup>, se detectó la presencia de un fragmento de ADN de 645 Kb con bajo contenido de GC (59,0 %), que se reveló como una reminiscencia de una isla simbiótica, que incluye como es de esperar la mayor parte de los genes *nod*, *nif*, y *fix*.

La isla simbiótica es la región del genoma que agrupa a los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, contiene un bajo % de GC, y concentra la mayoría de las secuencias de inserción, lo que indicaría que en esta región se podrían dar rearrreglos con mayor frecuencia. Estos rearrreglos podrían implicar cambios fenotípicos que alteren la capacidad de fijación de las cepas. Por otro lado, los estudios previos con marcadores moleculares BOX, REP y RS $\alpha/\beta$  (capítulo 3) pusieron en evidencia la diversidad genética entre los aislados y las cepas parenterales. A su vez, en el capítulo 2 se describió la caracterización fenotípica de estos aislados, entre los que se seleccionaron cuatro, 163, 953, 2112 y 366, que se diferenciaron en base a su capacidad de autoagregación y formación de biofilm, características que fueron afectadas por la presencia de exudados radiculares. Estos cuatro aislados que mostraron una capacidad de fijación de N<sub>2</sub> igual o superior a la cepa E109, presentaron diferencias en la capacidad de sobrevivencia sobre la superficie de la semilla y la velocidad con que infectan a la raíz. Por eso se procedió a analizar los fragmentos de ADN que codifican los genes que regulan o determinan la capacidad para fijar N<sub>2</sub>, agrupados en la simbiótica.

### **Hipótesis del capítulo**

*Los fenotipos encontrados se corresponden con diferencias genotípicas.*

*En los rizobios que nodulan la soja se producen mutaciones en las secuencias de los genes de nodulación y fijación de nitrógeno, donde son abundantes las regiones repetitivas, que podrían explicar los cambios en la capacidad de fijación de nitrógeno.*

### **Objetivo del capítulo**

*Establecer en base a un análisis de restricción la existencia de cambios a nivel genético de las secuencias que codifican genes de nodulación y fijación de nitrógeno.*

## Materiales y métodos

### 1. Cultivo de cepas

Los cultivos de las cepas **E109**, **163**, **366**, **2112** y **953** se realizaron como se describió en los materiales y métodos del capítulo 2, apartado 3.

### 2. Aislamiento de ADN

El ADN que se utilizó como molde en las reacciones descriptas a continuación, se obtuvo tal cual se describió en la sección materiales y métodos del capítulo 3, apartado 2.

### 3. Oligonucleótidos

Con el fin de proceder a amplificar grandes fragmentos de ADN correspondientes a la isla simbiótica, se diseñaron primers homólogos a determinadas secuencias de la isla de USDA110. Los oligonucleótidos empleados en esta parte del trabajo fueron sintetizados por: Fagos Ruralex. En la tabla 4-I se presentan un listado de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de fragmentos del genoma y genes de nodulación y fijación de nitrógeno.

Tabla 4-I: Listado de primers utilizados en este capítulo.

Gen	Primer	Secuencia (5'-3')	pb	Referencia
<b>Fragmento1-1</b>	BjF11-1f	GAATTCACGTTGGCACCACGGGCATC	7740	Este trabajo.
	BjF11-1r	AAGCTTGACCGCGGCAGACTTTCGGCT		
<b>Fragmento1-2 (1ra)</b>	BjF12-1°f	GGCGGGTTGGTCCCGTAAA	6591	Este trabajo.
	BjF12-1°r	CGCCTTGTCCTCCGACTGGCTG		
<b>Fragmento1-2 (2da)</b>	BjF12-2°f	AAACTGCACGGCCCGAAGGG	5998	Este trabajo.
	BjF12-2°r	AAGCTTATCTTGGCCGCGAAGTGCCC		
<b>Fragmento1-3</b>	BjF13-1f	GAATTCCTCGTGGCCGCGGGGTATTC	9800	Este trabajo.
	BjF13-1r	AAGCTTGCTAACGCCCGCACCACCCCTT		
<b>Fragmento2-1</b>	BjF21-f	ATTGCACTTTCCCCACGGCGG	8900	Este trabajo.
	BjF21-r	TGGCCTATCCCGTGGCCCTC		
<b>Fragmento2-2</b>	BjF22-f	GAATTCAGTGCATGTGGGGCGTCTCG	9630	Este trabajo.
	BjF22-r	AAGCTTCGGCGAGCTGCATCGGTAG		
<b>Fragmento2-3</b>	BjF23-f	GAATTCGACACAGCCCTGCTCGACC	5996	Este trabajo.
	BjF23-r	AAGCTTAGCGCCGCTCCGCTTCAAT		
<b>nifS-fixU</b>	NifSFixU-f	AAGAGATCGGACCCAATCGC	1700	Este trabajo.
	NifSFixU-r	CAATGATCTCGGTCCCGAGG		
<b>nifE</b>	NifE-f	ACGATGGCAGGACACATAA	1777	Este trabajo.
	NifE-r	ATCGGCTGGCTCATCTTCAG		
<b>nifN-nifX</b>	NifNNifX-f	GCACGATTGAGGACGCAATC	2070	Este trabajo.
	NifNNifX-r	CCTTCCCAGGCTTCATTGGT		
<b>nopP</b>	NopP-f	CGCCGTTGAACGTACATTT	1208	Este trabajo.
	NopP-r	TGCAGCCACCTTACTCCATG		

#### 4. Análisis por RFLP

##### 4.1. Amplificación por PCR y purificación de amplicones

Se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa, genes y fragmentos genómicos de alrededor de 5-10 Kb usando primers específicos diseñados para tal fin (Tabla 4-I). Los fragmentos amplificados fueron purificados como se describe en el capítulo 3, apartado 3 (3.2. PCR).

Las condiciones específicas para cada reacción se describen en la tabla 4-II.

Tabla 4-II. Condiciones específicas de las reacciones de PCR del capítulo.

<b>PCR</b>	<b>Desnaturalización</b>	<b>Hibridación</b>	<b>Extensión</b>	<b>Ciclos</b>
<b>Frag. 1.1</b>	94 °C, 1 min	60 °C, 1 min	68 °C, 9 min	30
<b>Frag. 1.2 (1ra)</b>	94 °C, 1 min	60 °C, 45 seg	68 °C, 8 min	29
<b>Frag. 1.2 (2da)</b>	94 °C, 1 min	60 °C, 45 seg	68 °C, 8 min	29
<b>Frag. 1.3</b>	94 °C, 1 min	60 °C, 45 seg	68 °C, 10 min	30
<b>Frag. 2.1</b>	94 °C, 1 min	60 °C, 45 seg	68 °C, 9,5 min	28
<b>Frag. 2.2</b>	94 °C, 1 min	60 °C, 45 seg	68 °C, 10 min	30
<b>Frag. 2.3</b>	94 °C, 1 min	60 °C, 1 min	68 °C, 8 min	30
<b>NifN-NifX</b>	94 °C, 1 min	58 °C, 45 seg	72 °C, 135 seg	28
<b>NifE</b>	94 °C, 1 min	58 °C, 45 seg	72 °C, 2 min	28
<b>NifS-FixU</b>	94 °C, 1 min	58 °C, 45 seg	72 °C, 2 min	28
<b>NopP</b>	94 °C, 45 seg	59 °C, 45 seg	72 °C, 90 seg	28

##### 4.2. Digestión con enzimas de restricción

Con el fin de realizar un análisis de restricción, los fragmentos amplificados y purificados, se resuspendieron en 15 µl de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y una alícuota del ADN se digirió en las condiciones de temperatura y buffer óptimos recomendadas por los proveedores. Se utilizó 1U de enzima/µg ADN a digerir.

Las enzimas utilizadas en los análisis de RFLP se detallan en la tabla 4-III.

##### 4.3. Electroforesis

Los productos de las digestiones se separaron en geles de agarosa como se describió en el capítulo tres, apartado 4 (4.1. Electroforesis en geles de agarosa).

Tabla 4-III: Detalle de enzimas utilizadas en los análisis de RFLP para cada amplicón.

<b>Gen/Fragmento</b>	<b>Enzima</b>
<i>nifD</i>	<i>EcoRV</i>
<i>nifH</i>	<i>NaeI</i>
<i>nifK</i>	<i>Hinfi</i>
Fragmento 1-1	<i>EcoRI</i>
	<i>PstI</i>
Fragmento 1-2 (1ra)	<i>EcoRI</i>
	<i>PstI</i>
Fragmento 1-2 (2da)	<i>EcoRI</i>
	<i>BamHI</i>
Fragmento 1-3	<i>EcoRI</i>
	<i>BamHI</i>
Fragmento 2-1	<i>EcoRI</i>
	<i>PstI</i>
Fragmento 2-2	<i>BamHI</i>
	<i>EcoRV</i>
Fragmento 2-3	<i>XhoI</i>
	<i>EcoRI</i>
<i>nifE</i>	<i>XhoI</i>
	<i>Hinfi</i>
<i>nifN-nifX</i>	<i>Hinfi</i>
<i>nifS-fixU</i>	<i>PstI</i> y <i>PstI</i> + <i>BbuI</i>
<i>nopP</i>	<i>PstI</i>

##### 5. Análisis por RFLP de grandes fragmentos de la isla simbiótica

Sobre la base de la secuencia del genoma de *B. japonicum* USDA110 (Kaneko et al., 2002) se diseñaron oligonucleótidos para proceder a la amplificación de las secuencias ubicadas entre las posiciones 1908138-1935114 y 2175526-2199025 (GenBank: BA000040.2), (Tabla 4-I). A partir del ADN molde de las cepas que fueron seleccionadas (tal cual se concluyó en el capítulo 3 de esta tesis), 163, 366, 2112 y 953, con las condiciones de reacción descritas en la tabla 4-II. Como cepa control de *B. japonicum*, se utilizó E109.

Estos fragmentos amplificados se analizaron por RFLP, utilizando las enzimas *EcoRI*, *PstI*, *BamHI*, *EcoRV* y *XhoI* (Tabla 4-III).

En torno a la región polimórfica, se diseñaron nuevos pares de primers para generar amplicones más chicos con la finalidad de identificar diferencias en las secuencias de los genes ubicados en esta región. Así se amplificaron los genes *nifE*, *nifN-nifX*, *nifS-fixU* y *nopP*. Los amplicones se restringieron con las enzimas *Hinfi*, *BbuI* y *PstI* (Tabla 4-III).

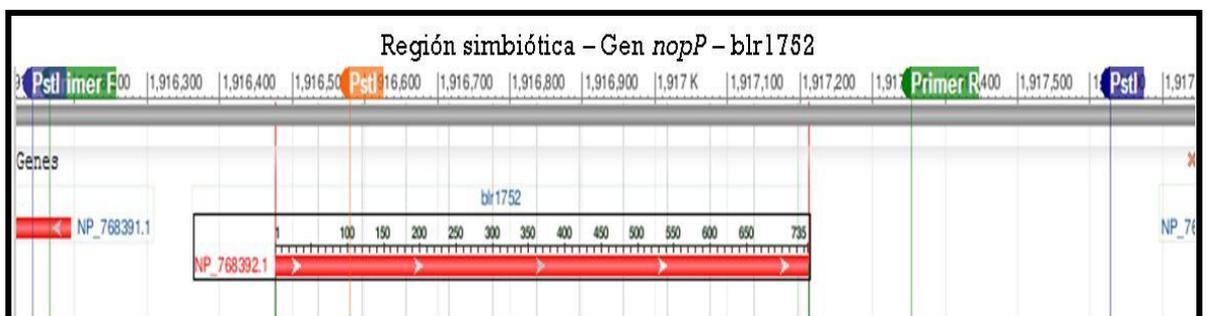
## 6. Amplificación, restricción y secuenciado del gen *nopP*

Para proceder a un análisis más preciso del mismo, se amplificó la secuencia completa del gen *nopP* (735 pb) incluyendo las secuencias que lo flanquean en los extremos 5' y 3'. Esto hizo que el tamaño final del fragmento amplificado fuera de 1208 pb. Este fue purificado (como se indica en el apartado 3.2. PCR del capítulo 3) y restringido con la enzima *Pst*I.

Una alícuota de este amplicón se purificó y se secuenció.



Esquema de ubicación de los primers diseñados para amplificar el gen *nopP* y los sitios de corte de la enzima *Pst*I en la región entorno al gen.



Esquema de ampliación de la región entre primers NopP f y r. El sitio de corte de la enzima *Pst*I marcado en color naranja corresponde al sitio de corte que no se encuentra en las cepas 2112 y 366.

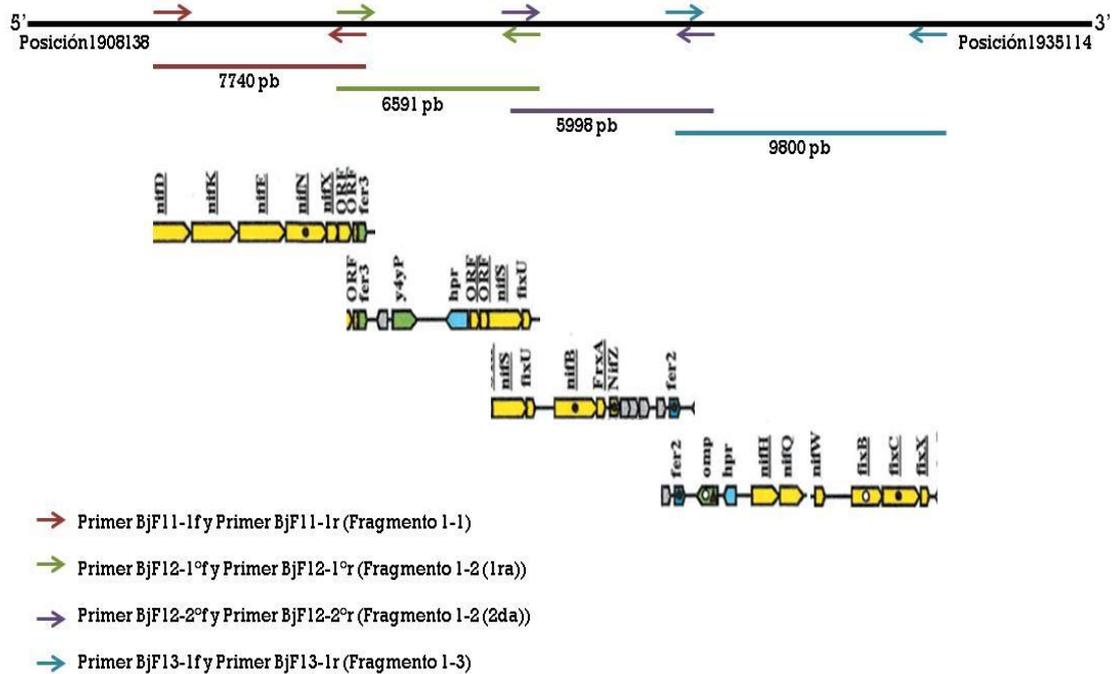
## Resultados

### *Análisis estructural de la región simbiótica*

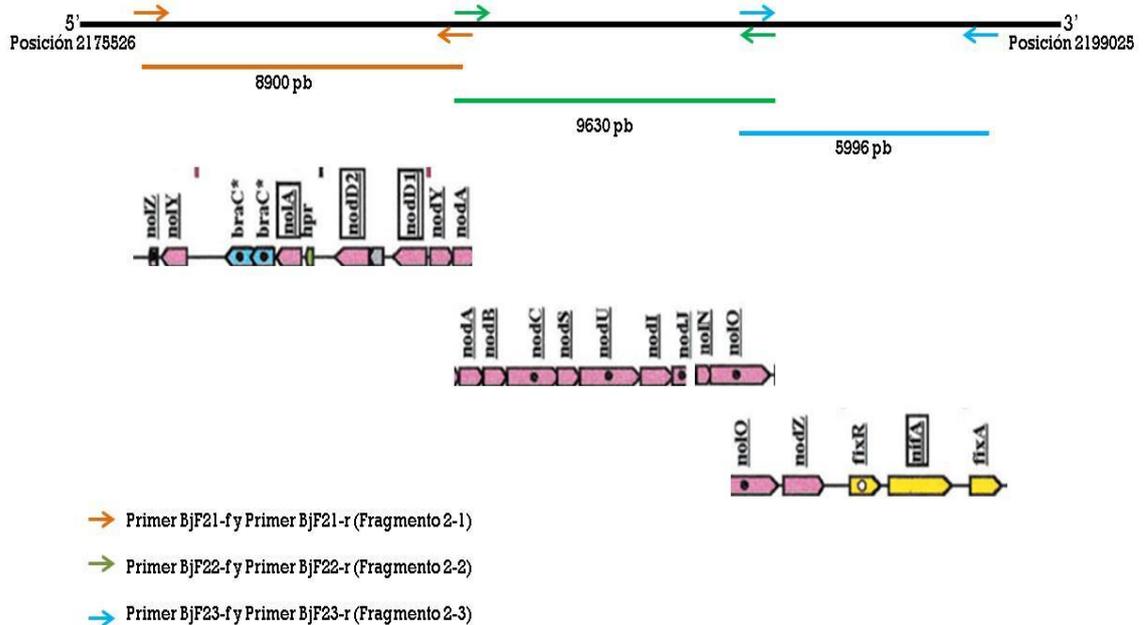
Se amplificaron los fragmentos de la isla simbiótica de 6591 pb, 7741 pb, 5998 pb, 9793 pb, 8954 pb, 9632 pb y 5996 pb, la suma de los cuales hizo un total de 30 y 25 Kb. Estos contienen gran parte de los genes de nodulación y fijación de N<sub>2</sub> de *Bradyrhizobium*. Los amplicones de los aislados fueron digeridos con endonucleasas con el fin de identificar la presencia de polimorfismos. En las figuras 4-3 a 4-9 se presentan los resultados de los RFLP generados con las endonucleasas (Tabla 4-III).

Considerando que los primers se diseñaron en base a la secuencia de *B. japonicum* USDA110 (Kaneko et al., 2002), la ubicación de los genes en los fragmentos amplificados corresponde al mapa genético descrito por Kaneko et al. (2002). Además las posiciones indicadas de los primers hacen referencia al mismo genoma publicado en la base de datos NCBI (Figura 4-1 y 4-2).

En las figuras 4-3 a 4-9 se observa que los aislados no presentaron polimorfismos en los amplicones Bj 11, Bj12 2<sup>da</sup> parte, Bj 13, Bj 21, Bj 22 y Bj 23 que contienen los genes [*nifDK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *fer3*], [*nifS*, *fixU*, *nifB*, *frxA*, *nifZ*, *fer2*], [*fer2*, *nifH*, *nifO*, *nifW*, *fixBCX*], [*nolZ*, *nolX*, *nolA*, *nodD<sub>2</sub>*, *nodD<sub>1</sub>*, *nodY*, *nodA*], [*nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodS*, *nodU*, *nodI*, *nodJ*, *nolN*, *nolO*] y [*nolO*, *nodZ*, *fixR*, *nifA*, *fixA*] respectivamente. Vale la pena destacar que el análisis con restricción de enzimas es acotado, de manera que la ausencia de polimorfismos indica que los sitios de restricción de las enzimas están conservados y por otro lado, que no ocurrieron eventos de inserción. Sin embargo, este análisis no descarta la presencia de mutaciones puntuales entre los sitios de restricción.



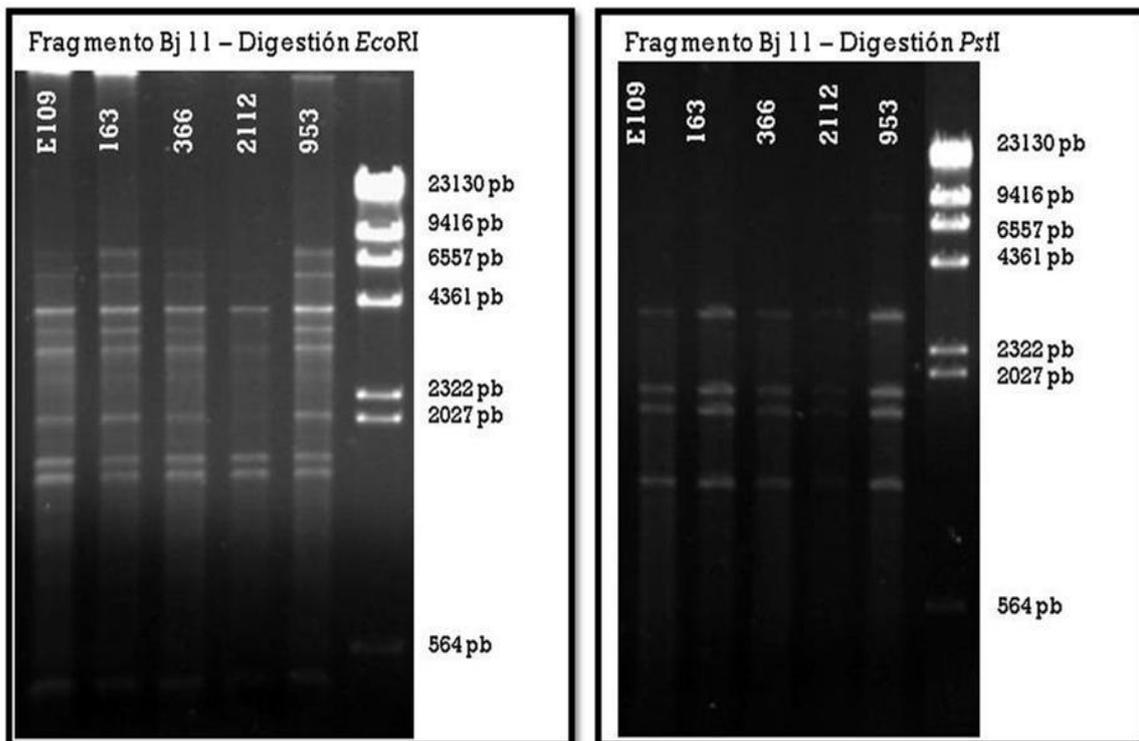
**Figura 4- 1:** Esquema con la ubicación de los primers en el fragmento 1 de la isla simbiótica. En este fragmento ubicado entre las posiciones 1908138 – 1935114 del genoma de USDA110 (Kaneko et al., 2002), se incluyen los genes [*nifDKENX-nifS-nifB-nifH-fixBCX*]. El fragmento completo se amplificó con 4 pares de primers que generaron 4 amplicones de 7740 pb, 6591 pb, 5998 pb y 9800 pb.



**Figura 4- 2:** Esquema con la ubicación de los primers en el fragmento 2 de la isla simbiótica. En este fragmento ubicado entre las posiciones 2175526 – 2199025 del genoma de USDA110 (Kaneko et al., 2002), se incluyen los genes [*nolZY-nolA-nodD2-nodD1YABCSUIJ-nolMNO-nodZ-fixR-nifA-fixA*]. El fragmento completo se amplificó con 3 pares de primers que generaron 3 amplicones de 8900 pb, 9630 pb y 5996 pb.

Se amplificó un fragmento de 7740 pb correspondientes al fragmento Bj 1-1 que incluye los genes *nifDK*, *nifE*, *nifN*, *nifX*, *fer3*. La digestión del mismo con la enzima *EcoRI*, resultó en un patrón de 4 bandas de 4173 pb, 1639 pb, 1500 pb y 428 pb (Se observan además en el gel bandas más tenues correspondientes a digestiones parciales del fragmento). Todas las cepas presentaron el mismo patrón que además coincidió con el análisis in silico realizado sobre la secuencia de USDA110.

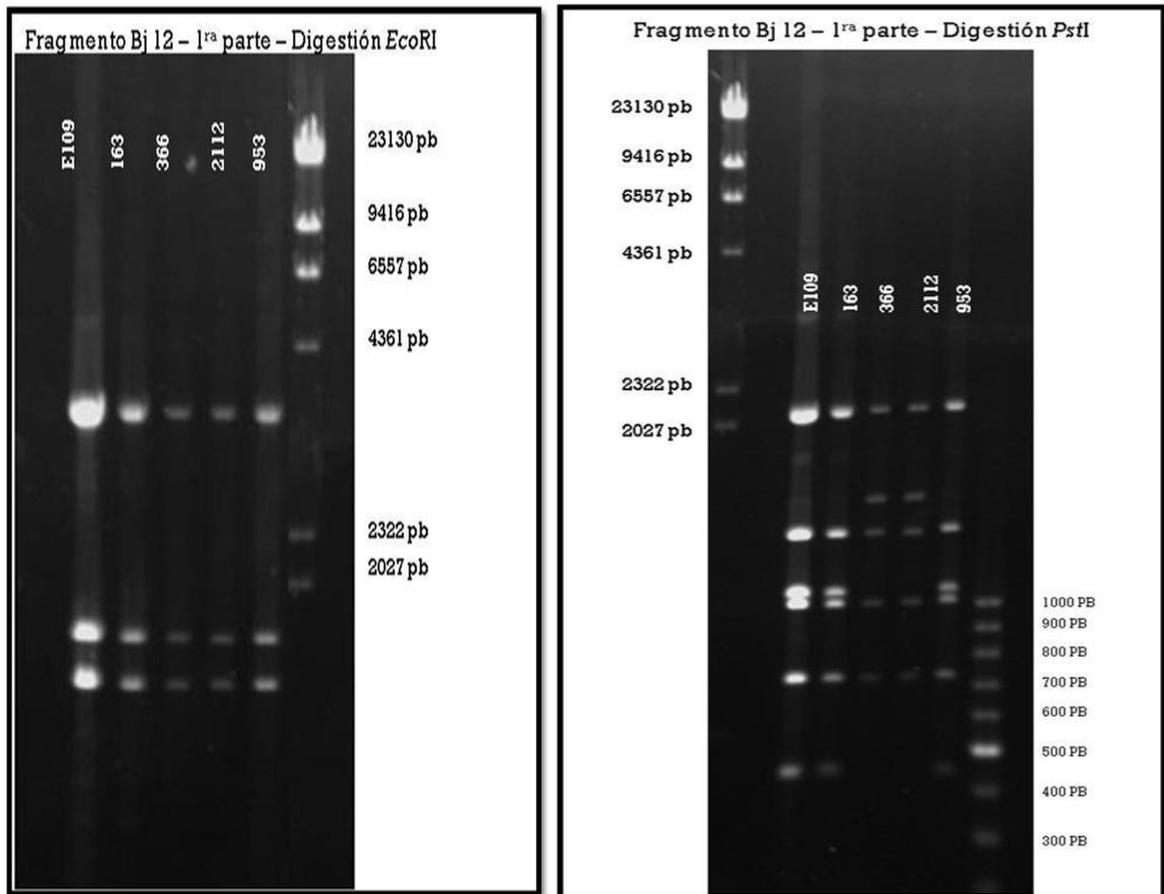
La digestión del mismo fragmento con la enzima *PstI*, también dio un patrón único para todas las cepas que además fue similar al patrón de digestión in silico de la secuencia de USDA110, que presentó 5 bandas de 2994 pb, 1884 pb, 1677 pb, 1144 pb y 41 pb (Figura 4-3).



**Figura 4-3:** Fragmento Bj 11 de 7740 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *PstI*.

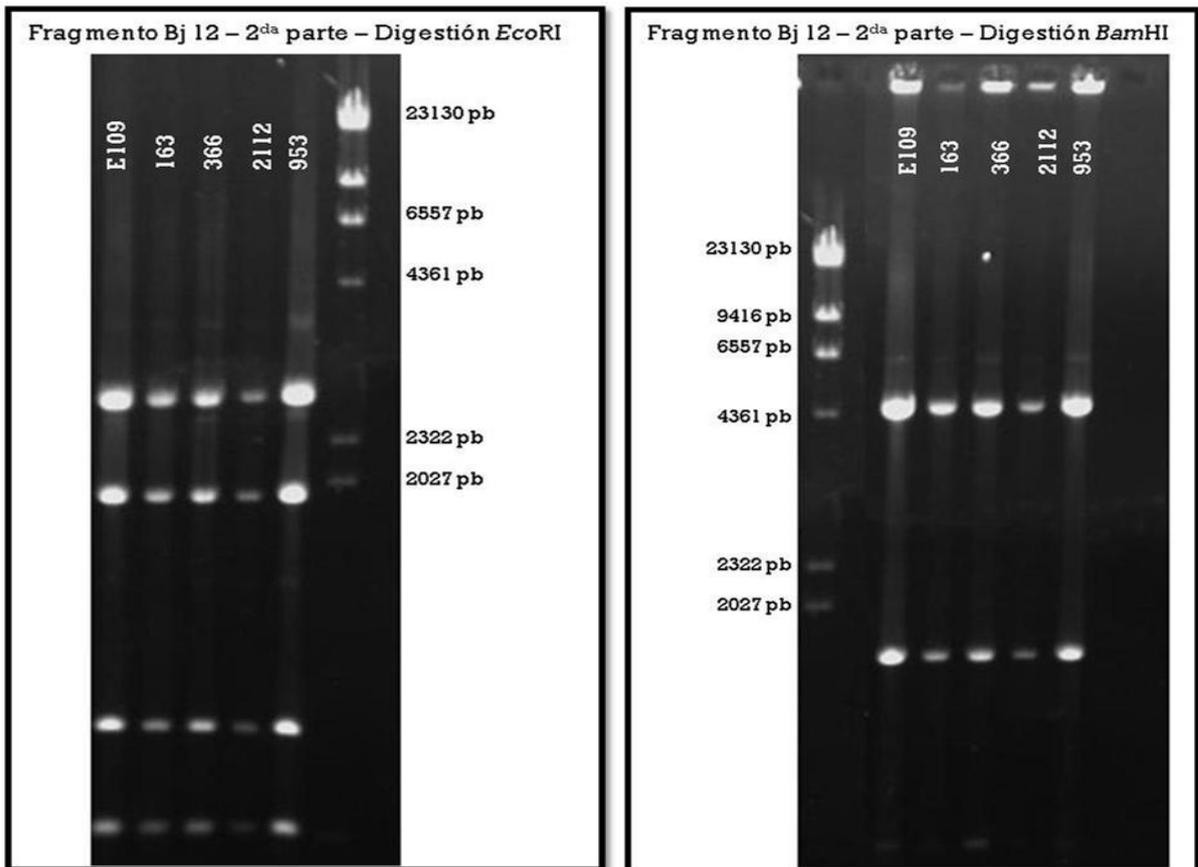
Solo se detectaron polimorfismos en el fragmento 1-2 1<sup>ra</sup> parte de 6591 pb que contiene los genes *Fer3*, *blr1752* (*nopP*), *nifS* y *fixU* (Figura 4-4). La restricción de este fragmento con *PstI* generó dos patrones, uno típico de las cepas 163 y 953 e idéntico al de la cepa E109 (control) y el otro, típico de los aislados 366 y 2112. El patrón que se generó para las cepas E109, 163 y 953, tuvo 6 bandas de 2069 pb, 1320 pb, 1048 pb, 999 pb, 717 pb y 438 pb. Para las cepas 366 y 2112 el patrón consistió en 5 bandas de 2069 pb, 1486 pb, 1320 pb, 999 pb y 717 pb.

La digestión del mismo fragmento 1-2 1<sup>ra</sup> parte de 6591 pb con *EcoRI*, dio un único patrón de bandas para todos los aislados de 3 bandas de 3399 pb, 1702 pb y 1490 pb.



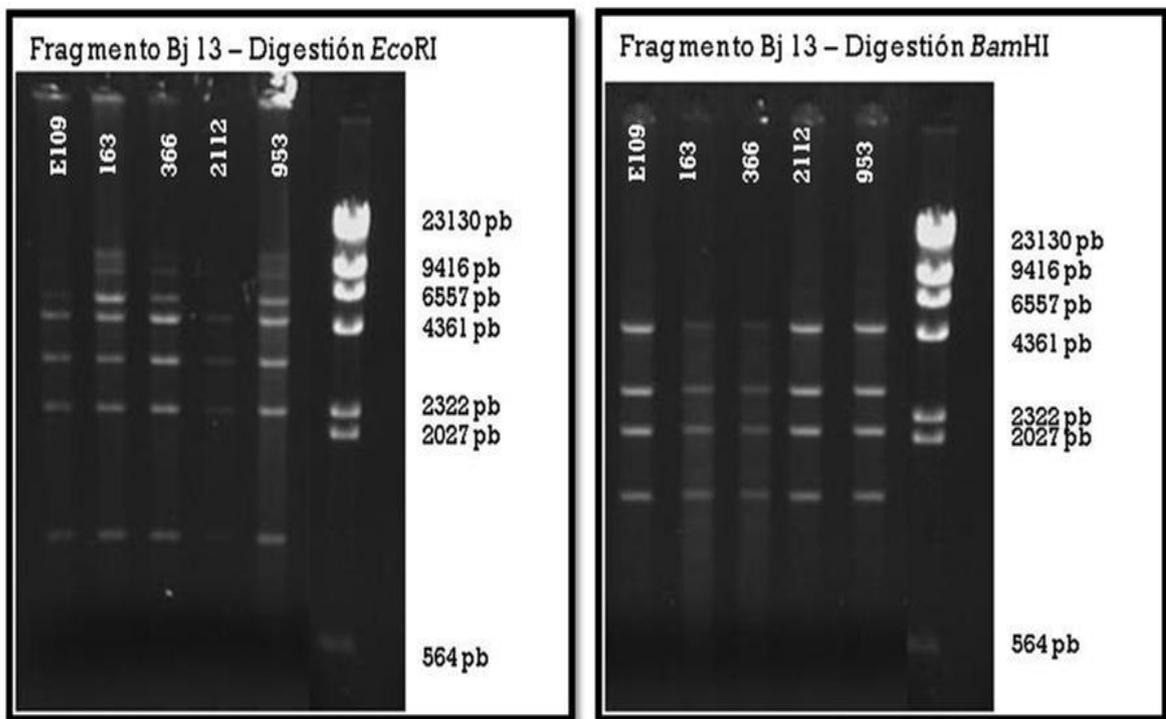
**Figura 4-4:** Fragmento Bj 12-1<sup>ra</sup> parte de 6591 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las endonucleasas *EcoRI* y *PstI*.

La digestión de la 2da parte del fragmento Bj12 que contiene los genes *nifS*, *fixU*, *nifB*, *frxA*, *nifZ*, *fer2*, se realizó con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. Las dos enzimas generaron patrones de restricción similares para las 5 cepas (Figura 4-5). La digestión con *EcoRI* generó un patrón de 4 bandas de 2689 pb, 1905 pb, 840 pb y 562 pb, y la digestión con *BamHI* un patrón de 2 bandas de 4421 pb y 1575 pb; ambas digestiones repitieron el patrón generado in sílico sobre la misma secuencia de USDA110.



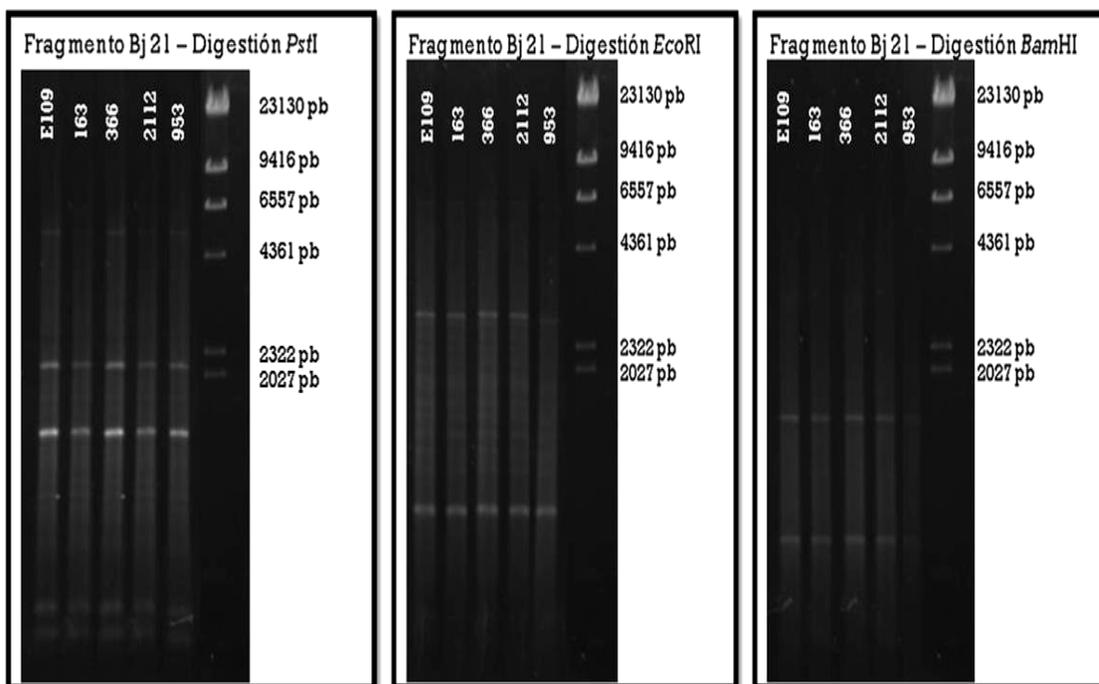
**Figura 4-5:** Fragmento Bj 12-2<sup>da</sup> parte de 5996 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*.

El fragmento Bj 13 de un tamaño de 9800 pb contiene los genes *fer2*, *nifH*, *nifO*, *nifW*, *fixBCX*, la digestión con la enzima *EcoRI* se obtuvo un patrón de 4 bandas de 4018 pb, 2847 pb, 2034 pb y 901 pb (Figura 4-6). Se observan además bandas de mayor tamaño y más tenues correspondientes a digestiones parciales del fragmento. Todas las cepas repitieron el mismo patrón que además coincidió con el obtenido in silico sobre la secuencia de USDA110. Por otro lado la digestión con la enzima *PstI* también dio un patrón idéntico para todas las cepas y coincidente con la digestión in silico de 4 bandas de 4143 pb, 2496 pb, 1908 pb y 12531 pb.



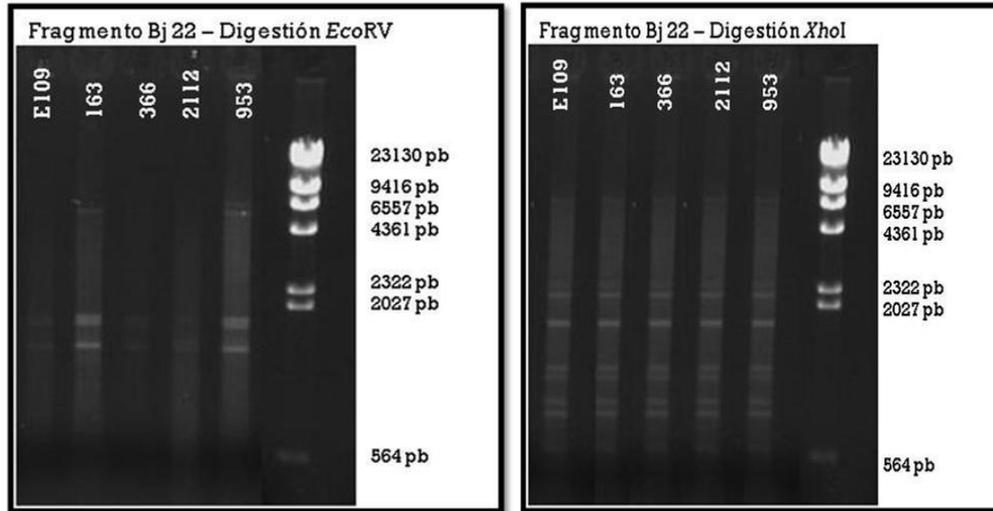
**Figura 4-6:** Fragmento Bj 13 de 9800 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*.

La digestión del fragmento Bj21 que abarca la secuencia de los genes *nolZ*, *nolX*, *nolA*, *nodD<sub>2</sub>*, *nodD<sub>1</sub>*, *nodY*, *nodA*, se realizó con las enzimas *Pst*I, *Eco*RI y *Bam*HI (Figura 4-7). En los tres casos los patrones fueron idénticos para las 5 cepas. La digestión con *Eco*RI generó un patrón de 3 bandas de 5648 pb, 2519 pb y 733 pb y la digestión con *Bam*HI un patrón de 4 bandas de 3756 pb, 3002 pb, 1476 pb y 666 pb; ambas digestiones repitieron el patrón generado in sílico sobre la misma secuencia de USDA110. La digestión del mismo fragmento con la enzima *Pst*I dio un patrón de 5 bandas de 5011 pb, 1978 pb, 1346 pb, 356 pb y 209 pb.



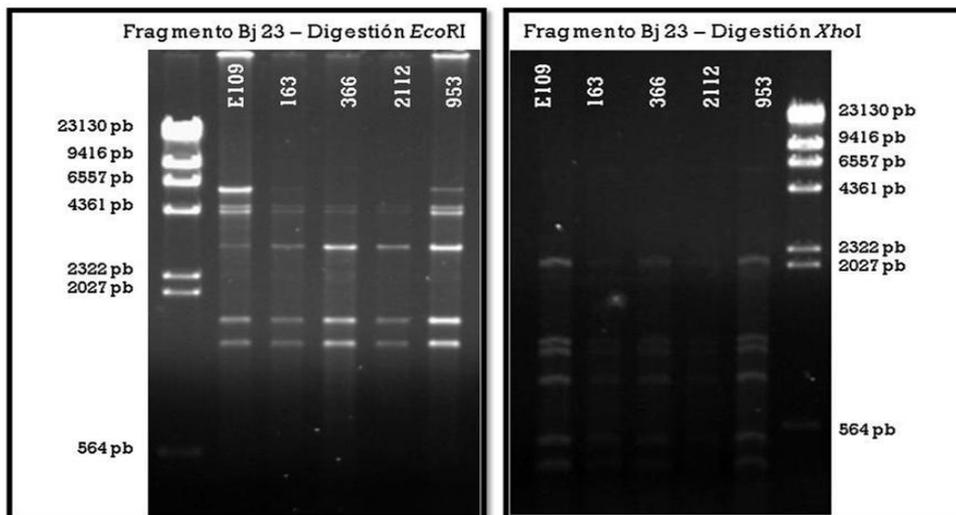
**Figura 4-7:** Fragmento Bj 21 de 8900 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *Pst*I, *Eco*RI y *Bam*HI.

Al digerir el fragmento Bj 22 de un tamaño de 9630 pb en donde se identifican las secuencias de los genes *nodA*, *nodB*, *nodC*, *nodS*, *nodU*, *nodI*, *nodJ*, *nolN*, *nolO*, con la enzima *Eco*RV se obtuvo un patrón de 4 bandas de 5143 pb, 1640 pb, 1563 pb y 1284 pb (Figura 4-8). Todas las cepas presentaron el mismo patrón. La digestión con *Xho*I también dio un patrón de 4 bandas de 6952 pb, 1655 pb, 733 pb y 290 pb en todas las cepas y USDA110 (in sílico) coincidente con la digestión in sílico.



**Figura 4-8:** Fragmento Bj 22 de 9630 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *EcoRV* y *XhoI*.

Por último, se amplificó el fragmento Bj23 correspondiente a los genes *nolO*, *nodZ*, *fixR*, *nifA*, *fixA* de 5995 pb, que fue digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* generando un patrón de 3 bandas de 3032 pb, 1619 pb y 1344 pb y de 6 bandas de 2125 pb, 1125 pb, 1045 pb, 837 pb, 490 pb y 373 pb, respectivamente (Figura 4-9). No se observaron polimorfismos.



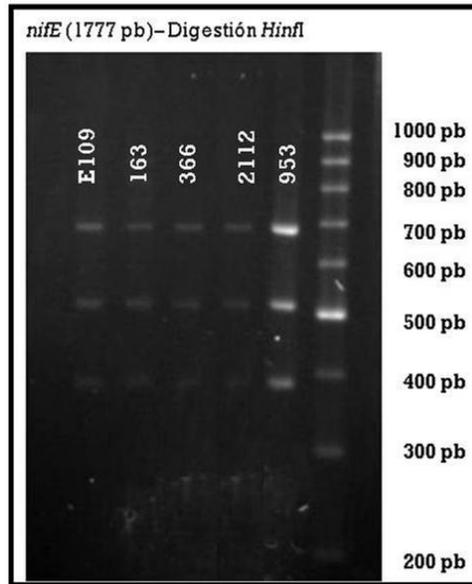
**Figura 4-9:** Fragmento Bj 23 de 5995 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con las enzimas *EcoRI* y *XhoI*.

Con el fin de realizar un análisis más preciso del fragmento de ADN en el que se observaron los polimorfismos (Fragmento Bjl2 – 1<sup>ra</sup> parte/Figura 4-4) y las secuencias flanqueantes, se diseñaron 4 pares de primers adicionales. Así se amplificaron el gen *nifE* y un fragmento que contiene la secuencia completa de los genes *nifN-nifX*. Por otro lado, el tercer par de primers se utilizó para amplificar la región correspondiente a los genes *nifS-fixU* y el cuarto par para amplificar el gen *blr1752 (nopP)* (Figura 4-10). Sobre los mismos se realizó un análisis de restricción empleando las enzimas *HinfI*, *BbuI* y *PstI*.



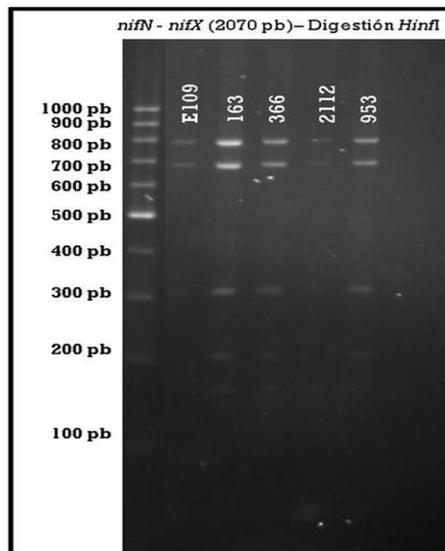
**Figura 4-10:** Esquema de la región polimórfica.

La digestión de amplicón *nifE* de 1777 pb con la enzima *HinfI* generó un patrón de 6 bandas de 678 pb, 509 pb, 380 pb, 130 pb, 71 pb y 9 pb al igual que la digestión in silico de la misma secuencia de USDA110. Este patrón fue idéntico para las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953 (Figura 4-11).



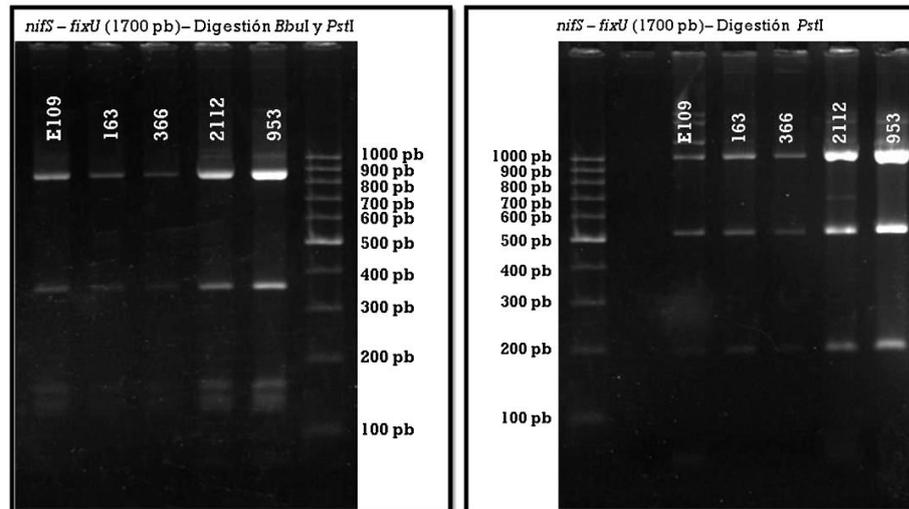
**Figura 4-11:** amplicón *nifE* de 1777 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con la enzima *Hinfl*.

Cuando se digirió el amplicón *nifN* – *nifX* de 2070 pb se obtuvo un patrón de 5 bandas de 765 pb, 661 pb, 297 pb, 195 pb y 152 pb que se repitió para todas las cepas en estudio (Figura 4-12).



**Figura 4-12:** amplicón *nifN-nifX* de 2070 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con la enzima *Hinfl*.

La digestión del fragmento *nifS* – *fixU* se realizó con las enzimas *BbuI* y *PstI* generando un patrón de 6 bandas (861 pb, 352 pb, 155 pb, 138 pb, 126 pb y 68 pb) cuya sumatoria da el tamaño del fragmento amplificado de 1700 pb. También se realizó la digestión utilizando solo la enzima *PstI* obteniéndose un patrón de 3 bandas de 999 pb, 507 pb y 194 pb, idéntico al obtenido in silico con la misma secuencia de USDA110 (Figura 4-13).



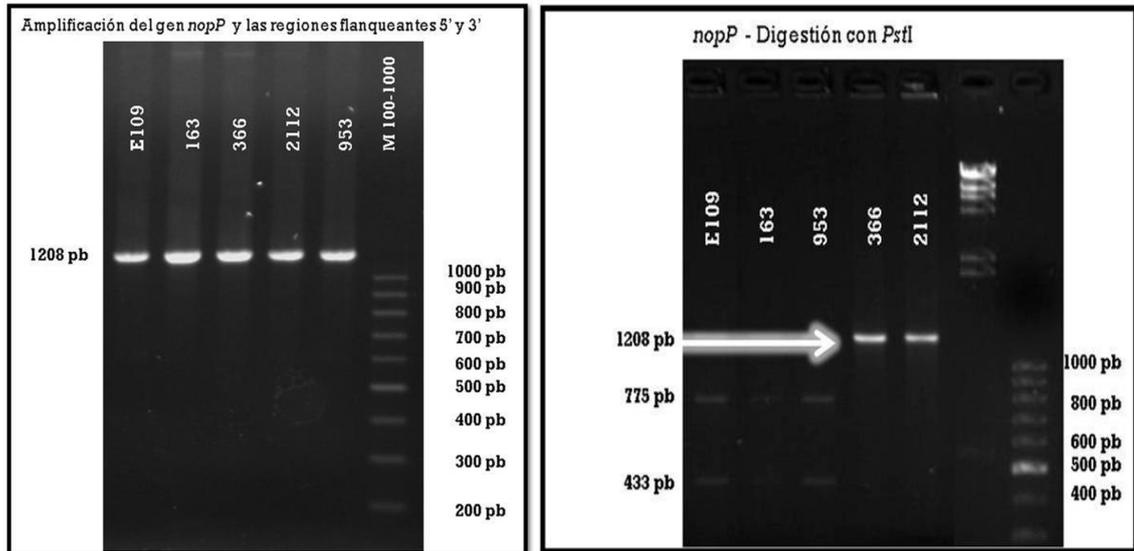
**Figura 4-13:** amplicón *nifS* – *FixU* de 1700 pb, de las cepas E109, 163, 366, 2112 y 953, digerido con la enzima *BbuI* y *PstI* y digestión del mismo fragmento con *PstI*.

En el estudio de la región polimórfica y las secuencias flanqueantes de esta región, no se observaron diferencias en las secuencias de los genes *nifE* y *nifN* - *nifX*, y tampoco se encontró polimorfismo en los genes *nifS*-*fixU* que estaban incluidos en el fragmento de 6591 pb (Figura 4-11, 4-12 y 4-13). Estos resultados sugieren que probablemente los aislados presenten diferencias a nivel de las secuencias del gen *blr1752* (*nopP*), que tiene homología con la proteína A, proteína que además es inducida por los exudados de la planta.

#### *Amplificación, restricción y secuenciado del gen nopP*

En este estudio también se amplificó la secuencia del gen *blr1752* (*nopP*) de 735 pb, 331 pb de la región 5' del gen y 142 pb de la región 3'. Este amplicón de 1208 pb fue digerido con la enzima *PstI* generando para las cepas E109, 163 y 953 un patrón de 2

bandas de 775 pb y 433 pb. No se observó digestión para el amplicón generado con ADN molde de 366 y 2112 (Figura 4-14).



**Figura 4-14:** Amplificación del gen *nopP* y digestión con *PstI*.

#### Secuenciación del gen *nopP* (*blr1752*)

Adicionalmente se purificó el fragmento amplificado con los primers NopP-f/NopP-r y se secuenció. Las secuencias se publicaron en la base de datos del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) con los siguientes números de acceso: KP010710 - KP010714. La alineación de las secuencias con la secuencia del genoma de las cepas E109 y USDA6<sup>T</sup> mostraron un 100 % de cobertura con todas las secuencias obtenidas y un 100 % de identidad para la secuencia del gen *nopP* de los aislados 163 y 953; mientras que para los aislados 366 y 2112 el porcentaje de identidad fue del 99 %.

El análisis de las secuencias de las cepas 366 y 2112 mostró que la mutación en el sitio de corte de la enzima *PstI* en la secuencia de *nopP*, cambia el aminoácido 34 que se corresponde con la posición 101 pb del gen, en donde una adenina es reemplazada por una guanina generando un cambio en el codón CAG (Gln - Q) por CGG (Arginina - Arg o R), tal como se predijo en el análisis de restricción. Además se encontraron otros dos cambios en la secuencia de ADN del gen que se traducen en cambios en los aminoácidos



## **Discusión**

En el capítulo 2 y 3 se describió la caracterización fenotípica y genética de doce aislados de rizobios simbiontes de la soja obtenidos de la zona norte de la provincia de Buenos Aires y sur de Santa Fe (Pastorino et al., 2011). Entre estos se seleccionaron cuatro aislados que se diferenciaron en base a su capacidad de autoagregación y formación de biofilm, características que fueron afectadas por la presencia de exudados radiculares. Estos cuatro aislados que mostraron una capacidad de fijación de  $N_2$  igual o superior a la cepa E109, presentaron diferencias en la capacidad de sobrevivencia sobre la superficie de la semilla y la velocidad con que infectan a la raíz. Estos estudios fueron además complementados con el análisis genético con marcadores moleculares que demostraron que presentan, cada uno de los bradyrizobios, perfiles (fingerprints) propios; que ponen en evidencia que algunos son bastante diversos como por ejemplo el aislado 953. Por otro lado, el análisis de la secuencia del ITS fue una herramienta clave que confirmó que los aislados 366 y 163 evolutivamente se encuentran más distantes de los aislados 953 y 2112 y de la cepa comercial E109. Por eso se procedió a analizar los fragmentos de ADN que codifican los genes que regulan o determinan la capacidad para fijar  $N_2$ , agrupados en una isla genómica llamada isla simbiótica. Si bien en la base de datos de genes del NCBI hoy se encuentran disponibles un mayor número de genomas que permiten hacer un análisis comparativo de los mismos, los estudios de esta tesis se basaron en la secuencia del genoma de USDA110.

Varias son las herramientas moleculares con las que se han caracterizado y diferenciado cepas de *Bradyrhizobium*, como el análisis de restricción de fragmentos polimórficos (RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism) (Minamisawa et al., 1992, Sadowsky et al., 1991). Si bien esta técnica ha sido útil para identificar y establecer relaciones entre los organismos, tiene la desventaja de que es una técnica laboriosa que por otro lado brinda información limitada en líneas isogénicas cercanas de bradyrizobios (Judd et al., 1993).

Debido a lo expresado en el párrafo anterior y sobre la base de la secuencia del genoma de USDA110, se diseñaron primers para la amplificación de fragmentos de ADN parcialmente solapados que oscilaron entre 6 y 11 Kb y que en conjunto conforman los 25 y 30 Kb de la isla simbiótica, donde se concentran los genes de nodulación y fijación de nitrógeno. La amplificación de fragmentos de ADN de los tamaños mencionados es compleja y dificultosa, sin embargo tal cual se mostró en los resultados, se amplificaron

exitosamente todos los fragmentos target que codifican los genes de *nif*, *fix*, *nol* y *nod* (Kaneko et al., 2002). La fidelidad de la amplificación se evidenció por el alto grado de conservación de las secuencias, si bien el análisis fue solo en base a la restricción con endonucleasas.

Las secuencias del genoma que codifican a los genes de fijación de nitrógeno contienen una alta densidad de regiones repetitivas (Kaluza et al., 1985; Hahn & Hennecke, 1987; Minamisawa et al., 1992), por lo que es posible que se produzcan naturalmente rearrreglos, tal cual lo han descrito Kaluza y colaboradores (Kaluza et al., 1985), lo cual sería una forma de generar diversidad en las poblaciones de rizobios del suelo. Aún cuando se conoce que hoy existen métodos más potentes (aunque también más costosos), como lo es la secuenciación completa del genoma, se realizó un análisis de RFLP de los amplicones con al menos dos enzimas de restricción. El RFLP de 6 amplicones de los cuatro aislados y de E109, fue idéntico encontrándose polimorfismos solo en un amplicon de 6591 pb que contiene los genes *Fer3*, *blr1752* (*nopP*), *nifS* y *fixU*. Además ya se había descrito que los genes que codifican la nitrogenasa (*nifD*, *nifK* y *nifH*), presentaron patrones de restricción idénticos. Esto por un lado demuestra que las secuencias analizadas están conservadas al menos en lo que hace a rearrreglos, ya que cambios en el ordenamiento de las secuencias darían como resultado cambios a nivel de la restricción del genoma que presentaría diferencias importantes en el tamaño de los fragmentos de ADN que generó la digestión.

Sólo se encontró polimorfismo en la región que codifica el gen *nopP* (*blr1752*) que se encuentra en el amplicon Bj 12-1<sup>ra</sup> parte (6591 pb). Los aislados 953, E109 y 163 presentaron un patrón de digestión idéntico y distinto de los aislados 366 y 2112. Debido a que se observaron diferencias en la secuencia del gen *nopP* se analizaron con mayor detalle los fragmentos de ADN próximos a este gen, tanto del extremo 5' como del 3'. Así se amplificaron secuencias más cortas que incluyeron a los genes *nifN*, *nifX*, *nifE*, *nifS* y *fixU*. La amplificación y restricción de estas secuencias no presentaron polimorfismos. Todos estos resultados confirman lo encontrado por otros autores, que el genoma de los bradyrizobios en los suelos es estable (Batista et al., 2007).

La proteína NopP forma parte de un grupo de proteínas efectoras secretadas por el sistema de secreción tipo III (SSTT) de rizobios. Varios estudios han demostrado que estas proteínas pueden promover o prevenir la nodulación dependiendo de la planta hospedadora (Deakin & Broughton, 2009; Schechter et al., 2010). Las proteínas de

nodulación externas (NOP) son al menos 20 proteínas que atraviesan la membrana de la célula vegetal a través del sistema de transporte SSTT, y actúan en el citoplasma alterando su metabolismo o causando la supresión de la defensa del hospedante contra los microorganismos (Bortolan et al, 2009). El gen *nopP* ha sido encontrado en unas pocas especies de rizobios (*Rhizobium sp.* NGR234, *Sinorhizobium fredii*, y *B. japonicum*) y está ausente en bacterias patogénicas (Deakin & Broughton, 2009). Si bien la función de esta y otras proteínas Nop durante la nodulación aún no han sido caracterizadas (Schechter et al., 2010), se ha sugerido que este gen actúa suprimiendo las defensas del huésped mediante la inhibición de la respuesta hipersensible, lo que indirectamente contribuye al desarrollo de un mayor número de infecciones (Lang et al., 2008; Saad et al., 2005; Bortolan et al., 2009). Varios trabajos sugieren que el estudio de la funcionalidad de este gen de *B. japonicum* pueden ser clave para conocer más profundamente los mecanismos de competitividad y eficiencia en la fijación de N<sub>2</sub>.

Las diferencias en la secuencia del gen *nopP* encontradas por RFLP, se confirmaron a través de la secuencia del fragmento amplificado que tuvo un tamaño de 1208 pb. La secuencia del mismo mostró que el gen se inicia en el codón AUG ubicado en la base número 332 del fragmento amplificado y tiene un tamaño de 735 pb. Los polimorfismos se debieron a tres mutaciones puntuales en la secuencia del gen de los aislados 366 y 2112, que tuvo un 99 % de homología con la secuencia *nopP* de E109. La traducción de la secuencia nucleotídica mostró que estas mutaciones implican cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína codificada. Esto último podría alterar el nivel de expresión y/o la funcionalidad de la proteína que podría verse afectada en las cepas 366 y 2112. Por eso se planteó realizar ensayos para determinar el perfil de proteínas secretadas por cultivos de rizobios inducidos y no inducidos por exudados de semillas de soja y estudiar además el perfil de expresión de los genes regulatorios de nodulación y fijación de nitrógeno y de *nopP*. Estos trabajos se describen en el capítulo que continúa.

***Capítulo 5: Estudio de la expresión  
de genes simbióticos.***

## **Introducción**

Una década después de la introducción de los inoculantes, una mayor demanda de nitrógeno y los genotipos de soja con mayor potencial de rendimiento generaron la necesidad de identificar cepas con mayor capacidad de fijación de nitrógeno y tolerancia a condiciones de estrés ambiental, características que contribuyen a la supervivencia saprofítica (Godoy et al, 2008). Los rizobios como se describió anteriormente, viven libres en el suelo o como endosimbiontes fijadores de nitrógeno (bacteroides) (Pessi et al., 2007). La adaptación de los rizobios a la vida en simbiosis, requiere entre otras cosas que estos se adapten a condiciones de bajas concentraciones de oxígeno, y a las respuestas frente a la infección de la planta hospedante. La supervivencia en el suelo, en cambio, hace que los rizobios estén expuestos a ambientes más estresantes y por ello es clave una adaptación a un amplio rango de condiciones ambientales y su nutrición en suelos de baja fertilidad. Por estas cuestiones los estudios transcriptómicos o proteómicos con bacterias cultivadas en medios artificiales *in vitro* son también importantes, ya que pueden informar sobre los mecanismos relacionados con el crecimiento bacteriano previo al establecimiento de la simbiosis, como por ejemplo la capacidad de vida saprofítica.

La disponibilidad de las secuencias genómicas completas de rizobios posibilita realizar estudios que permiten entender las bases genéticas de las adaptaciones fisiológicas de los microorganismos, tales como los estudios de expresión de genes en simbiosis. Así se dispone de resultados sobre el estudio de perfiles transcripcionales de *B. japonicum* en nódulos determinados de soja y su comparación con la expresión de los mismos genes en cultivos aeróbicos de la bacteria (Pessi et. al., 2007). Estos estudios sugieren que muchos de los genes que se expresan durante las etapas tempranas de la simbiosis codifican proteínas que, muy probablemente, no sean requeridas cuando la bacteria vive en vida libre y por lo tanto no se expresan en estas condiciones.

En función de que se identificaron rizobios que difieren fenotípicamente, se planteó la necesidad de evaluar la expresión de los genes simbióticos que codifican proteínas que participan o están relacionados con etapas tempranas de la nodulación. Eventualmente esto permitiría identificar las proteínas putativas que podrían estar relacionadas con las diferencias estructurales encontradas en las secuencias de ADN de la isla simbiótica.

La regulación de la nodulación, como se describió anteriormente, depende de NodD1 y del sistema proteico de dos componentes NodV/W. Con el fin de evaluar si los dos caminos regulatorios están activos en los rizobios aislados se seleccionaron para el estudio diferencial de expresión de genes, *nodD1*, *nodD2* y *nodW*.

Además, para realizar los estudios de expresión, se seleccionaron genes fundamentales en la regulación de la expresión de genes de fijación de nitrógeno. Por un lado se consideró la eficiencia del sistema de regulación que responde a condiciones limitantes de oxígeno, FixLJ-FixK<sub>2</sub>, y por otro lado la segunda vía de regulación, el operon RegS-NifA. En este caso los genes seleccionados fueron *fixL* y *nifA*. El requerimiento de FixL no es absoluto en *B. japonicum* como lo es por ejemplo en *Sinorhizobium meliloti*, ya que es uno de los dos reguladores de activación de la cascada de genes involucrados en la fijación de nitrógeno (Nellen-Anthamatten et al., 1998; Satterlee et al., 2008). FixL codifica una proteína que sensa el nivel de oxígeno del ambiente y dispara o regula la cascada de genes que activan la fijación. En ambientes aeróbicos cuando el grupo hemo de FixL está saturado con oxígeno molecular, FixL no fosforila catalíticamente el factor de transcripción FixJ. Sin embargo, a bajas presiones parciales de O<sub>2</sub> la formación de desoxi-FixL resulta en la fosforilación de FixJ vía ATP, lo que a su vez activa la transcripción de genes *nif* y *fix*.

Además de este conjunto de genes regulatorios y considerando el análisis de restricción de la isla simbiótica, se analizó también la expresión de los genes *nopP* y *rhcC1* (componente del sistema de secreción tipo III, activado por *ttsI*). El análisis estructural de las secuencias de genes simbióticos nos reveló cambios en la secuencia del gen *nopP*, una proteína de nodulación secretada por el SSTT presente en *B. japonicum* y que podría estar relacionada con la supresión de las defensas de la planta mediante la inhibición de la respuesta hipersensible, lo que indirectamente contribuye al desarrollo de un mayor número de infecciones. Varios trabajos sugieren que el estudio de la funcionalidad de este gen de *B. japonicum* pueden ser clave para conocer más profundamente los mecanismos de competitividad y eficiencia en la fijación de N<sub>2</sub>. El genoma de *B. japonicum* conserva tanto el sistema de secreción tipo III como el sistema flagelar, que desempeñan un papel crucial en las interacciones planta-microorganismo, especialmente en la adhesión bacteriana a las superficies del pelo radicular. El sistema flagelar de este simbiote está compuesto por un flagelo subpolar “grueso” de un filamento integrado por flagelinas FliC1-4 de 65 kDa y otro “delgado” de ubicación peritrica, que consiste en flagelinas FliCI-II de 33 kDa (Kanbe et al., 2007; Althabegoiti et

al., 2011). A pesar del hecho ampliamente aceptado de que las señales extracelulares producidas por las plantas pueden influir en la actividad de las bacterias en la rizósfera, los efectos que de forma natural producen los exudados de la raíz de la soja en la interacción simbiótica, especialmente en relación con la fisiología y la competitividad en la nodulación de rizobios no están del todo elucidados (Althabegoiti et al., 2011). Sin embargo en la actualidad, la puesta a punto de la transcriptómica y la tecnología de espectrometría de masas ha facilitado en gran medida la investigación de los cambios a nivel del transcriptoma de *B. japonicum* en respuesta a un determinado compuesto (Donati et al., 2013). Así es que además del estudio de los cambios en los niveles de expresión de genes seleccionados, se realizaron estudios proteómicos complementarios sobre las proteínas extracelulares y como se modifican los patrones de expresión de las mismas en función de los exudados de semillas de soja.

Otros genes adicionales seleccionados para el estudio de expresión fueron *blr0241* y *fixX*. El gen *blr0241* codifica para la ACC deaminasa que cataliza la conversión de 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) a amonio y alfa-cetoglutarato. El ACC es un precursor del etileno, hormona que es sintetizada por la planta y que se ha demostrado inhibe el proceso de nodulación de los rizobios (Murset et al., 2012). Los efectos benéficos de la ACC deaminasa como detoxificadora han sido demostrados en varios rizobios como *Mesorhizobium loti* y *Rhizobium leguminosarum*. Las cepas de rizobios que expresan ACC desaminasa son hasta un 40 % más eficientes en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, que las cepas que carecen de esta actividad (Ma et al. 2003a, 2004). Sin embargo este rol previamente descrito para la ACC-deaminasa no se ha podido generalizar a todas las especies. Por otro lado, las cepas de rizobios que expresan ACC deaminasa sólo tienen un bajo nivel de actividad de la enzima (2-10 %) en comparación con bacterias promotoras del crecimiento de las plantas de vida libre. Por lo tanto, las bacterias de vida libre que se unen no específicamente a los tejidos (principalmente raíces) y tienen un alto nivel de actividad ACC deaminasa es probable que protejan a las plantas de diferentes estreses abióticos y bióticos al reducir los niveles de etileno en la planta. En el caso de los rizobios que forman nódulos en las raíces de plantas específicas, tienen un bajo nivel de actividad de la enzima que promueve la nodulación por reducción local de los niveles de etileno. No está claro si las diferencias en actividad de la ACC deaminasa entre las bacterias de vida libre y los rizobios se debe a que cada especie sintetiza diferentes cantidades de enzima o a diferencias en la actividad catalítica de las enzimas de las diferentes bacterias (Glick, 2014). Además, se

sabe que a diferencia de la ACC deaminasa de otros rizobios, la deaminasa de *Mesorhizobium loti* se expresa en los nódulos por lo que no tiene efecto sobre la nodulación (Nascimento et al., 2012). En *M. loti*, la ACC deaminasa actuaría reduciendo la tasa de senescencia del nódulo. Esto es particularmente importante debido al hecho de que siendo la fijación de nitrógeno, un proceso que utiliza un nivel muy alto de energía en forma de ATP, podría activar la síntesis de etileno resultando en la senescencia prematura del nódulo (Glick, 2014).

El gen *fixX* es uno de los genes *fix* que se encuentra exclusivamente en rizobios, y otros diazótrofos microaeróbicos y aeróbicos, pero no en *K. pneumoniae* (Fuhrmann et al., 1985; Gubler & Hennecke, 1986). El gen *fixX* codifica una proteína que transfiere electrones, es decir que cumple un rol similar a la ferredoxina, por ello se ha sugerido que probablemente el producto de este gen esté involucrado en una reacción redox desconocida pero esencial para la actividad de la nitrogenasa (Gubler & Hennecke, 1986).

Los aislados que fueron objeto de estudio en esta tesis se seleccionaron sobre la base de diferencias fenotípicas como la nodulación y fijación de nitrógeno y también sobre la base de diferencias a nivel genético. Así la cepa 366 desarrollo más nódulos que la cepa 163, proceso en el que interviene el etileno. Por otro lado se encontraron polimorfismos en el gen *nopP* que codifica una proteína que es secretada por el SSTT. En base a esto se plantearon los objetivos de este trabajo que consistieron en evaluar la expresión de los genes reguladores de la nodulación, de los genes del sistema de secreción tipo III, de los genes reguladores de la fijación de N<sub>2</sub> y de un gen que codifica una ACC deaminasa, enzima que estaría influyendo sobre el proceso de la nodulación y quizás también sobre la senescencia de los nódulos.

### ***Hipótesis del capítulo***

*La capacidad diferencial de fijación de nitrógeno de los aislados es el resultado de la expresión diferencial de genes de la isla simbiótica.*

### ***Objetivo del capítulo***

*Identificar diferencias en la expresión de genes de la isla simbiótica en cepas que contrastan en la capacidad de fijar nitrógeno.*

## **Materiales y métodos**

### *1. Oligonucleótidos.*

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se han sintetizado con *DNA Synthesizer*® 3400 (Applied Biosystem) en el servicio del instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (C.S.I.C., Granada).

<b>Primer</b>	<b>Secuencia</b>	<b>Gen</b>
<b>SL21</b>	<b>ATTGTCACCGCCATTGTA</b>	<b><i>16S rADN</i></b>
<b>SL22</b>	<b>CGTCCTTAGTTGCTACCA</b>	
<b>SL1</b>	<b>ACATCGTATGGCAAGACA</b>	<b><i>Blr0241</i></b>
<b>SL2</b>	<b>CATTCTCGCACCACCTAAC</b>	
<b>SL5</b>	<b>CTGTACTACAACCGTTATCTTG</b>	<b><i>nodW</i></b>
<b>SL6</b>	<b>GCCATCAACTGTAACCTCG</b>	
<b>SL7</b>	<b>AATTTCTGCTGGATTCTG</b>	<b><i>nopP</i></b>
<b>SL8</b>	<b>CTTCATCCGCTTCAACAG</b>	
<b>SL9</b>	<b>GTGCTGATCGAGGACTAC</b>	<b><i>nodD1</i></b>
<b>SL10</b>	<b>ATAGCCTTTCTGCGTGAG</b>	
<b>SL11</b>	<b>GGTACTATGACGGACTTGT</b>	<b><i>nodD2</i></b>
<b>SL12</b>	<b>GCAGGTTTCACGATATAGC</b>	
<b>SL13</b>	<b>TGTGGACGAAGAATGAGAA</b>	<b><i>fixj</i></b>
<b>SL14</b>	<b>AATAGACTGACGGATCATCTT</b>	
<b>SL15</b>	<b>AGAACAGGCAGTGATGAA</b>	<b><i>fixX</i></b>
<b>SL16</b>	<b>CGTCTCGCTCATTCTGAT</b>	
<b>SL17</b>	<b>GGGATGAACTCTTTACTATGA</b>	<b><i>nifA</i></b>
<b>SL18</b>	<b>CTGAGAGAATGACCCTGAA</b>	
<b>SL19</b>	<b>TGATGAACTGTTTGGAATGAG</b>	<b><i>rhcC1</i></b>
<b>SL20</b>	<b>TGTTACGAAGTCAGAAAGGA</b>	

### *2. Cepas y condiciones de cultivo*

El estudio de la expresión de genes simbióticos se realizó utilizando como molde ARN extraído de las cepas seleccionadas y analizadas en el capítulo anterior en las que se encontró que presentaron diferencias en los perfiles de restricción de los fragmentos de la isla simbiótica. Es decir que además de la cepa control E109 se incluyó un representante de cada uno de los dos patrones encontrados en el grupo de 4 cepas (163, 366, 2112 y 953). La cepa 163 fue la representante del grupo con igual perfil de restricción que la cepa control E109 y la cepa 366 como representante del otro perfil encontrado.

La expresión de genes se analizó bajo diferentes condiciones. Por un lado se estudió la expresión en cultivos bacterianos líquidos en fase exponencial y fase estacionaria de crecimiento. También se determinó la expresión de genes en bacteroides aislados de nódulos de soja a los 20 días posteriores a la inoculación de las plantas.

Además se realizó un estudio comparativo de la expresión de genes relacionados con el proceso de nodulación, en cultivos bacterianos líquidos inducidos y no inducidos con Isoflavonoides presentes en las semillas de soja y con genisteína.

### 3. Extracción de ARN total

#### 3.1. Extracción de ARN total de *B. japonicum*

Ciento cincuenta mililitros de medio se inocularon con una alícuota de 50 ml de cultivo bacteriano y se incubaron hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial, esto es  $\sim 0,6$  U de  $DO_{625nm}$ . El cultivo se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Las células sedimentadas se resuspendieron en 3 ml de una solución compuesta por 1,4 % SDS, 4 mM EDTA y 42 mg/ml proteinasa K. Se incubó durante 10 min a 65 °C, agitando a intervalos de 3 min. Pasado este tiempo, los tubos se colocaron en hielo y se adicionaron 1,5 ml de NaCl 5 M a 4 °C, se mezcló vigorosamente y se mantuvo en hielo durante 10 min. Luego, se centrifugó 15 min a 4 °C y 13000 rpm. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo y se precipitó adicionando 10 ml de etanol frío 100 %. El ARN se separó centrifugando durante 30 min a 14000 rpm y 4 °C. Se eliminaron los restos de etanol y se dejó secar a temperatura ambiente. El ARN se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua bidestilada libre de ARNasas. La digestión del ADN en las preparaciones tiene lugar por la incubación durante 1-2 horas a 37 °C de estos 50  $\mu$ l con 30 U de ADNasa I libre de ARNasas (Roche) en presencia de 35 U de inhibidor de ARNasas (GE healthcare) en el buffer adecuado (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM  $MgCl_2$ ). Transcurrido este tiempo se eliminaron las proteínas mediante dos fenolizaciones sucesivas: en la primera se añadió 1V (0,1 ml) de fenol (pH ácido), se tomó la fase superior y se mezcló con 1V de fenol. En el primer caso se centrifugó durante 10 min y en el segundo durante 5 min a 4 °C y 13000 rpm. La fase acuosa superior se precipitó adicionando 0,6 ml de etanol 100 %, 75 mM acetato sódico 3 M pH 5.2, frío. Luego se mantuvo una hora a -80 °C. Se sedimentó el ARN por centrifugación a 4 °C durante 30 min y se lavó con 0,5 ml de etanol frío al 70 % frío. El pellet se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua bidestilada.

### 3.2. Extracción de ARN total mediante kit comercial

Para extraer el ARN se utilizó el kit *RNeasy Protect Bacteria Mini Kit* (Qiagen). Con el objeto de que el transcriptoma refleje la actividad en las bacterias, las muestras se recolectaron rápidamente (1-2 min). Se centrifugó el cultivo bacteriano a 13000 rpm y el pellet celular se congeló en nitrógeno líquido. La descongelación se llevó a cabo en hielo.

Previo a la lisis, se usó 1 ml de lisozima 0,4 mg/ml (por cada tubo correspondiente a 30 ml de cultivo) que mejoró la lisis celular. Se incubó 5 min a temperatura ambiente. Para proceder con la lisis se añadieron 3,5 ml de buffer RLT con  $\beta$ -mercaptoetanol en la concentración indicada por el proveedor. Las mezclas se sonicaron mientras se mantuvieron en hielo y luego se centrifugaron 2 min para eliminar los restos celulares. Se pasó el sobrenadante a un tubo nuevo con 2,5 ml de etanol 100 % mezclando con pipeta. El sobrenadante se pasó por las columnas, centrifugando 30 segundos a 11000 rpm. Se lavaron las columnas con 700  $\mu$ l de buffer RW1. Se trataron dos veces sucesivas con 500  $\mu$ l de RPE y se llevó a cabo una última centrifugación de 2 min para eliminar el etanol de las columnas. Finalmente se eluyó el ARN en dos pasos adicionando 25  $\mu$ l de agua sobre la resina e incubando 1 min a temperatura ambiente para posteriormente centrifugar 1 min.

Para la obtención de ARN completamente libre de ADN que pueda interferir en la eficiencia de hibridación por inhibición competitiva, se realizó una digestión del ARN resultante con ADNasa (Qiagen). A los 120  $\mu$ l de ARN obtenidos se añadieron 14  $\mu$ l de buffer RDD y 6  $\mu$ l de ADNasa. Se digirió durante 1-2 horas a 28 °C. A los 140  $\mu$ l de reacción se añadieron 490  $\mu$ l de buffer RLT (con  $\beta$ -mercaptoetanol) y 350  $\mu$ l de etanol 100 %. Se mezcló pipeteando, se dispuso en las columnas y se centrifugó 30 s a 10000 rpm. Se lavó en dos ocasiones: primero con 350  $\mu$ l de RW1 y luego, con 500  $\mu$ l de RPE. Al igual que se describió anteriormente, se eliminaron los resto de soluciones de lavado mediante una centrifugación adicional de 2 min. Se eluyó en dos pasos obteniendo un volumen final de 50  $\mu$ l.

Se llevó a cabo un último paso adicional de concentración del ARN. Con este fin se utilizaron columnas Microcon 30 (Millipore).

Aunque el ARN es estable a -20 °C se conservó a -80 °C.

Se realizó la extracción de ARN tanto de cultivos líquidos (fase exponencial y estacionaria), como de macerado de nódulos de las cepas E109, 163 y 366. Posteriormente se repitió la extracción para las cepas E109, USDA110 y 366 en cultivos líquidos inducidos y sin inducir con Isoflavonoides extraídos de semillas de soja y genisteína (los cultivos controles fueron suplementados con igual volumen de metanol en el que se resuspendieron los IF).

### 3.3. Cuantificación de ADN y ARN

El cálculo de la concentración de ácidos nucleicos se estimó siguiendo el método espectrofotométrico descrito en Sambrook et al. (1989). Se determinó la absorbancia de las muestras en solución acuosa a longitudes de onda de 260 y 280 nm utilizando cubetas de cuarzo. La concentración se calculó en función de los valores estándar: 1U a  $DO_{260nm}$  se corresponde con 50  $\mu g/ml$  de ADN de cadena doble, 40  $\mu g/ml$  de ADN de cadena sencilla y ARN, y 33  $\mu g/ml$  de oligonucleótidos. La relación  $DO_{260nm}/DO_{280nm}$  se usó como estimadora de la pureza del material genético extraído. Valores de la relación por debajo de 1,8 indican contaminación por proteínas o fenol.

En otras determinaciones también se utilizó *NanoDrop® ND-1000*, un espectrofotómetro que permite la determinación de la concentración a partir de pequeños volúmenes de muestra (1  $\mu l$ ).

### 4. RT-qPCR

La RT-PCR es una variante de PCR convencional que permite cuantificar la expresión génica. A diferencia de la PCR, la inclusión en la reacción de un intercalante y la tecnología adecuada para la detección de la intensidad de fluorescencia en cada ciclo, la convierte en una herramienta cuantitativa y no solo cualitativa. La síntesis de cADN que precede la qPCR nos capacita para evaluar los niveles de un determinado ARN mensajero presente en la muestra.

En este trabajo se utilizó *AMV* reverso transcriptasa (RT) (Roche) para la síntesis de cADN y *Taq* platinum polimerasa (Invitrogen) para la amplificación. *AMV* RT es una enzima muy eficiente que además presenta un dominio ARNasa H. La importancia de esta última radica en que no amplifica el cADN sintetizado, sino que se limita a copiar el ARN presente en la muestra. Por otro lado, la particularidad de la polimerasa es que se encuentra acomplejada con un anticuerpo que impide su funcionalidad; tan pronto como

tiene lugar el primer ciclo de desnaturalización, la enzima se libera del complejo y comienza a funcionar. Este hecho reduce el fondo de reacción, factor determinante a la hora de la cuantificación.

En este trabajo se realizó una cuantificación relativa, esto es, usando un control interno a la propia muestra.

#### 4.1. Síntesis de cADN.

Se partió de una alícuota de 10  $\mu\text{g}$  de ARN total de cada cepa de *B. japonicum*. Este material se hibridizó con 50 ng de hexámeros de secuencia aleatoria en presencia de 50 mM Tris-HCl, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 30 mM KCl, 1 mM dithiothreitol, pH 8.5 y en un volumen final de 8,25  $\mu\text{l}$ . La desnaturalización completa de ARN, se obtuvo a 90 °C durante 2 min; seguidamente se incubó por períodos de 15 s a temperaturas decrecientes en 5 °C, esto es, 85 °C 15 s / 80 °C 15 s y así sucesivamente hasta alcanzar los 25 °C. En este momento, se le añadió la mezcla de extensión que contuvo dNTPs (0,625 mM cada uno), 15 U de inhibidor de ARNasas y 50 U de *AMV* RT hasta que se alcanzó un volumen final de 10  $\mu\text{l}$  y se incubó 1 h a 42 °C. Pasado este tiempo, se volvieron a añadir 50 U de la enzima y se incubó por un período adicional de 2 h. La inactivación de la transcriptasa reversa se realizó por incubación de la mezcla a 85 °C durante 15 min.

El cDNA se conservó a -20 °C.

#### 4.2. qPCR

En estos experimentos se utilizaron diferentes controles. Por un lado, se utilizaron los controles de agua para comprobar el nivel de fluorescencia basal, si es que lo hubiera. Además se incluyeron muestras incubadas sin transcriptasa reversa que serían indicativas, en caso de amplificación, de contaminación con ADN en las muestras. Finalmente, como se ha descrito previamente, la cuantificación se realizó relativa a un control, se utilizaron curvas patrón para determinar los parámetros de amplificación correspondientes a cada pareja de oligonucleótidos.

Esta reacción de qPCR contiene los componentes habituales de cualquier reacción de PCR y además incluyó un agente intercalante fluorescente como el Sybr Green. La amplificación se llevó a cabo en iCycler iQ system (Bio-Rad) controlada por el programa iQ5. Para realizar cada reacción se mezclaron 0,2 mM de cada pareja de cebadores correspondientes con un dilución 1:10 del cADN sintetizado previamente (o en su defecto

la cantidad equivalente de muestra no sometida a transcripción reversa, agua o ADN de concentración conocida) en presencia del buffer suministrado por el fabricante que contiene 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 0,1 mM dNTPs, una dilución 1:10000 de Sybr Green y 0,5 U de *Taq Platinum* polimerasa. El programa utilizado para la amplificación incluyó los siguientes pasos: 95 °C 3 min, seguido de 40 ciclos 95 °C 15 s/ 56 °C 15 s/ 72 °C 15 s, con un ciclo final de extensión a 72 °C 3 min.

Las muestras se dispusieron por triplicado. Se utilizaron placas de 96 pocillos, evitando la formación de burbujas y procurando que todo el material se encuentre en el fondo del pocillo, en caso contrario se obtendrían lecturas anómalas de la fluorescencia.

## 5. *Electroforesis*

### 5.1. *Electroforesis en geles de agarosa desnaturalizantes.*

Esta técnica se utilizó para comprobar la integridad del ARN total extraído. Consistió en la adición de formaldehído durante la preparación del gel de agarosa como agente desnaturalizante. El porcentaje de agarosa del gel fue de 1,4 % (p/v). Se preparó disolviendo la agarosa en agua, cuando se disipó el calor se añadió MOPS [4X: MOPS 80 mM, acetato sódico 20 mM y EDTA 4 mM; pH 7 ajustado con NaOH] y formaldehído hasta una concentración final de 1X y 1,875 % (v/v), respectivamente. El buffer de electroforesis fue MOPS 1X. La solución de bromuro de etidio se añadió directamente en el buffer de carga 6X [glicerol 45 % (v/v), azul de bromofenol 0,09 % (p/v) y bromuro de etidio 0,25 mg/ml].

## 6. *Extracción de proteínas extracelulares*

La extracción de proteínas extracelulares se realizó según el protocolo descrito por Hempel et al. (2009), con algunas modificaciones. Las cepas 366 y E109 fueron crecidas en 600 ml de medio de medio salino HM suplementado con L-arabinosa y Gluconato de sodio (Capítulo 2 – Materiales y métodos – apartado 3.1), a 28 °C hasta que el cultivo se encontró en fase logarítmica. Luego de 5 días de incubación, el cultivo de cada cepa fue dividido en dos partes iguales (300 ml), uno fue inducido con exudados de semillas de soja extraídos en metanol (capítulo 2 – Materiales y métodos – Apartado 7.1). A la fracción de cultivo no inducida (control), se le adicionó un volumen equivalente de metanol. Se incubaron nuevamente durante 48 hs en agitación a 150 rpm y 28 °C de temperatura.

Luego de este período las células fueron centrifugadas a 4000 g, durante 60 min a 4 °C. Los exopolisacáridos fueron removidos del sobrenadante centrifugando a 8000 g durante 30 min a 4 °C. Las proteínas secretadas se precipitaron adicionando TCA (ácido tricarbóxico) 10 % p/v e incubando durante toda la noche a 4 °C. Luego, las proteínas se separaron por centrifugación a 10000 g durante 30 min a 4 °C. El precipitado se lavó dos veces con 5 ml de acetona 80 % fría y se resuspendió en 400 µl de buffer de rehidratación (Urea 8M, CHAPS 2 % p/v y Bromofenol blue 0.01 % p/v).

Las proteínas se cuantificaron por el método de Bradford (1976) y alícuotas de 10 µl (150 µg) se sembraron y se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida 12 % (1D), utilizando el marcador de peso molecular de 10-250 kDa, Precisión Plus Protein™ Standars – BIO-RAD.

#### *7. Ensayo de deformación de pelos radiculares*

Semillas de soja se esterilizaron superficialmente tal cual se describió en materiales y métodos del capítulo 2, se pregerminaron en placa de Petri, con 20 ml de agar agua al 1,5 %, y se incubaron en oscuridad a temperatura ambiente. Después de 4-6 días, se seleccionaron las semillas con raíces principales de 2 cm de largo. Las semillas germinadas se colocaron en viales de 3 ml de solución nutritiva. Los tratamientos consistieron en el agregado de los extractos de proteínas extracelulares (150 µg) de cultivos de E109 y 366 no inducidos (control) e inducidos con exudados de semillas de soja, resuspendidos en agua destilada estéril.

Luego de 4 y 6 hs las raíces se tiñeron con azul de metileno al 0,1 % p/v filtrado, se lavaron y se observaron por microscopía invertida.

#### *8. Geles 2D SDS-PAGE.*

Los extractos de proteínas extracelulares de cultivos de E109 y 366, inducidos y sin inducir con Isoflavonoides fueron analizados en geles de 2D.

La electroforesis en 2D se realizó según el protocolo sugerido por Mooney & Thelen (2004). Para la separación en la primera dimensión, se utilizaron tiras IPG de 13 cm con rango de pH lineal entre 3 y 10 o 4 y 7 (GE Healthcare Amersham Bioscience, Little Chalfont, UK), que fueron rehidratadas con 100 µg de proteínas resuspendidas en 250 µl de buffer de isoelectroenfoco (7 M urea, 2 M thiourea, 4 % (p/v) CHAPS, 0.5 %

(v/v) IPG buffer, 1 % (p/v) DTT). El isoelectroenfoque (IEF) fue corrido en Bio-Rad protein IEF cell y consistió en 4 pasos: 300 V por 1 h, 600 V por 1 h, 1,000 V por 1 h, y 8,000 V por 6 h. Para la segunda dimensión, las proteínas fueron separadas en geles 15 % de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Las proteínas fueron visualizadas por tinción coloidal con Coomassie Brilliant Blue G-250.

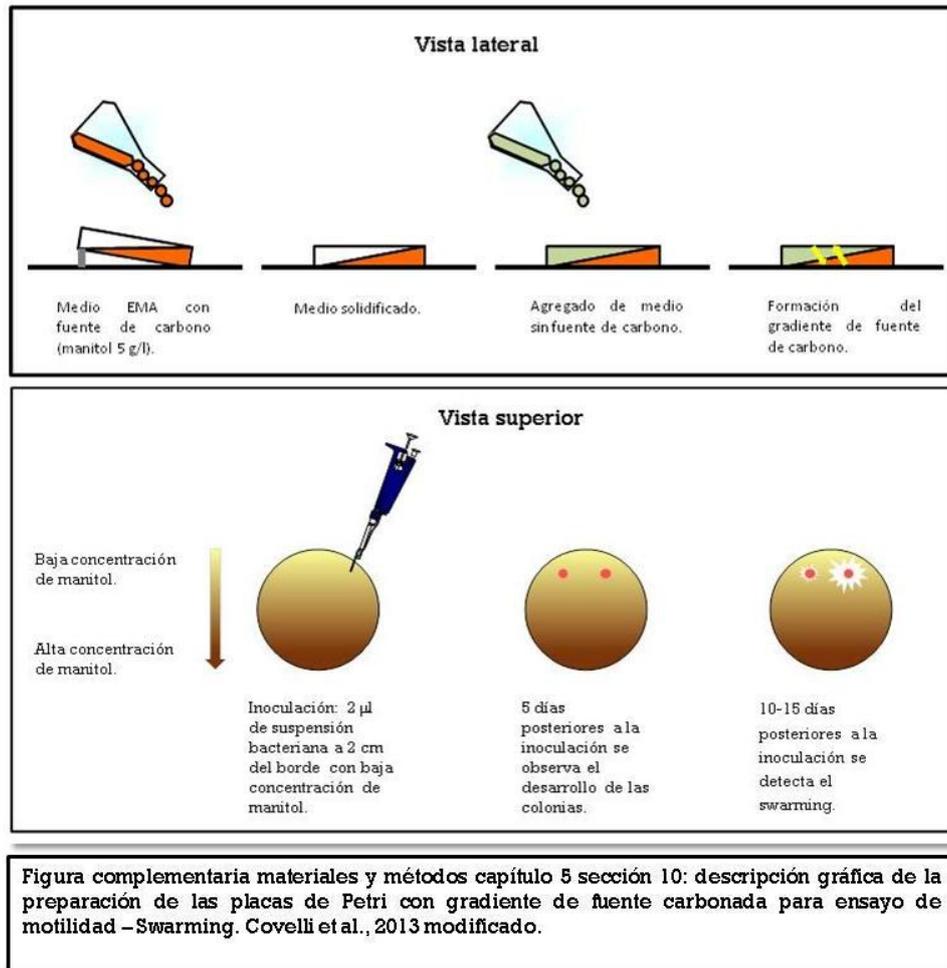
El análisis de las imágenes se realizó con ImageMaster™ 2D Platinum versión 5.0 (GE Healthcare Amersham Bioscience). Para el análisis posterior se consideraron aquellas manchas con importantes cambios cuantitativos (más de dos veces en la abundancia) y cambios reproducibles en tres repeticiones.

#### 9. Identificación de los polipéptidos: digestión trípica y MALDI TOF

La identificación por digestión trípica y MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionisation time of flight mass spectrometer*), fue realizada por el Centro de Estudios Químicos y Biológicos por Espectrometría MALDI-TOF (Cequibiem), Departamento de química biológica – Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – UBA.

#### 10. Ensayos de motilidad – Swarming

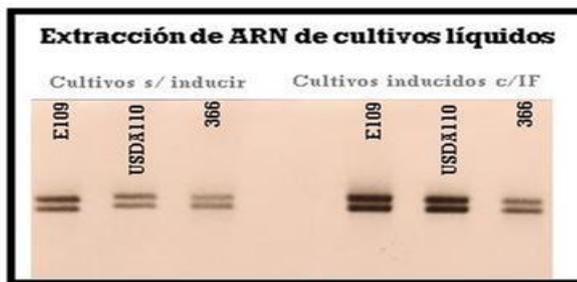
Se prepararon placas con medio de cultivo semisólido con 0,5 % (p/v) de agar. En las placas con medio semisólido se generó un gradiente de fuente de carbono de la manera que se representa en la figura complementaria a continuación (Covelli et al., 2013). Las placas de Petri se elevaron 0,5 cm en un lado, generando un plano inclinado en el que se vertieron 20 ml de medio EMA (suplementado con rojo congo) con manitol en una concentración de 5 g. El medio se solidificó al aire durante 15 minutos en flujo laminar. Las placas se nivelaron con el agregado adicional de 20 ml de medio EMA sin fuente de carbono (manitol). Después de la solidificación del medio de cultivo, las placas se incubaron durante 24 h a 28 °C antes de la inoculación. Las cepas a ensayar (E109 y 366) se cultivaron en medio AG líquido sin antibióticos a 28 °C, hasta alcanzar una  $DO_{625nm}$  de 1,5 (fase logarítmica tardía). Una alícuota de 2  $\mu$ l de los cultivo se inocularon a 2 cm del borde de la placa, en el extremo en que la concentración de fuente de carbono es menor y se secaron al aire en el flujo laminar. Las placas inoculadas se incubaron durante 7-10 días a 28 °C.



## Resultados

### Expresión génica - Extracción de ARN

La integridad del ARN de las extracciones desde cultivos y nódulos, se comprobó realizando una electroforesis en geles de agarosa. Luego, el ARN se cuantificó utilizando *NanoDrop® ND-1000*. En la figura 5-1 se muestra uno de los geles realizados.



**Figura 5- 1:** gel de agarosa desnaturalizante para verificar integridad de ARN de cultivos de las cepas E109, USDA110 y 366, inducidos y sin inducir con isoflavonoides. En cada calle se sembró una alícuota de 1  $\mu$ l de la suspensión de ARN.

### Fase estacionaria y exponencial de crecimiento

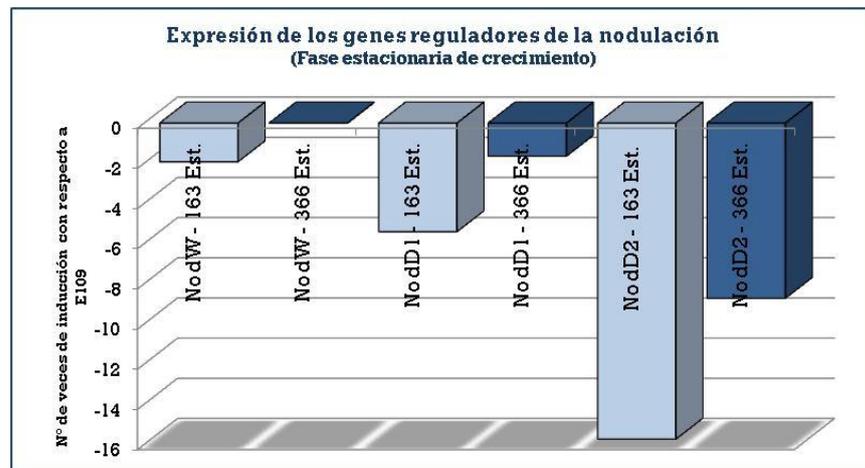
Se analizó la expresión de los genes *nifA*, *fixL*, *nodW*, *nodD1*, *nodD2*, *rhcC1*, *nopP*, *blr0241* y *fixX* en cultivos líquidos. En estos estudios de expresión se analizaron principalmente genes reguladores y estructurales claves del sistema de fijación de nitrógeno de *Bradyrhizobium japonicum*.

Los resultados del análisis de expresión de estos genes tanto en fase exponencial como en fase estacionaria de crecimiento de los cultivos de E109, 163 y 366, mostraron que si bien todos se expresan en las tres cepas en las diferentes condiciones, los niveles de expresión son, en general, superiores en la cepa E109.

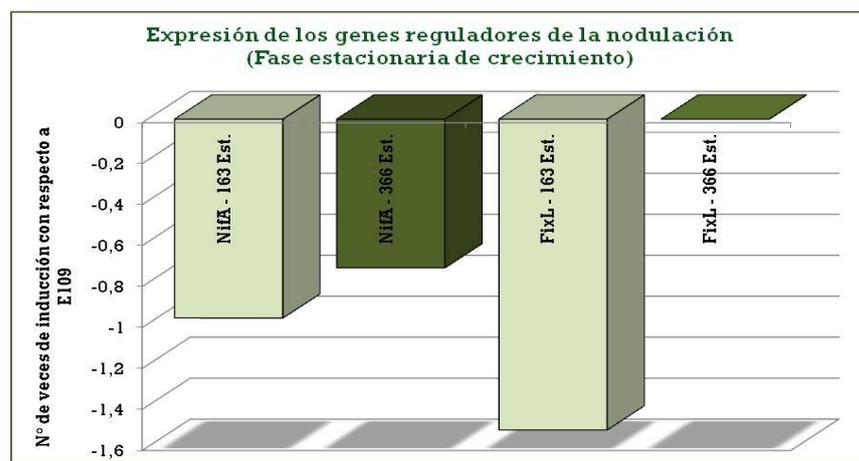
Los genes *nodW*, *nodD1* y *nodD2*, son reguladores específicos del proceso de nodulación y se observa que presentan niveles bajos de expresión en los cultivos independientemente de la fase de crecimiento en la que se encuentra el cultivo (Figura 5-2). Los genes *nifA* y *fixL* que pertenecen a las cascadas de regulación de los genes de fijación de nitrógeno, mostraron el mismo resultado, es decir presentaron menores niveles de expresión en los aislados de suelo en relación a la cepa E109 en ambas etapas

de cultivo líquido (Figura 5-3). Es interesante destacar que la reducción en el nivel de expresión con respecto a E109 es más marcada para la cepa 163.

En la figura 5-2 se presentan los resultados de expresión y se muestra que los genes reguladores *nodD1*, *nodD2* y *nodW* se expresan con menor intensidad (represión) en la cepa 163 que en la cepa 366. Vale la pena resaltar que estos valores están referenciados a los niveles de expresión de estos genes en la cepa control E109.



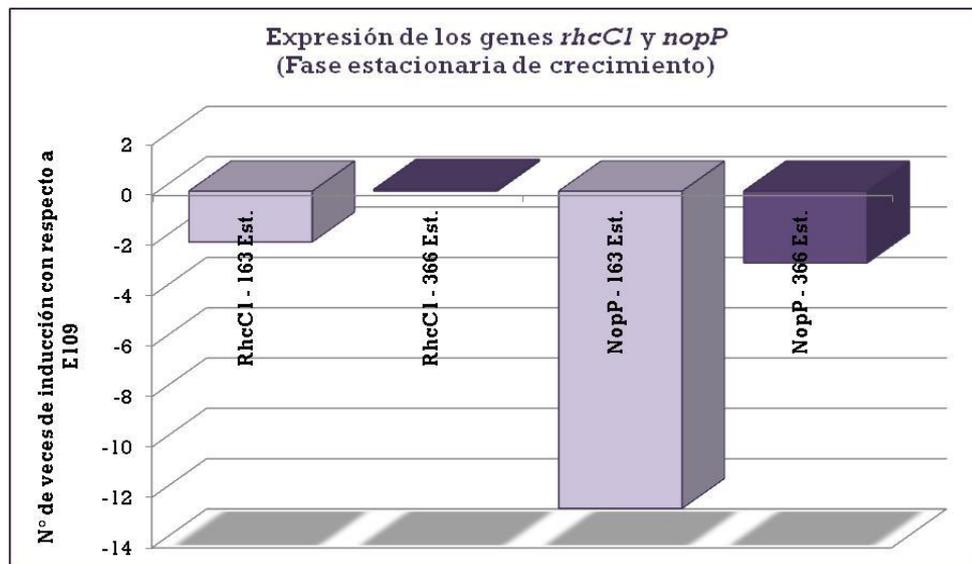
**Figura 5- 2:** Niveles de expresión de los genes *nodW*, *nodD1* y *nodD2* en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.



**Figura 5- 3:** Niveles de expresión de los genes *nifA*, y *fixL* en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.

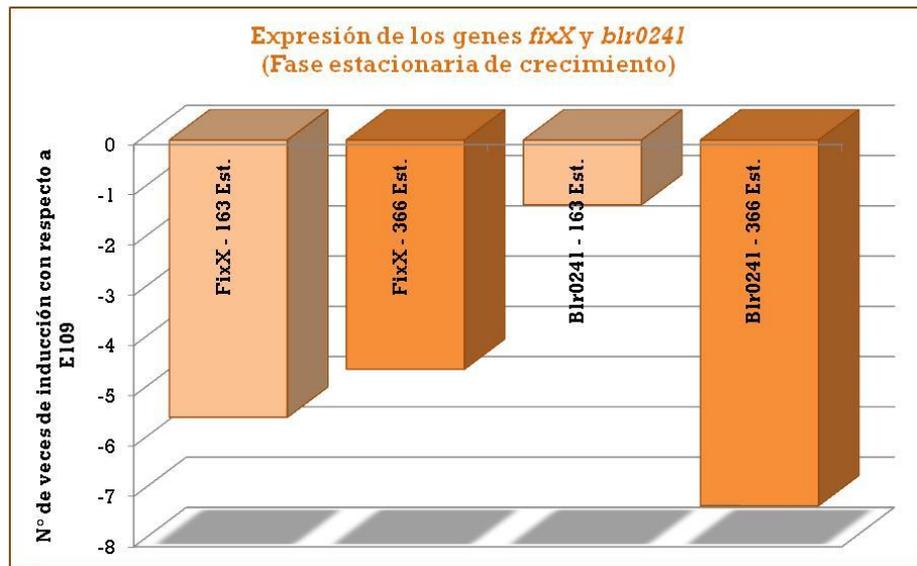
Además de los genes reguladores, se analizó el nivel de expresión de un gen estructural del sistema de transporte tipo III *rhcCl* y de una de las proteínas excretadas *nopP*. Se observó que los niveles de expresión del gen estructural del sistema ocurren en niveles similares en E109, el aislado 163 y el 366 (Figura 5-4). Esto de alguna manera indica que el sistema de transporte se encuentra presente en las tres cepas, tal cual es de esperar con este sistema que cumple un rol clave. En contraposición con esto se observaron diferencias en el nivel de expresión de *nopP*, que fue mayor en el aislado 366 que en la cepa 163, siempre comparando a estas dos cepas con la cepa control E109.

En el estudio estructural de los genes simbióticos se encontraron diferencias en la secuencia del gen *nopP* de 366 que presentó algunas diferencias con respecto a la secuencia de E109 (y 163) (Capítulo 3 de esta tesis). Por eso se consideró relevante estudiar si estas modificaciones se tradujeron en cambios en la expresión de este gen, o si esto podía estar indicando diferencias a nivel del SSTT de *B. japonicum* por medio del cual se secretan las proteínas Nop. Los estudios de expresión mostraron, que en la fase estacionaria como exponencial de crecimiento de los cultivos, la expresión de los genes *nopP* y *rhcCl* está reprimida con respecto a E109, en niveles aún superiores para la cepa 163 (Figura 5-4).



**Figura 5- 4:** Niveles de expresión de los genes *rhcCl* y *nopP* en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.

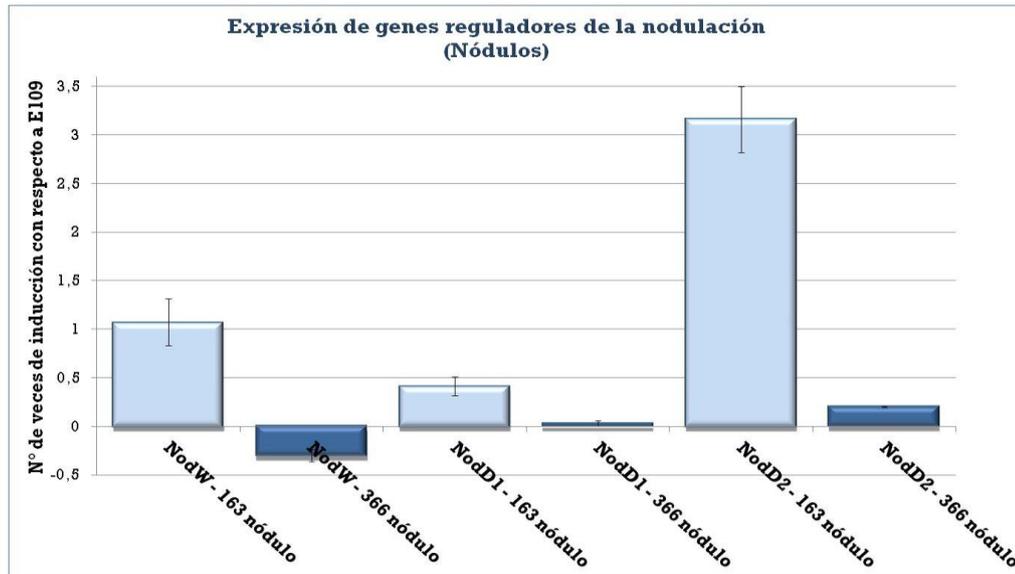
En cuanto al gen *blr0241*, que codifica una proteína con actividad ACC deaminasa, los resultados que se presentan en la figura 5-6 muestran claramente que en el aislado 163 este gen se expresa en niveles superiores a la cepa 366, lo cual podría explicar al menos en parte el fenotipo de nodulación de estos dos aislados (Figura 5-5).



**Figura 5- 5:** Niveles de expresión de los genes *fixX* y *blr0241* en cultivos de fase estacionaria de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.

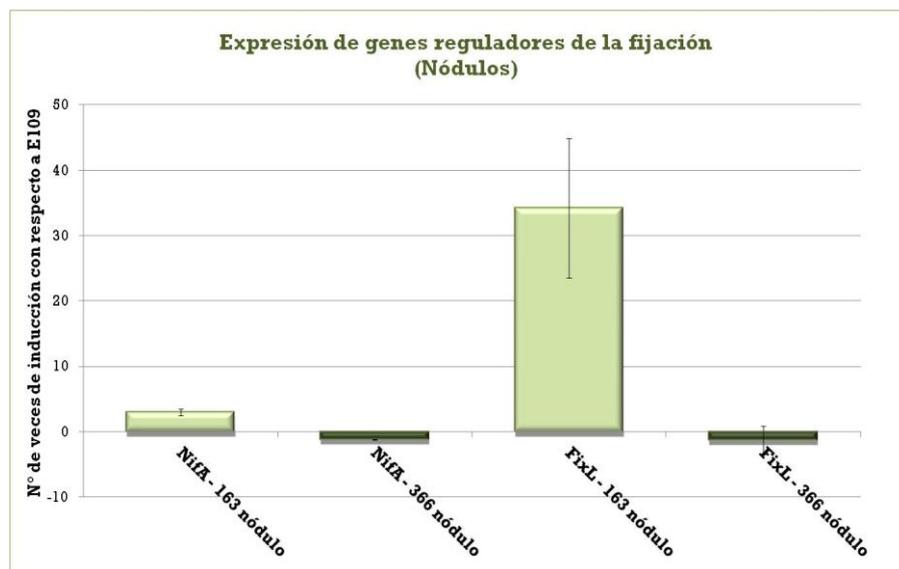
### Nódulo

En la figura 5-6 se presentan los resultados del análisis de los genes *nodW*, *nodD1* y *nodD2* en los bacteroides de E109 y la cepa 366. Es claro que en el aislado 163 todos los genes regulatorios evaluados, *nodD1*, *nodD2* y *nodW* se expresaron en niveles superiores que en los nódulos de la cepa 366, siempre considerando como base de la comparación la expresión de estos genes en la cepa control E109. Aún así se destaca el nivel de expresión del gen *nodD2* que en la cepa 163 es hasta tres veces superior a lo que se observó en E109 y el aislado 366.



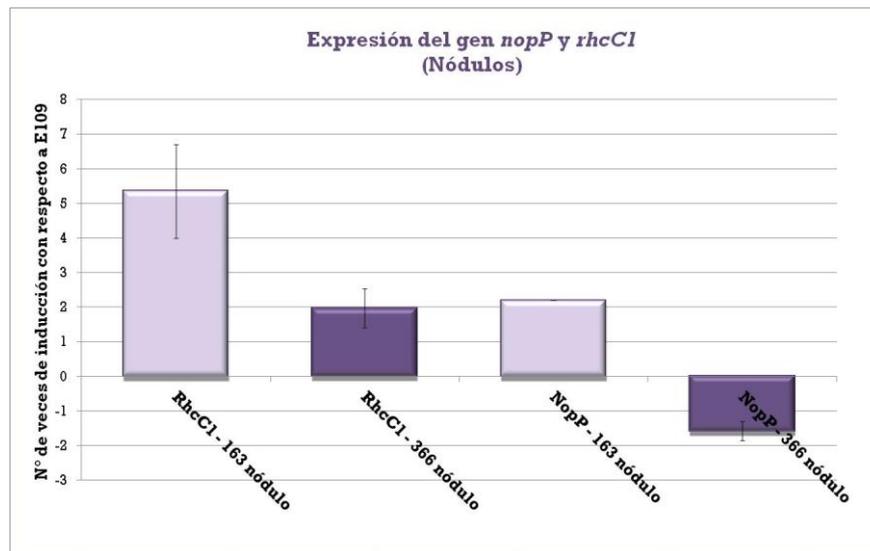
**Figura 5- 6:** Niveles de expresión de los genes *nodW*, *nodD1* y *nodD2* en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.

En cuanto a los genes que regulan la expresión de los operones que codifican a las proteínas involucradas en la fijación de nitrógeno, esto es *nifA* y *fixL* se encontró que la expresión en la cepa 163 fue superior a los niveles de expresión observados en la cepa control E109 y el aislado 366 (Figura 5-7).



**Figura 5- 7:** Niveles de expresión de los genes *nifA*, y *fixL* en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.

En los nódulos también se analizó la expresión de *nopP* y *rhcC1*. En la figura 5-8 se observa que *rhcC1* se expresa en niveles superiores a lo observado en los nódulos de plantas inoculadas con E109, esto podría sugerir que el sistema de transporte tipo III se encuentra presente en los tres aislados y quizás en los aislados naturalizados podría dar indicios de un sistema de transporte más activo, si bien el fenotipo biológico de la diferencia de expresión no está claro. Sin embargo, no se observó menor nivel de expresión de *nopP* en 163 respecto de E109. Esto no fue lo mismo en el caso de los nódulos desarrollados por 366 cuya expresión fue reprimida si se compara con el nivel de expresión observado en los nódulos con E109.

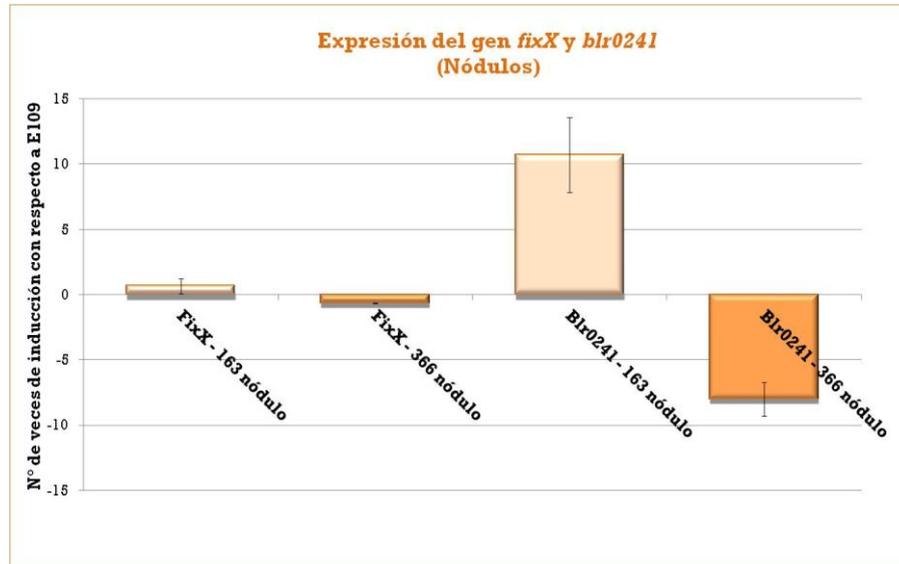


**Figura 5- 8:** Niveles de expresión de los genes *rhcC1* y *nopP* en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.

El gen *fixX*, codifica una proteína putativa para el transporte de electrones que es homóloga a la ferredoxina, por lo cual seguramente es esencial para la fijación simbiótica. La expresión de este gen en los nódulos de plantas inoculadas con las cepas 163, 366 y E109 fue similar (Figura 5-9).

Por otro lado se determinó también el nivel de expresión de *blr 0241*, gen que codifica una proteína con actividad ACC deaminasa. Se observó que mientras este gen se expresó en el aislado 163, en niveles hasta diez veces por encima de los que sucede con

E109; en el aislado 366 su expresión está reducida, es decir fue reprimida marcadamente (Figura 5-9).



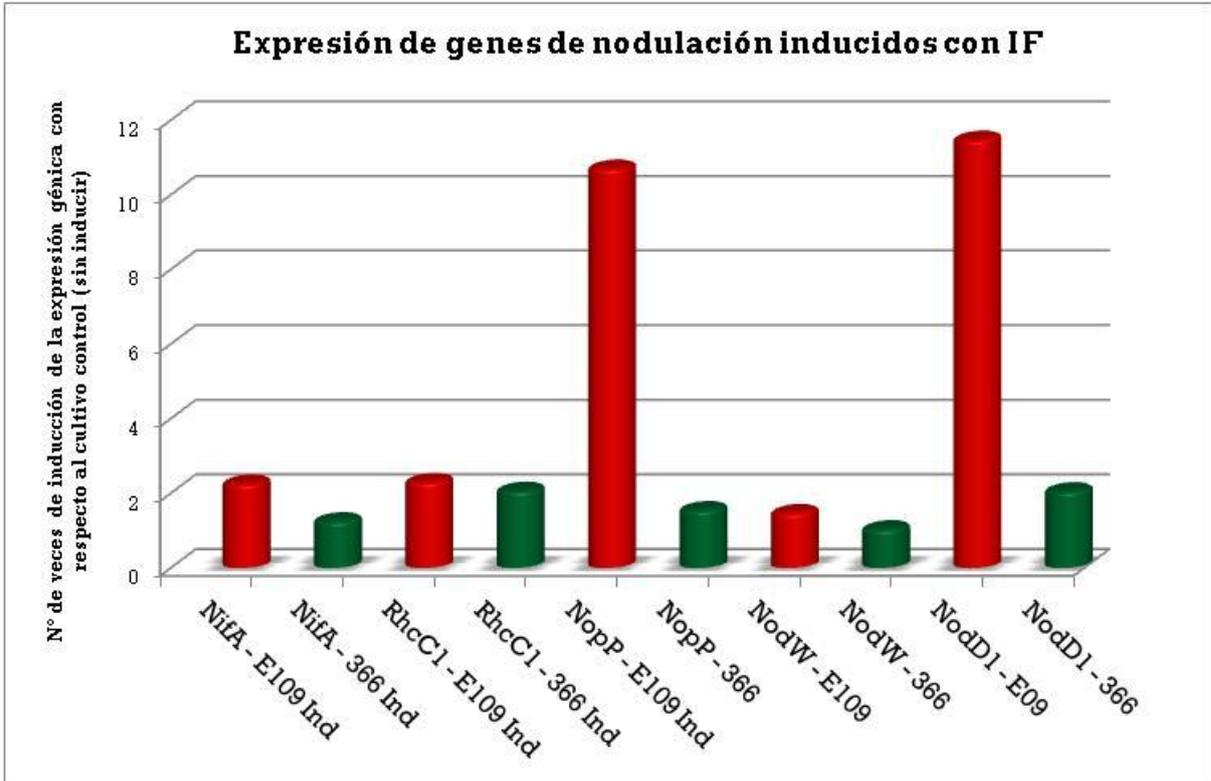
**Figura 5- 9:** Niveles de expresión de los genes *fixX* y *blr0241* en nódulos de las cepas 163 y 366, en referencia a la cepa control E109.

#### Cultivos inducidos con exudados de semilla

Se procedió a estudiar la expresión de estos mismos genes en cultivos bacterianos inducidos con isoflavonoides presentes en los exudados de la semilla de soja, entre los que se identificó como uno de los más importantes a la genisteína (Graham, 1991). Para esto se adicionaron, a cultivos líquidos de E109 y 366, exudados de semilla estériles contrastándose estos resultados con los de los cultivos no inducidos. Todos los genes estudiados reflejaron una mayor inducción en la cepa E109 que en 366 cuando los cultivos fueron suplementados con exudados de semilla.

La inducción de los cultivos de *B. japonicum* E109 y 366 con los exudados de semilla (Figura 5-10) mostró que sobre el total de genes analizados que fueron *nifA*, *rhcC1*, *nopP*, *nodW* y *nodD1*, aumentaron considerablemente su nivel de expresión con los exudados los genes *nopP* y *nodD1*. Es destacar que estos genes mostraron niveles de inducción de hasta 10 veces superiores en la cepa control E109. Es más, todos los genes estudiados mostraron mayor nivel de expresión en la cepa E109 que en el aislado 366.

Cuando los cultivos se indujeron con genisteína la expresión de cada uno de los genes estudiados fue similar a lo observado cuando los cultivos se indujeron con los exudados de semilla (IF), lo cual no hace más que confirmar lo resultados obtenidos.



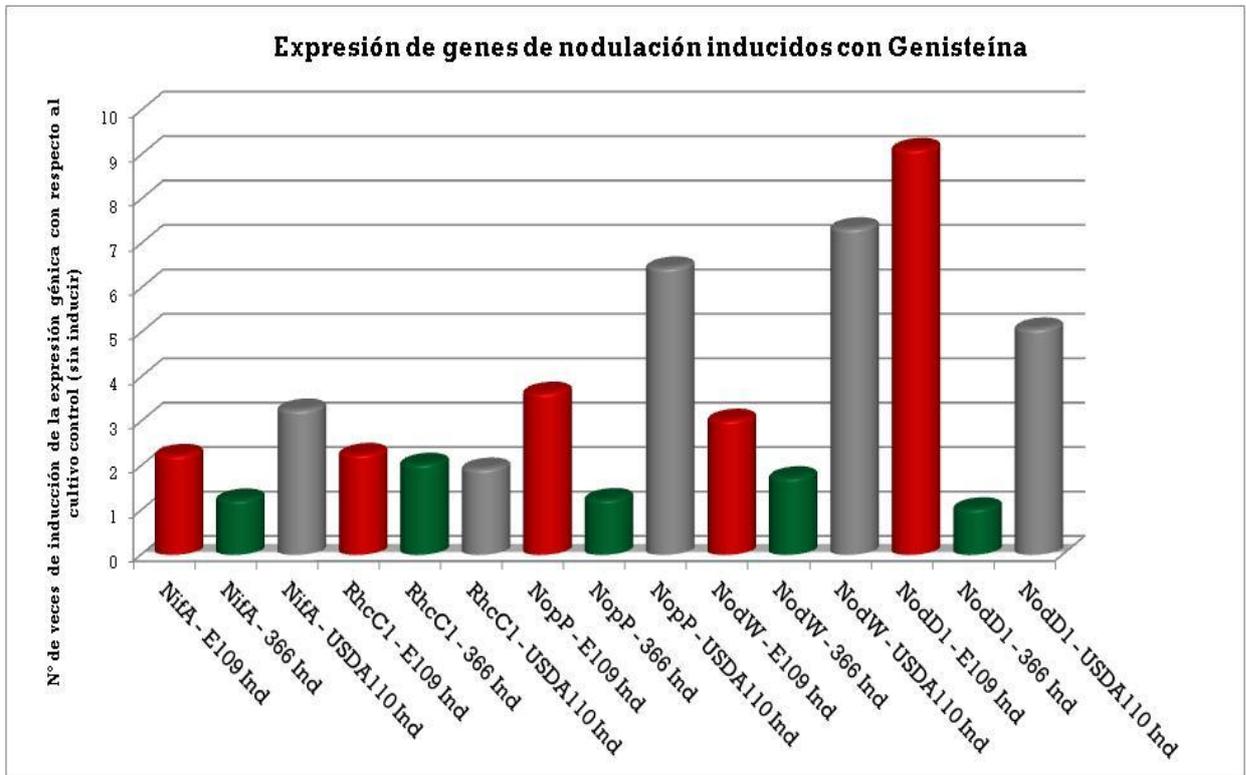
**Figura 5- 10:** Niveles de expresión de los genes *nifA*, *rhcC1*, *nopP*, *nodW* y *nodD1* en cultivos líquidos de las cepas 366 y E109 inducidos con exudados de semillas de soja, en referencia a los cultivos sin inducir.

#### *Cultivos inducidos con genisteína pura*

Como la genisteína es el isoflavonoide más abundante en los exudados de semillas de soja (Kosslak et al., 1987; Rao & Cooper, 1995), se consideró que la inducción con genisteína debería mostrar una modificación similar en los niveles de expresión de estos genes, dato que ya ha sido aportado por otros autores que inducen con genisteína y exudados de semillas. En este caso se incluyó además la cepa USDA110 para comparar los patrones de inducción de la expresión de estos genes (Figura 5-11).

El análisis de la expresión de genes en la cepa USDA110 inducida con genisteína mostró que los niveles de inducción fueron superiores a los observados para la cepa E109 excepto en la expresión del gen *nodD1*.

Al comparar los resultados de las cepas E109 y 366, se observó que la inducción con genisteína o con exudados de semillas modifica de manera similar la expresión de los genes *nifA* y *rhcC1*; sin embargo, *nopP* y *nodD1* alcanzan mayores niveles de inducción con exudados de semilla y *nodW* se expresa a niveles mayores cuando se induce con genisteína (Figura 5-10 y Figura 5-11).

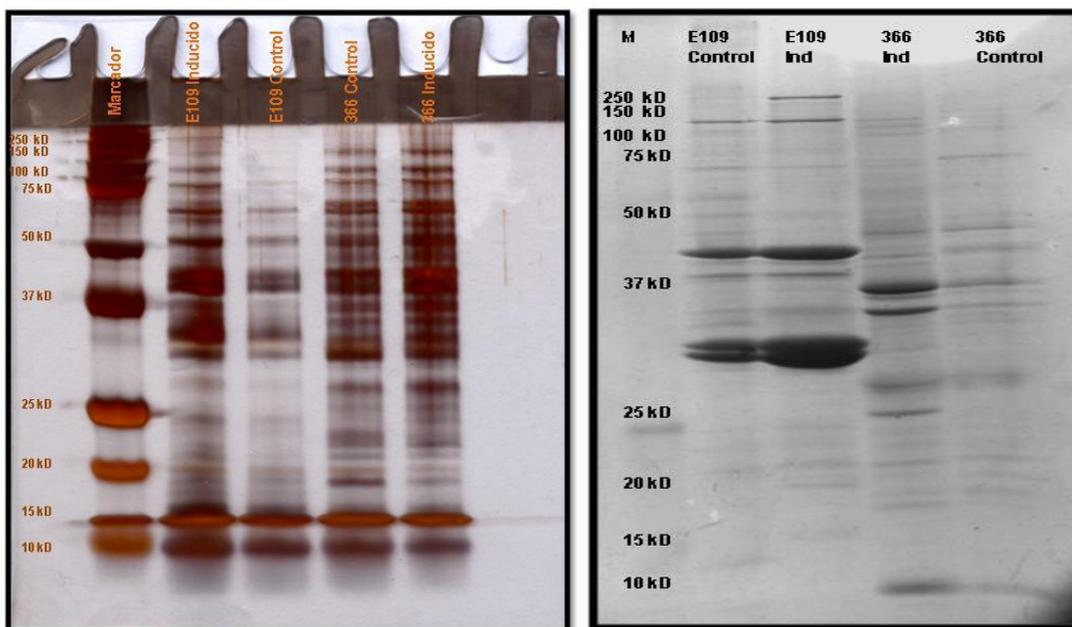


**Figura 5- 11:** Niveles de expresión de los genes *nifA*, *rhcC1*, *nopP*, *nodW* y *nodD1* en cultivos líquidos de las cepas 366, E109 y USDA 110 inducidos con genisteína, en referencia a los cultivos sin inducir.

### Extracción de proteínas extracelulares (PEC)

En las figuras 5-12 y 5-13 se muestra la electroforesis de proteínas extracelulares presentes en el medio de cultivo de las cepas E109 y 366 (cultivos inducidos y sin inducir). Es posible observar que *Bradyrhizobium* secretó un patrón complejo de proteínas que no se puede resolver en un gel de una dimensión. Aún en estos geles, se observan diferencias en los perfiles de bandas de proteínas de las cepas.

Sin embargo, cuando los cultivos fueron previamente inducidos con exudados de semillas en los que se encuentran presentes los flavonoides inductores de los genes *nod*, no se observó la síntesis de nuevas proteínas o una mayor acumulación de las mismas (al menos con la resolución que se obtiene en un gel de 1D). Las diferencias observadas en las intensidades de las bandas se corresponden con una mayor concentración en el extracto de proteínas sembradas en el gel, por lo que la intensidad de las bandas de proteínas en los cultivos inducidos fue mayor.



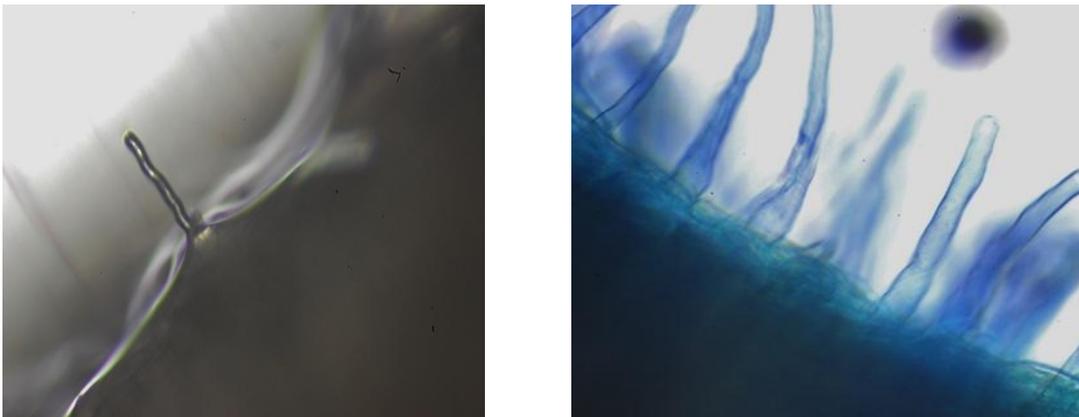
**Figura 5- 12:** Electroforesis de proteínas extracelulares de E109 y 366, extraídas de cultivos controles e inducidos con exudados de semillas de soja. La imagen de la izquierda corresponde a la tinción con plata y la imagen de la derecha corresponde a una repetición del gel teñido con Coomassie brillant blue.

Estos mismos extractos, luego de la cuantificación por el método de Bradford, fueron utilizados posteriormente en el ensayo de enrulamiento de los pelos radiculares de semillas de soja pregerminadas y se analizaron en geles de 2D para mayor resolución.

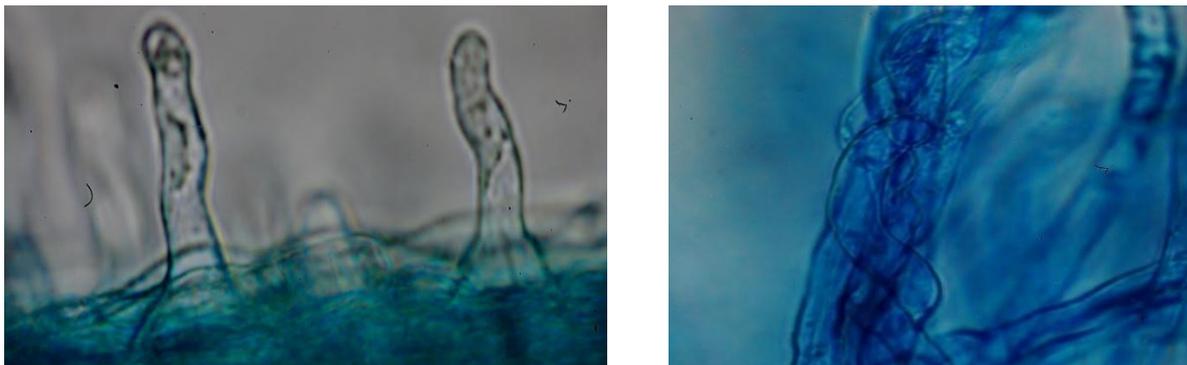
#### *Ensayo de enrulamiento de pelos radiculares*

Con el fin de analizar el rol de las proteínas extracelulares (PEC), se planteó un experimento en el que se analizó la morfología de los pelos radiculares en raíces tratadas con el extracto proteico extracelular, usando como control raíces tratadas con agua destilada estéril (Figura 5-13). Se observó que todos los tratamientos con PEC provocaron el enrulamiento del pelo radicular luego de las 6 hs de incubación. Además, se observó una mayor cantidad de pelos radiculares enrulados en las raíces tratadas con extractos de proteínas de las cepas previamente inducidas con exudados de semilla de soja (flavonoides) (Figura 5-14).

El enrulamiento de los pelos se observó desde las 4 hs de incubación cuando los cultivos bacterianos habían sido tratados previamente con extractos de semillas de soja.



**Figura 5- 13:** Imagen de la observación microscópica de pelos radiculares tratados con agua destilada estéril.

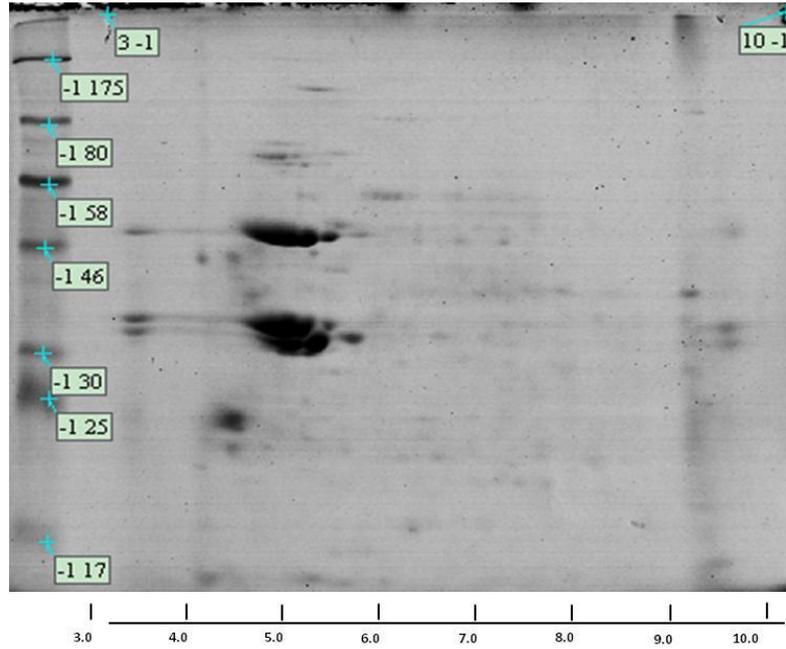


**Figura 5- 14:** Imagen de la observación microscópica de pelos radiculares tratados con extractos de proteínas extracelulares de E109 y 366 inducidos con exudados de semillas de soja. Se observa el comienzo del proceso de enrulamiento del pelo radicular.

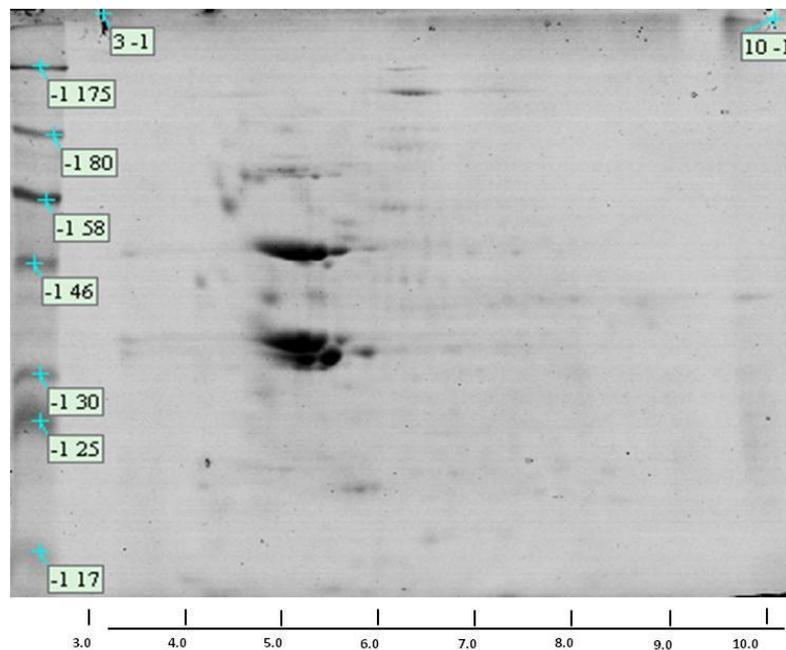
#### *Proteínas extracelulares – Geles 2D*

Los perfiles de proteínas de los geles 2D corresponden a los extractos de proteínas extracelulares de cultivos líquidos inducidos (Figura 5-16 y 5-18) y sin inducir (Figura 5-15 y 5-17) con IF de las cepas E109 y 366.

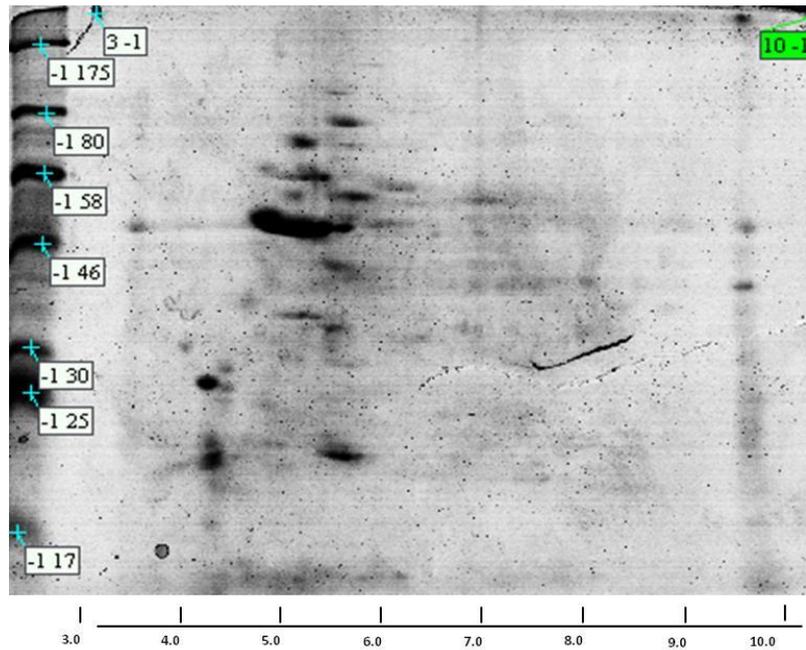
En principio se consideraron los cambios en la expresión de las proteínas secretadas ante la inducción de los cultivos adicionando exudados de semillas (IF) en el medio (Figura 5-16 y 5-18). Se observó que, tanto para la cepa control E109 (Figura 5-16) como para el aislado de suelo 366 (Figura 5-18), la adición de IF provocó una reducción de las proteínas secretadas como puede verse en las figuras 5-16 y 5-18, donde la mayoría de las proteínas aparecen como bandas de menor intensidad. Es importante destacar que, si bien los aislados 366 y E109 comparten algunas bandas, los perfiles de ambas son diferentes.



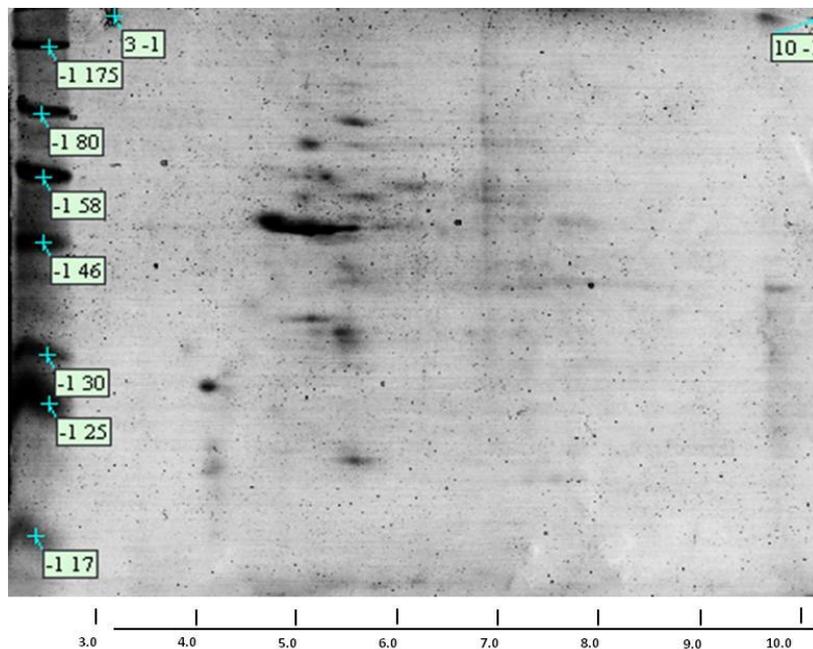
**Figura 5- 15:** Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de E109. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen.



**Figura 5- 16:** Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de E109 inducido con isoflavonoides. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen.



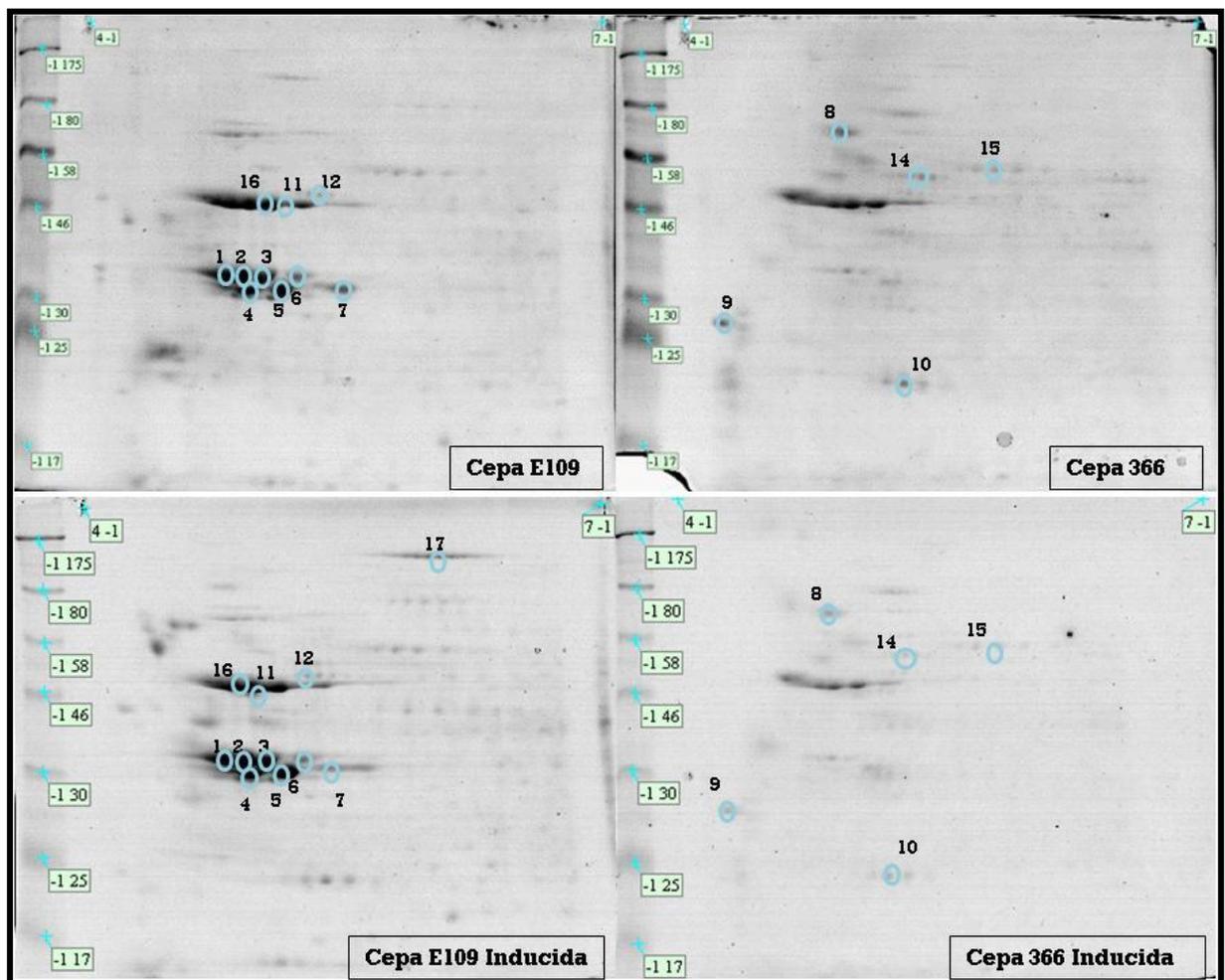
**Figura 5- 17:** Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de 366. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen.



**Figura 5- 18:** Proteínas extracelulares extraídas del cultivo líquido de 366 inducido con isoflavonoides. Imagen de gel 2D. El rango de pH (3-10) se indica en la parte inferior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de la imagen.

En la comparación de los perfiles proteicos de los dos aislados sin inducir se observó que gran cantidad de las proteínas extracelulares tienen valores de puntos isoeléctricos (pI) en el rango de pH 4 a pH 7. Por esta razón y considerando que las diferencias más importantes que se observaron corresponden a la comparación de los perfiles de las dos cepas se repitió la separación de los extractos de proteínas amplificando la zona comprendida en el rango de pH de 4-7 en el IEF.

En este caso se analizaron los perfiles de proteínas extracelulares de los cultivos, en nuevas corridas de geles de 2D con un IEF en el rango de pH 4-7 (Figura 5-19). A partir de las diferencias encontradas en los perfiles proteicos de ambas cepas, se seleccionaron 17 spots para identificar mediante MALDI TOF.



**Figura 5- 19:** Gel 2D de proteínas extracelulares de E109 (Izquierda) y 366 (Derecha). El rango de pH (4-7) se indica en la parte superior de la imagen y las posiciones del marcador de peso molecular (kDa) se indican a la izquierda de cada imagen.

En la tabla que sigue a continuación se detallan los pesos moleculares (MW) y los puntos isoeléctricos (pI) de las proteínas identificadas en cada gel de las cepas sin inducir. Se identificaron con el mismo número de spot las proteínas homólogas en cada cepa (sombreadas con el mismo color). En el rango de pI de 4-7 se identificaron 51 spots para la cepa E109 y 37 para la cepa 366. De las 51 proteínas reveladas para la cepa control E109 en el rango de puntos isoeléctricos 4-7, solo 15 forman parte de las 37 observadas para la cepa 366 en el mismo rango de pI.

N° Spot	Gel	pI	MW	N° Spot	Gel	pI	MW
<b>1</b>	<b>E109</b>	<b>4,78808</b>	<b>33</b>	<b>8</b>	<b>366</b>	<b>4,92282</b>	<b>68</b>
<b>2</b>	<b>E109</b>	<b>4,89735</b>	<b>32</b>	9	366	4,2183	27
<b>3</b>	<b>E109</b>	<b>4,99007</b>	<b>32</b>	10	366	5,28666	21
4	E109	4,93377	31	14	366	5,38919	53
5	E109	5,12583	30	<b>15</b>	<b>366</b>	<b>5,81588</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>E109</b>	<b>5,21192</b>	<b>33</b>	59	366	5,27674	77
7	E109	5,49007	31	60	366	5,31643	76
<b>11</b>	<b>E109</b>	<b>5,06291</b>	<b>46</b>	<b>28</b>	<b>366</b>	<b>5,35943</b>	<b>77</b>
<b>12</b>	<b>E109</b>	<b>5,28477</b>	<b>49</b>	62	366	5,06174	57
13	E109	4,42384	23	63	366	4,90298	53
<b>16</b>	<b>E109</b>	<b>4,94371</b>	<b>46</b>	64	366	5,32304	53
17	E109	5,15894	114	65	366	5,45535	53
18	E109	5,2053	113	66	366	5,71003	55
19	E109	5,2649	113	<b>31</b>	<b>366</b>	<b>5,94818</b>	<b>55</b>
20	E109	5,80795	79	68	366	6,11356	55
21	E109	5,92715	79	69	366	6,61963	52
22	E109	6,07947	78	70	366	4,63175	49
23	E109	6,25828	78	<b>35</b>	<b>366</b>	<b>4,87652</b>	<b>47</b>
24	E109	4,80132	65	<b>16</b>	<b>366</b>	<b>4,98567</b>	<b>46</b>
25	E109	4,86755	65	73	366	5,08159	47
<b>8</b>	<b>E109</b>	<b>4,97351</b>	<b>65</b>	<b>11</b>	<b>366</b>	<b>5,14443</b>	<b>47</b>
27	E109	5,06954	65	<b>12</b>	<b>366</b>	<b>5,31643</b>	<b>49</b>
<b>28</b>	<b>E109</b>	<b>5,33444</b>	<b>66</b>	<b>37</b>	<b>366</b>	<b>5,38258</b>	<b>49</b>
<b>15</b>	<b>E109</b>	<b>5,79139</b>	<b>53</b>	<b>36</b>	<b>366</b>	<b>5,37596</b>	<b>47</b>
<b>31</b>	<b>E109</b>	<b>5,92715</b>	<b>53</b>	<b>39</b>	<b>366</b>	<b>5,6968</b>	<b>48</b>
32	E109	6,09603	53	79	366	5,81588	48
33	E109	4,06291	48	80	366	5,21389	41
34	E109	4,68556	48	81	366	5,27012	41
<b>35</b>	<b>E109</b>	<b>4,7947</b>	<b>46</b>	<b>1</b>	<b>366</b>	<b>4,87321</b>	<b>34</b>
<b>36</b>	<b>E109</b>	<b>5,24172</b>	<b>46</b>	<b>2</b>	<b>366</b>	<b>4,95921</b>	<b>34</b>
<b>37</b>	<b>E109</b>	<b>5,34768</b>	<b>48</b>	<b>3</b>	<b>366</b>	<b>5,04851</b>	<b>34</b>
38	E109	5,41391	48	85	366	5,17089	32
<b>39</b>	<b>E109</b>	<b>5,55298</b>	<b>46</b>	<b>6</b>	<b>366</b>	<b>5,25358</b>	<b>32</b>
40	E109	4,22848	43	87	366	4,92944	30
41	E109	4,32119	41	88	366	4,28115	21
42	E109	4,46689	43	89	366	5,18412	21
43	E109	4,06954	34	90	366	5,39581	21
44	E109	4,06623	32				
45	E109	4,68543	33				
46	E109	5,05298	33				
47	E109	5,33775	31				
48	E109	5,42715	31				
49	E109	4,79139	31				
50	E109	4,99338	30				
51	E109	5,0596	30				
52	E109	4,85099	30				
53	E109	4,49669	23				
54	E109	4,5298	23				
55	E109	4,4702	21				
56	E109	4,73841	21				
58	E109	4,19536	20				

*Identificación de los polipéptidos mediante digestión trípica y MALDI TOF*

Se seleccionaron los spots numerados según se indica en la tabla, los que se marcaron en la figura 5-19 de los geles 2D correspondientes a las proteínas extracelulares, para su identificación por MALDI-TOF. Los spots 1, 2, 3, 6, 11, 12 y 16 si bien se observan en las dos cepas, tienen mayor intensidad en el gel correspondiente a E109 (inducido y sin inducir) y los spots 4, 5, 7 y 17 solo están presentes en E109. De manera análoga se observan con mayor intensidad los spots 8 y 15 en el gel correspondiente a 366 con respecto a E109 y los spots 9, 10 y 14 solo están presentes en 366.

N° Spot	pI	MW	Muestra
1	4,80562	32	E109
2	4,92022	32	E109
3	5,03146	32	E109
4	4,94045	30	E109
5	5,16629	30	E109
6	5,2573	32	E109
7	5,42921	30	E109
8	4,86577	67	366
9	4,27181	28	366
10	5,18456	23	366
11	4,97416	47	E109
12	5,28764	49	E109
14	5,27517	53	366
15	5,8255	55	366
16	4,86292	47	E109
17	5,99551	120	E109

No fue posible obtener resultados de la identificación de las proteínas por MALDI correspondientes a los spots 8, 9, 10, 14, 15 y 17 debido a que la cantidad de muestra contenida en esos spots estuvo por debajo del límite de sensibilidad del método de identificación.

Los spots 11 y 16 corresponden a proteínas flagelares que forman parte del flagelo “grueso” (o subpolar) de *B. japonicum* que se expresa de manera constitutiva. Los genes que codifican estas proteínas se asocian al cluster 1 ubicado a 6,375 Kb donde se ubican los genes *bll5843* a *bll5846* (*fliC1234*) alineados en tándem en el cromosoma que

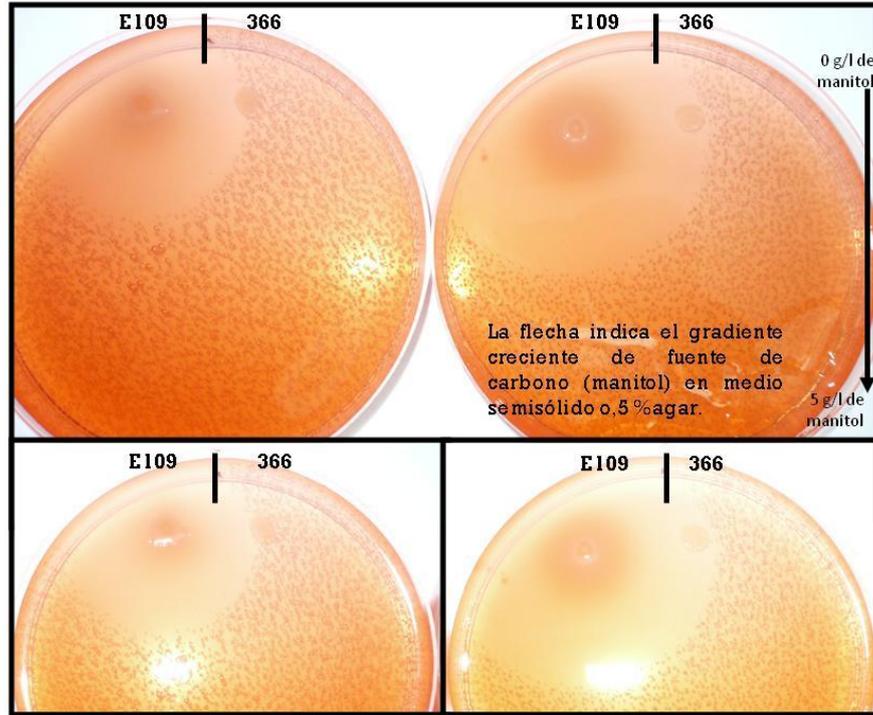
tienen una homología entre sí del 71 %. Este flagelo se asocia al movimiento swimming. Aun cuando la expresión de estas proteínas es constitutiva, se observa una mayor expresión en la cepa E109.

Los spots 1, 2, 3 y 6 corresponden a una proteína flagelar codificada por el gen *bll6865* (*fliC1*) y los spots 4, 5 y 7 a la proteína flagelar codificada por el gen *bll6866* (*fliC2*). Estas proteínas se asocian al cluster 2 ubicado a 7,545 Kb. Estas proteínas flagelares forman parte del flagelo “fino” (o lateral) de *B. japonicum* que podría estar involucrado en el movimiento swarming. Si bien los spots 1, 2, 3 y 6 se observan en la cepa 366, son bandas muy tenues comparadas con E109 y los spots 4, 5 y 7 no se detectaron en los extractos de 366.

Por último el spot 12 corresponde a una ATP sintasa específica de flagelo de 379 aminoácidos codificada por el gen *fliI*. Esta proteína solo se detectó en la cepa E109.

#### *Ensayos de motilidad – Swarming*

Se realizó la determinación visual del movimiento swarming para las cepas E109 y 366, las que con el objetivo de estimular la síntesis de ambos flagelos fueron cultivadas previamente en medio suplementado con Arabinosa y Gluconato de sodio (AG) (Lodeiro, 2014). Dos microlitros de cultivo de cada una de las cepas en estudio (E109 y 366) se sembraron en placas en las que se generó un gradiente de la fuente carbonada en un medio semisólido con 0,5 % de agar. Luego de 7 días de incubación se observó un halo de motilidad alrededor de la colonia de E109 (respuesta positiva), mientras que la colonia de 366 no presentó halo (Figura 5-20). El mismo ensayo se repitió en el medio semisólido pero sin gradiente de fuente de carbono, se observó un halo de motilidad en ambas cepas pero el que presentó la colonia de E109 fue de mayor diámetro. Lo que indicaría que tanto el movimiento swarming como la quimiotaxis hacia el manitol son mayores y distintos en la cepa E109 con respecto a la cepa 366. Estos resultados eran de esperar considerando que el análisis proteómico extracelular, mostró mayores niveles de expresión de las proteínas que forman ambos flagelos en la cepa E109. Más aún, en la cepa 366 no se detectó expresión de algunas proteínas que constituyen el flagelo lateral.



**Figura 5- 20:** Ensayo de motilidad – Swarming en agar semisólido (0,5%). En la parte superior de la imagen se observan los duplicados del ensayo. En la parte inferior se ve un acercamiento de la imagen. Alrededor de la colonia de E109 se observa el halo de motilidad.

## **Discusión**

Los aislados de suelo en estudio fueron seleccionados por su capacidad de nodulación y fijación de nitrógeno y a los fines prácticos se incluyó como control la cepa E 109, que es la que se utiliza en los inoculantes comerciales. En la caracterización inicial descripta en el capítulo 2 y 3 de esta tesis, tal cual era de esperar, se demostró que las mismas presentan diferencias a nivel genético y fenotípico. Esto seguramente es el resultado de la expresión de los genes que forman parte o regulan los sistemas que determinan la interacción simbiótica entre la planta y los rizobios.

Estos genes son, por un lado, los genes que regulan el proceso de la nodulación como *nodW*, *nodD1* y *nodD2* y dos genes reguladores de la fijación de nitrógeno *nifA* y *fixL*. Por otro lado, en *Bradyrhizobium japonicum* se ha descripto la presencia de un sistema de transporte tipo III (SSTT) relevante para la interacción de las bacterias con las plantas, ya que la bacteria secreta a través de éste, proteínas como NopP, NopE1 y NopE2 y probablemente secreta homólogas a NopL, NopM y NopT, con actividad biológica (Viprey et al., 1998; Wei et al., 2008). Por esto, también se determinó el nivel de expresión de un gen estructural de este sistema de transporte *rhcC1* y del gen *nopP* que codifica una proteína secretada. Adicionalmente, como los aislados difirieron en la cantidad de nódulos que formaron con la soja, se determinó la expresión del gen *br10241* que codifica una proteína con actividad ACC deaminasa. La actividad catalítica de esta proteína reduce los niveles de etileno, hormona que ha sido asociada al proceso de nodulación (Glick, 2014).

Si bien los genes descriptos son importantes particularmente cuando las bacterias establecen la interacción simbiótica con las plantas, estos se evaluaron en cultivos líquidos, considerando que la tecnología actual sugiere adicionar factores de nodulación a las suspensiones bacterianas con que se formulan los inoculantes bacterianos, sobre el supuesto de que esto le otorga una ventaja biológica. Algunos de estos genes se conocen como genes tardíos ya que se expresan luego de que ha ocurrido la formación del nódulo, que es la estructura donde ocurre la fijación (Masson-Boivin et al., 2009). Aún así, son escasos los estudios que analizan el patrón de expresión de estos genes en cultivos líquidos de *Bradyrhizobium japonicum*.

La expresión de los genes descriptos se analizó tanto en las etapas tempranas (exponencial) del desarrollo de cultivos líquidos como en las etapas tardías

(estacionarias). Más allá de las consideraciones de cuáles serían los roles de estas proteínas en los cultivos líquidos, el nivel de expresión de estos genes en la cepa comercial E109 siempre fue más alto que en los aislados de suelo. Esto sugirió que era importante estudiar los cambios en los niveles de expresión cuando los cultivos son inducidos con exudados de la planta, como ocurre en el inicio de la simbiosis y además, la velocidad de nodulación de las plantas. Sin embargo, Kossak et al. (1987) en trabajos previos describieron que los genes involucrados en pasos tempranos de la formación de nódulos tuvieron bajos niveles de expresión en cultivos líquidos.

En los nódulos los niveles de expresión fueron marcadamente distintos. Los niveles de expresión de los 9 genes estudiados en los nódulos de la cepa 163 fueron superiores a los determinados en los nódulos de E109. Si se comparan los niveles de expresión de los genes seleccionados en nódulos 366 con respecto a los cultivos líquidos de esta cepa, se observa un aumento de la expresión en *nodD1*, *nodD2*, *nifA*, *rhcC1*, *nopP* y *fixX*. Vale la pena destacar que *nodD1*, *nodD2* y *rhcC1* mostraron en los nódulos de 366 niveles de expresión superiores al de los nódulos de E109. Esto podría sugerir que tanto los genes reguladores de los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno, así como también los relacionados al sistema de transporte y proteínas extracelulares, se expresan en niveles más altos en los nódulos de los aislados de suelo seleccionados. Sin embargo, aun cuando los aislados 163 y 366 mostraron una alta capacidad de fijación esta no fue superior a la de E109.

El sistema de transporte tipo III es clave para todas cepas en estudio, esto lo sugiere el hecho de que el gen estructural *rhcC1* se expresa en los nódulos de las plantas inoculadas con cualquiera de las cepas estudiadas. Aún así, se encontró que los niveles de expresión de este gen fueron mayores en los aislados 163 y 366. Esto indicaría que probablemente en nódulos de ambas cepas (163 y 366) hay una mayor actividad de secreción aunque no se evaluó su rol biológico.

Los niveles de expresión del gen *blr0241*, que codifica una ACC deaminasa, fueron 10 veces superiores en los nódulos inducidos por la cepa 163 comparado con los niveles de expresión observados en nódulos de E109. Este mismo gen está marcadamente reprimido en los nódulos de 366. La proteína codificada cataliza la conversión de ACC, que es el precursor del etileno, siendo este último una hormona que inhibe el proceso de nodulación (Murset et al 2012). Mientras que en algunos rizobios esta enzima impacta positivamente sobre la interacción rizobio-planta, en otros como

*Mesorhizobium loti*, la deaminasa se expresa dentro de los nódulos y si bien se ha propuesto que esto no afecta la nodulación podría actuar reduciendo la tasa de senescencia del nódulo (Nascimento et al., 2012). Esto es particularmente importante debido al hecho de que siendo la fijación de nitrógeno, un proceso que utiliza un nivel muy alto de energía en forma de ATP, podría activar la síntesis de etileno resultando en la senescencia prematura del nódulo (Glick, 2014). Los altos niveles de expresión de esta enzima en nódulos de 163, traducidos en una mayor actividad que disminuya la senescencia nodular, podría explicar el mejor desempeño simbiótico de la cepa. El análisis conjunto del nivel de expresión de este gen en nódulos de 366 y de 163 de alguna manera explicarían, al menos en parte, las diferencias simbióticas de las cepas. Esto se debe a que el etileno reduce el número de nódulos en las leguminosas. En las plantas inoculadas con la cepa 366 el gen *blr0241* tuvo un bajo nivel de expresión y aun así las plantas inoculadas con esta cepa presentaron un alto número de nódulos pequeños. La cepa 366, como ya se ha descrito anteriormente, en base a la secuencia del ITS fue identificada como *B. japonicum*; sin embargo, presenta algunas similitudes con el fenotipo de *B. elkanii* como por ejemplo la formación de nódulos pequeños. En síntesis, es probable que esta cepa sintetice algún inhibidor de la biosíntesis del etileno, con características similares a la rhizobitoxina de *B. elkanii*.

La expresión de los genes fue distinta cuando los cultivos de E109 y 366 se indujeron con exudados de semilla y con genisteína. Mientras que *nodW* mostró mayores niveles de expresión cuando se indujo con exudados de semilla, *nodD1* respondió más a la inducción con genisteína. Estos estudios demuestran que el sistema regulatorio *nodV/nodW* presenta una regulación diferente de *nodD1*. Además, la expresión de *nopP* aumenta junto con la expresión de *nodV/nodW* y *nodD1* (Wei et al., 2008; Bortolan et al., 2009), lo que confirma que en estos organismos la expresión del sistema de transporte está regulado por las dos cascadas regulatorias (*nodD1* y *nodV/W*).

La inducción de los cultivos de E109 y 366 con exudados de semillas resultó en aumentos en la expresión de los genes (*nifA*, *rhcC1*, *nopP*, *nodW* y *nodD1*). Es importante mencionar que si bien las cepas se seleccionaron por su alta capacidad de fijación de nitrógeno, los genes estudiados se expresaron en mayores niveles en E109. En particular, *nopP* y *nodD1* que mostraron niveles de expresión hasta 10 veces superiores a los observados en cultivos de E109 sin inducir. Sin embargo, el aumento de expresión de estos genes en la cepa 366 no fue tan marcado. La diferencia de expresión de *nopP* en principio podría relacionarse con el hecho de que las mutaciones en la secuencia del gen

en la cepa 366, que se traducen en cambios de aminoácidos, generen una proteína que difiere en su capacidad de acumulación. Es importante destacar que previamente, la funcionalidad del gen *nopP* fue confirmada en *B. japonicum*, y se ha verificado la inducción de su expresión tanto con genisteína como con exudados de semilla de soja (Wei et al., 2008; Bortolan et al., 2009). Saad y colaboradores (2005) reportaron que la ausencia de las proteínas efectoras (NOP) cambia dramáticamente la capacidad de nodulación en *Rhizobium sp.* NGR234. Incluso más relevante es el hecho de que en un estudio comparativo por RDA (análisis de diferencia representacional) de mutantes naturales de *B. japonicum* con diferentes capacidades de fijar nitrógeno, el gen *nopP* fue una de las 24 secuencias que se encontraron exclusivamente en la cepa altamente eficaz en los procesos biológicos (Barcellos et al., 2009). En este trabajo de tesis las cepas control y aislados de suelo seleccionados por su capacidad para nodular y fijar nitrógeno expresan, aunque en diferentes niveles, el gen *nopP* de manera que este no estaría afectado. De hecho la funcionalidad de las proteínas que secretan estas bacterias entre las que se incluye NopP, puede inferirse de los resultados del ensayo de deformación de pelos radiculares, cuando al adicionar extractos proteicos de los cultivos a las raíces de semillas pregerminadas se observó el enrulamiento del pelo. Estos resultados sugieren que el conjunto de las proteínas de nodulación secretadas, son funcionales también en estas cepas de *B. japonicum*. Esto último estaría reforzando la hipótesis de que el estudio de genes como *nopP* es de gran relevancia, estando el mismo dirigido tanto a comprender la competitividad y la eficiencia del proceso de fijación de nitrógeno, cómo la búsqueda de cepas promisorias para la formulación de inoculantes.

Los resultados de este trabajo confirman los informes anteriores de la inducción de la expresión génica de *nodW* en *B. japonicum* por isoflavonoides o exudados de soja (Lang et al, 2008; Wei et al, 2008; Bortolan et al., 2009), siendo un gen crítico para la nodulación de la planta huésped. El sistema de dos componentes compuesto por las proteínas NodV (proteína sensora) y NodW (proteína reguladora) regula la expresión de los genes *nod*. NodV, en presencia de un inductor (IF/genisteína) es autofosforilado y transfiere el grupo fosfato a la proteína NodW, alterando su capacidad para unirse a la región reguladora de los genes *nod* y activando la expresión de *nodABC* (Loh et al, 1997, 2002; Bijlsma & Groisman, 2003). Se han realizado varios estudios sobre la expresión de genes relacionados con la nodulación y el efecto inductor de los Isoflavonoides. En un estudio con USDA110, Wei et al. (2008) encontraron que los genes *nodW* y *nodV* y el operon *nodABC* de manera similar se activan, en presencia de genisteína o exudados de

semillas de soja, en las etapas tempranas del proceso de nodulación. Sin embargo, Bortolan y colaboradores (2009) encontraron un mayor aumento en los niveles de expresión de estos mismos genes cuando la inducción se realizaba con genisteína. Esto podría estar relacionado con el hecho de que los exudados de semillas comprenden varios compuestos (además de los IF más abundantes – genisteína y daidzeína), que pueden interactuar en algunos casos provocando la inhibición de los genes de nodulación (Hungria & Stacey, 1997). Sin embargo, el efecto de los inductores para otros genes puede ser diferente. En este mismo trabajo Wei et al. (2008) encontraron que la expresión de los genes relacionados con el sistema de secreción tipo III (SSTT) de USDA110 en tiempos superiores a las 12 hs de inducción, alcanzaron mayores niveles de expresión cuando se indujeron con exudados de soja (Wei et al., 2008). Por esta razón fue que en este estudio se incluyeron además de los genes *nodW*, *nodD1* y *nopP*, el gen *nifA* involucrado en la regulación de los genes de fijación y el gen *rhcC1* relacionado al SSTT. La expresión del gen *nifA* tal como se observó con los otros genes estudiados fue inducida por el agregado de exudados de semillas, inducción que fue también mayor en la cepa control que en el aislado de suelo. Aún cuando los cultivos se indujeron con genisteína y considerando además la cepa tipo USDA110, la expresión de los genes evaluados en las cepas E109 y USDA110 siempre fue superior a los niveles detectados en los cultivos del aislado 366. Esto sugiere que las cepas USDA110 y E109 responden más eficientemente a la inducción con isoflavonoides o a los exudados de semilla, que el mutante natural 366. Este puede ser uno de los puntos claves por los que E109 demostró ser siempre más eficiente.

Como la expresión de los genes no se traduce directamente en un rol biológico y considerando que se encontraron diferencias en la secuencia de una de las proteínas secretadas, se analizó el perfil de las mismas en la cepa E109 y el aislado 366. Los pelos radiculares se enrularon a partir de las tres horas de incubación con los extractos proteicos de cultivos inducidos, los que probablemente contuvieron también factores Nod. Se ha demostrado que varios flavonoides añadidos a las raíces en concentraciones nano-molares, estimulan la inducción de genes *nod* y la formación de nódulos (Martínez et al., 1993; Schmidt et al., 1994). Esto podría explicar la diferencia en el tiempo de respuesta de los pelos radiculares al enrulamiento, cuando las raíces se trataron con los extractos proteicos de cultivos inducidos. Son varios los mecanismos por los que las proteínas extracelulares podrían mediar una respuesta bacteriana en la nodulación de la planta. Estas proteínas podrían participar en la biosíntesis de moléculas bacterianas de

bajo peso molecular involucradas en la iniciación de la nodulación; por otro lado, estas enzimas extracelulares podrían sintetizar otros metabolitos Nod (Spaink et al., 1992); incluso estas enzimas podrían estar actuando en la rizósfera. Además es posible que las proteínas funcionen como señales de retorno que provoquen en la planta una respuesta para la iniciación del nódulo (Krishnan & Pueppke, 1992).

La Proteómica es el estudio de los perfiles de expresión de las proteínas de los organismos que puede ser usado para monitorear las respuestas microbianas a estímulos externos (Nomura et al., 2010; da Silva Batista et al., 2010). El efecto de la inducción de los cultivos sobre las proteínas extracelulares, se manifestó primordialmente en cambios en los perfiles de ambas cepas. Es conocido que el rol de la inducción con IF, como la genisteína, es clave en el establecimiento de la simbiosis a través de la inducción de varios genes en *B. japonicum* saprofitos (da Silva Batista et al., 2010; da Silva Batista & Hungria, 2012). La expresión diferencial de las proteínas a la inducción no está ligada exclusivamente a la activación de genes de nodulación y del sistema de secreción tipo III. La inducción de genes resulta en la síntesis de factores Nod, en la regulación de la eficiencia de nodulación y la definición del rango de hospedantes con que interactúan los rizobios, aun así los procesos bioquímicos no se conocen completamente. En *Ensifer fredii* USDA257 y varias cepas cercanas se ha demostrado que la genisteína provoca la exportación de una serie de nuevas proteínas extracelulares (Krishnan & Pueppke, 1992). Estas características de inducción, en combinación con las proteínas, suponen que podrían intervenir durante algún aspecto de la iniciación de nódulos. En este trabajo se han identificado perfiles complejos de proteínas extracelulares en medios de cultivos inducidos y no inducido. De los spots seleccionados, aquellos que tuvieron la cantidad de muestra por encima del nivel de sensibilidad del método, fueron identificados como pertenecientes a algunos de los dos sistemas flagelares de *B. japonicum*. Los niveles de expresión de las proteínas identificadas fueron mayores, o únicamente detectadas en E109. Esto puede ser debido a la respuesta diferencial de los genotipos de *B. japonicum* a los exudados de semilla de soja. Aunque los diferentes mecanismos de regulación de los procesos metabólicos no están completamente caracterizados, podrían actuar en la fase temprana del establecimiento de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa, lo que demuestra una mayor complejidad de las respuestas a exudados de las semillas de soja. Es decir, que una cepa podría ser más sensible a la inducción con los compuestos que conforman los exudados, o podría considerarse además que los patrones de inducción son completamente diferentes, dependiendo de las concentraciones y los tiempos de

inducción a los que las cepas fueron expuestas, algo que también ha sido considerado por otros autores (Takeshima et al., 2013; Liu et al., 2015).

Aun así y como se expresó anteriormente, las proteínas identificadas se corresponden con los sistemas flagelares descritos en *B. japonicum*. Estos flagelos son los responsables del movimiento de “swimming” observado en placas de agar semi-sólido como una expansión de unos pocos milímetros por debajo de la superficie del agar; y también del “swarming” que ocurre en placas de agar más concentrado donde las colonias se mueven en la superficie (Harshey, 2003; Althabegoiti et al., 2011). Kanbe et al. (2007) observaron que el flagelo grueso es constitutivamente expresado en *B. japonicum* y responsable del swimming para llegar a las raíces de las plantas, mientras que el flagelo fino es inducible por la viscosidad del medio y podría ser expresado en la superficie del pelo radicular antes de la formación del nódulo. En este estudio en ninguna de las dos cepas se produjo una inducción de la expresión de estas proteínas por la presencia de exudados de semillas de soja. Sin embargo, las proteínas correspondientes al flagelo grueso, de la misma manera que las proteínas del flagelo fino mostraron un mayor nivel de expresión en E109 y además no todas fueron detectadas en la cepa 366. Esto podría estar indicando diferencias a nivel de la movilidad de estas cepas, al menos en las condiciones ensayadas. En base a lo descrito anteriormente se realizó un ensayo de motilidad que permitió confirmar una motilidad del tipo swarming y quimiotaxis hacia el manitol aumentada en la cepa parental. Se ha propuesto que el modo de vida más común de las bacterias sería un estado sésil en el que las colonias se diferencian y estratifican en tipos celulares especializados, y así son más tolerantes a las adversidades ambientales. Por lo tanto es posible que el estado en que se encuentren los rizobios en el suelo sea el de biopelículas y que el estado móvil solo sea empleado cuando se dan las condiciones edáficas como para abandonar una biopelícula avejentada e iniciar una nueva en otro lugar (Althabegoiti et al., 2013). El estudio de la capacidad de estos aislados para formar biopelículas mostró que E109 fue superior a 366 en la formación de biofilm y en la autoagregación. Sin embargo, siendo que la formación de biopelículas depende en parte de la producción de EPS, sería interesante estudiar qué sucede con esta capacidad de agrupamiento cuando las cepas crecen en condiciones limitantes de nutrición. En medios de cultivo pobres se registraron cambios en la producción de EPS para estas dos cepas. Este es probablemente el ambiente que con mayor frecuencia se encuentra una bacteria en el suelo. Aún cuando la movilidad y la capacidad de formar biopelículas influida por la producción de biopolímeros, han sido

asociadas con una eficiente colonización e infección de las raíces por los rizobios (Li et al., 2011), Althabegoiti et al. (2010) encontraron que mutantes que no expresan el flagelo fino (lateral) mostraron una mayor capacidad competitiva de nodulación que las cepas parenterales.

Si bien en este trabajo no se han encontrado cepas que superen la eficiencia de fijación de nitrógeno de E109, se han descrito características que muestran cambios fenotípicos en las cepas naturalizadas en respuesta a los ambientes a los que se han adaptado y que algunas de estas mismas cepas conservan las buenas características simbióticas de las cepas comerciales como en el caso de la cepa 366. En función de los resultados obtenidos es clave continuar los estudios para comparar la competitividad de las mismas en los ambientes naturales en los que se da la interacción con la soja, que es uno de los problemas detectados al inocular con cepas seleccionadas los campos con rizobios alóctonos. Esto último puede posiblemente incrementar el conocimiento de los mecanismos existentes o de otros alternativos y su vinculación con el proceso de FBN, que permitan explicar los diferentes fenotipos de los rizobios naturalizados.

***Capítulo 6: Discusión general y  
Perspectivas.***

## **Capítulo 6: Discusión general y Perspectivas**

La eficiencia del proceso de nodulación y fijación de nitrógeno depende de tres factores: la leguminosa, los rizobios naturalizados y que se incorporan con la inoculación y el suelo, a lo que además hay que adicionarle la microbiota del ambiente. Es decir que el sistema de nodulación y fijación de nitrógeno es complejo, ya que las poblaciones de rizobios alóctonos compiten con las cepas introducidas, por nutrientes, ambientes e interactúan con las plantas con algunas de las cuales y luego de un intercambio de señales, establecen asociaciones que devienen en el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno. Así es que, las bacterias siempre están expuestas a estreses generados por el ambiente, los microorganismos con los que cohabitan y las plantas. Los microorganismos que se naturalizan y sobreviven son las poblaciones más plásticas y en este proceso sufren cambios fenotípicos adaptativos como resultado de cambios a nivel genético (Dobrindt & Hacker, 2001; Siqueira et al., 2014). Es clave conocer las bases de estos cambios a que están expuestas las bacterias en los ambientes en los que fueron introducidas. Tan importante como esto es establecer el rol que la diversidad genética de los suelos cumple como fuente para la selección de cepas, que conduzcan a obtener altos rendimientos en el marco de una agricultura sustentable, asegurando además mantener la calidad del recurso suelo.

La primera parte de este trabajo de tesis se orientó al estudio de las características fenotípicas de un conjunto de aislados naturalizados en suelos con historia de cultivo de soja bajo distinto sistema de manejo. Este estudio comparativo entre E109 y 12 aislados, seleccionados en base a su alta capacidad de fijación de nitrógeno a partir de una colección de aproximadamente 200 aislados, mostró que del total de los rizobios alóctonos estudiados el 40 % fueron más tolerantes al glifosato mostrando un fenotipo simbiótico más eficiente en presencia del herbicida; un porcentaje similar de cepas se destacaron por su mayor tiempo de supervivencia sobre semilla que en algunos casos fue acompañado por una mayor síntesis de EPS; así como también se observó que en más del 50 % de las cepas los exudados de semillas indujeron el proceso de autoagregación bacteriana. En tal sentido se consideró interesante evaluar la diversidad genética de los aislados y su relación con las potenciales cepas antecesoras que muy probablemente fueron introducidas en los suelos por la inoculación de semilla en el momento de la siembra. Los microorganismos establecidos en los suelos se adaptaron al ambiente y adquirieron capacidades diferentes de sus antecesores.

Los estudios genómicos de los aislados confirmaron que en los suelos con historia del cultivo de soja se encuentran representantes de *B. japonicum* y *B. elkanii*, especies que fueron introducidas con los inoculantes comerciales. El análisis con marcadores moleculares BOX, REP y RS $\alpha/\beta$  confirmó la diversidad genética de las cepas. Doce aislados de suelo y 5 cepas tipo de las especies *B. japonicum* y *B. elkanii* generaron 17 genotipos diferentes. Otros trabajos realizados en otros países de la región también demostraron que las poblaciones alóctonas aisladas de suelos con historial de cultivo de soja son polimórficas respecto de las cepas de los inoculantes (Batista et al., 2007).

En este trabajo se encontró que en las poblaciones alóctonas predominan los aislados derivados de E109, si bien se han encontrado aunque en menor número representantes de *B. elkanii*. Un posible interrogante que surge es si los resultados que han sido publicados hasta el momento son suficientes para descartar la naturalización en estos suelos de otras especies de *Bradyrhizobium* simbiotes de soja? Considerando el hecho de que se encontró una mayor representatividad de la especie *B. japonicum* que de *B. elkanii*, podría analizarse si esto se debe exclusivamente a una mayor frecuencia de inoculación de *B. japonicum* o si esto podría vincularse a una mayor capacidad de supervivencia de esta especie en los suelos o a que establece una interacción específica con los genotípicos de soja en cultivo. Es conocido que las plantas de soja seleccionan los rizobios que interactúan con ellas. Considerando algunas de las características estudiadas es posible que este sucediendo un proceso evolutivo que involucre el reclutamiento de secuencias génicas de ambas especies, que se traduce en diversos fenotipos que luego se reflejan en el árbol evolutivo. Así es que cepas identificadas como *B. japonicum* dentro de este conjunto de aislados muestran características fenotípicas semejantes a *B. elkanii*.

En *Bradyrhizobium* la plasticidad del genoma involucra rearrreglos que han sido reportados entre especies e incluso se ha demostrado que ocurren a nivel de cepa (Okubo et al., 2013; Siqueira et al., 2014). La comparación de varios genomas secuenciados de *Bradyrhizobium japonicum* y *B. diazoefficiens* ha mostrado que si bien son sinténicos, se observan rearrreglos que incluyen inversiones de largas regiones y también inversiones o translocaciones de pequeñas regiones. *Bradyrhizobium* es un género que se caracteriza porque contienen en su genoma secuencias repetitivas. Las RS $\alpha$  se encuentran en distinto número de copias en el genoma, próximas a la región *nifD* y alta frecuencia en la isla simbiótica (Kaluza et al., 1985; Kuykendall et al., 1997). Este tipo de secuencias que han sido asociadas a la duplicación de fragmentos del genoma de

*Bradyrhizobium*, podrían ser responsables de modificaciones genéticas que impacten en los fenotipos de las cepas naturalizadas. Sin embargo, en los capítulos 3 y 4 se confirmó que si bien no se encontraron rearrreglos que estén afectando directamente a los genes involucrados en la nodulación y fijación de nitrógeno, existe diversidad en la ubicación de las regiones repetitivas en toda la extensión del genoma de los aislados de suelo con respecto a las cepas antecesoras. Estos resultados sugieren que los rearrreglos no cumplirían una función clave o al menos no serían tan frecuentes en la isla simbiótica, aun cuando ocurren en otras regiones del genoma como se evidenció en el análisis Southern blot de los aislados. Alternativamente, es probable que los rearrreglos que ocurren en la región simbiótica generen más frecuentemente cepas no fijadoras y/o nodulantes. Denison (2000) ha propuesto que la planta sanciona a estos aislados (mutantes) con los que no establece interacciones mutualistas efectivas. En este trabajo los aislados de suelo se obtuvieron a partir de nódulos fijadores de nitrógeno desarrollados en plantas trampa. Este tipo de selección de aislados es una forma de seleccionar a favor de rizobios en los que si existen rearrreglos, estos no afectan negativamente la capacidad simbiótica, o que dichos rearrreglos no estén localizados en la isla simbiótica.

Lo dicho en el párrafo anterior no es sorprendente ya que la plasticidad está relacionada con la adaptación de los rizobios a vivir saprofiticamente en el suelo, situación en la que se adaptan a los diferentes ambientes en los que las cepas se naturalizan en ausencia de la planta huésped. Estas características adaptativas es probable afecten indirectamente a la interacción mutualista. Las interacciones especializadas contribuyen a la estructuración de las comunidades microbianas del suelo. Sin embargo, la persistencia de los organismos que establecen interacciones mutualistas especializadas, no sería ventajosa ya que estos microorganismos estarían restringidos a ambientes más específicos o definidos que los microorganismos generalistas, que suelen ocupar entornos más amplios en los que generan interacciones beneficiosas. La adaptación implica costos y estos rasgos adaptativos pueden correlacionarse a nivel genético (Ehinger et al., 2014). La segunda etapa de esta tesis estuvo dirigida a evaluar la diversidad genética a nivel de la isla simbiótica que concentra los genes de nodulación y fijación de nitrógeno. Los aislados, 665, 9110, 163, 366, 2112 y 953 fueron los que mostraron capacidades simbióticas superiores. La secuencia del ITS y los genes de fijación (*nifD*, *nifK* y *nifH*) presentaron patrones de restricción idénticos, confirmando que los aislados 163, 366, 2112 y 953, son

representantes de *B. japonicum*. De acuerdo con esta caracterización, estas últimas 4 cepas fueron las seleccionadas para proseguir los estudios a nivel de la isla simbiótica.

El fragmento de la isla simbiótica que codifica los genes *nod*, *nif* y *fix*, está contenido en 7 amplicones. El RFLP de 6 de esos amplicones de los cuatro aislados y de E109, fue idéntico. Solo se encontró polimorfismo en *nopP* (*blr1752*) ubicado en el amplicon Bj 12-1<sup>ra</sup> parte (6591 pb). Los aislados 953, E109 y 163 presentaron un patrón de digestión idéntico y distinto de los aislados 366 y 2112. Los polimorfismos detectados en *nopP* se debieron a mutaciones puntuales en la secuencia del gen de los aislados 366 y 2112, que tuvo un 99 % de homología con la secuencia *nopP* de E109. Las mutaciones implican cambios en la secuencia de la proteína, que no pudieron ser asociados a un fenotipo específico. Esto sugiere que la evolución a nivel de los genes de fijación de nitrógeno es lenta ya que no se detectaron variaciones importantes, si bien el análisis de restricción pudo ser la causa de no dejar en evidencia un mayor número de cambios a nivel de las secuencias. En cualquier caso, es evidente en la población estudiada que proviene de nódulos fijadores de nitrógeno, que los rearrreglos parecen no ser tan frecuentes. Aún así, estudios adicionales con las nuevas tecnologías de secuenciación permitirán conocer más profundamente cómo evoluciona esta región del genoma en la población de los bradyrizobios naturalizados en los suelos.

Los genes *nifA*, *fixL*, *nodW*, *nodD1*, *nodD2*, *rhcC1*, *nopP*, *blr0241* y *fixX* son importantes particularmente cuando las bacterias interactúan simbióticamente con las plantas. Estos genes, en cultivos líquidos, solo se expresan en niveles basales tal cual se demostró en otros trabajos (Siquiera et al., 2014), lo que sugiere que estarían involucrados exclusivamente en la interacción rizobio-leguminosa. Los genes reguladores de los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno, así como también los relacionados al sistema de transporte y proteínas extracelulares, se expresan en niveles más altos en los nódulos inducidos por los aislados de suelo que los desarrollados por E109. Particularmente el gen *blr0241* que codifica la ACC deaminasa, se expresa en el aislado 163 en niveles de hasta diez veces superiores a E109, si bien esto no se asoció a ninguna de las características fenotípicas evaluadas.

*nifA*, *rhcC1*, *nopP*, *nodW* y *nodD1* se inducen pero en mayor nivel en cultivos líquidos de E109 y USDA110 en presencia de IF (exudados de semillas de soja). Esto puede ser uno de los aspectos claves para explicar el eficiente comportamiento simbiótico de la cepa E109. A partir de esta información se podría considerar como un

posible test de identificación de cepas eficientes para fijar nitrógeno, la evaluación de la expresión temprana de un set de estos genes y la respuesta de los mismos a los isoflavonoides. Por otro lado esto explicaría el mejor comportamiento que presentan los inoculantes comerciales de *Bradyrhizobium* formulados con factores Nod, en relación a aquellos que no los contienen.

Las diferencias de expresión en los genes reguladores de FBN analizados en las distintas condiciones ensayadas no se reflejan en un fenotipo superior considerando el desarrollo de nuevos productos biotecnológicos. Los fenotipos de los aislados de suelo si bien muestran características de adaptación a los ambientes donde se han naturalizado, esto no se relaciona con altos niveles de transcripción de los genes reguladores de la fijación biológica del N.

Las proteínas de nodulación secretadas por los aislados de *B. japonicum* estudiados son funcionales. Los patrones de proteínas secretadas por las cepas fueron distintos si bien no difirieron en su acción hormonal demostrada a través de la alteración de la morfología de los pelos radiculares. El análisis de los spots de proteínas extracelulares permitió identificar algunas de ellas y pertenecen al sistema flagelar. Es decir, estas proteínas estarían vinculadas a la motilidad de las bacterias. Es conocido que la motilidad bacteriana si bien no cumple un rol clave en la simbiosis, podría estar relacionada con la competitividad de las cepas. Las proteínas identificadas estarían relacionadas con dos tipos de movimientos (swarming y swimming) ya descriptos en los rizobios (Althabegoiti et al., 2011; Covelli et al., 2013; Vicario et al., 2015). En línea con esto se encontró que E109 y la cepa 366 difieren justamente en estas capacidades. Si bien estas bacterias establecen de manera eficiente su simbiosis con la planta, en parte por su motilidad, su capacidad de formar biopelículas y supervivencia en los suelos, la implicancia de éstas características en la competitividad de las cepas no se conoce en detalle. Las diferencias encontradas en los diversos movimientos podrían explicar al menos en parte las diferencias competitivas entre la cepa parenteral y los aislados de suelo.

El conjunto de resultados obtenidos, sugieren que otra línea futura de estudio consistiría en profundizar los análisis destinados a identificar las proteínas extracelulares que sintetiza *Bradyrhizobium* y que rol juega cada una de ellas en los eventos de la simbiosis. Más aún, sería importante establecer el impacto de los perfiles de las mismas en el proceso de nodulación. Esto último estaría destacando la importancia de estudiar el

rol de la proteína NopP y otras proteínas extracelulares, así como también la participación de los sistemas flagelares en procesos vinculados a la competitividad y la eficiencia de fijación de nitrógeno.

*“La humanidad también necesita soñadores, para quienes el desarrollo de una tarea sea tan cautivante que les resulte imposible dedicar su atención a su propio beneficio. Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”*

(Marie Curie)



## ***Bibliografía***



- Aguilar, O., López, M. & Riccillo, P. (2001). The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *Journal of biotechnology*, 91(2), 181-188.
- Althabegoiti, M., Covelli, J., Lodeiro, A., López, F., López García, S., Mongiardini, E., Pérez Giménez, J., Quelas, J. & Rajeswari, C. (2013). Estudios de la movilidad y distribución de *Bradyrhizobium japonicum* en el suelo. *Microbiología Agrícola: un aporte de la investigación en Argentina*. 2<sup>a</sup> ed.- Tucumán: Magna Publicaciones, 2013:237-252.
- Althabegoiti, M., Covelli, J., Pérez-Giménez, J., Quelas, J., Mongiardini, E., López, M., López-García, S. & Lodeiro, A. (2011). Analysis of the role of the two flagella of *Bradyrhizobium japonicum* in competition for nodulation of soybean. *FEMS microbiology letters*, 319(2), 133-139.
- An, J., Carlson, R., Glushka, J. & Streeter, J. (1995). The structure of a novel polysaccharide produced by *Bradyrhizobium* species within soybean nodules. *Carbohydr. Res.*, 269, 303-317.
- Angelini, J., Ibáñez, F., Taurian, T., Tonelli, M., Valetti, L. & Fabra, A. (2011). A Study on the Prevalence of Bacteria that Occupy Nodules within Single Peanut Plants. *Current microbiology*, 62(6), 1752-1759.
- Annapurna, K., Balakrishnan, N. & Vital, L. (2007). Verification and rapid identification of soybean rhizobia in Indian soils. *Current Microbiology*, 54, 287-291.
- Appleby, C. (1984). Leghemoglobin and *Rhizobium* respiration. *Annual Review of Plant Physiology*, 35(1), 443-478.
- Arnold, W., Rump, A., Klipp, W., Priefer, U. & Pühler, A. (1988). Nucleotide sequence of a 24,206-base-pair DNA fragment carrying the entire nitrogen fixation gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of molecular biology*, 203(3), 715-738.
- Arrese-Igor, C., González, E., Marino, D., Ladrera, R., Larrainzar, E. & Gil-Quintana, E. (2011). Physiological responses of legume nodules to drought. *Plant stress*, 5(special issue 1), 24-31.
- Balatti, P. (2007). La diversidad de los rizobios que nodulan la soja. De la biología del suelo a la agricultura (Thuar A, Cassan F, & Olmedo C, eds.), pp. 53-64. Universidad Nacional de Rio Cuarto, Rio Cuarto, Argentina.
- Barcellos, F., da Silva Batista, J., Menna, P. & Hungria, M. (2009). Genetic differences between *Bradyrhizobium japonicum* variant strains contrasting in N<sub>2</sub>-fixation

- efficiency revealed by representational difference analysis. *Archives of microbiology*, 191(2), 113-122.
- Barcellos, F., Menna, P., da Silva Batista, J. & Hungria, M. (2007). Evidence of horizontal transfer of symbiotic genes from a *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strain to indigenous diazotrophs *Sinorhizobium (Ensifer) fredii* and *Bradyrhizobium elkanii* in a Brazilian Savannah soil. *Applied and environmental microbiology*, 73(8), 2635-2643.
- Barnes, S., Kirk, M. & Coward, L. (1994). Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(11), 2466-2474.
- Batista, J., Hungria, M., Barcellos, F., Ferreira, M. & Mendes, I. (2007). Variability in *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* seven years after introduction of both the exotic microsymbiont and the soybean host in a Cerrados soil. *Microbial Ecology*, 53(2), 270-284.
- Beringer, J. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of general microbiology*, 84 (1), 188-198.
- Bhuvanewari, T., Turgeon, B. & Bauer, W. (1980). Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum* I. Localization of infectible root cells. *Plant Physiology*, 66(6), 1027-1031.
- Bijlsma, J. & Groisman, E. (2003). Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends in microbiology*, 11(8), 359-366.
- Bizarro, M., Giongo, A., Vargas, L., Roesch, L., Gano, K., De Sá, E., Pereira-Passaglia L. & Selbach, P. (2011). Genetic variability of soybean bradyrhizobia populations under different soil managements. *Biology and Fertility of Soils*, 47(3), 357-362.
- Boddey, L. & Hungria, M. (1997). Phenotypic grouping of Brazilian *Bradyrhizobium* strains which nodulate soybean. *Biology and Fertility of Soils*, 25(4), 407-415.
- Bogino, P., Oliva, M., Sorroche, F. & Giordano, W. (2013). The role of bacterial biofilms and surface components in plant-bacterial associations. *International journal of molecular sciences*, 14(8), 15838-15859.
- Bolaños, L., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Brewin, N. & Bonilla, I. (2004). Cell surface interactions of *Rhizobium* bacteroids and other bacterial strains with symbiosomal and peribacteroid membrane components from pea nodules. *Molecular plant-microbe interactions*, 17(2), 216-223.

- Boone, D., Castenholz, R., Garrity, G., Brenner, D., Krieg, N. & Staley, J. (Eds.). (2005). *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* (Vol. 2). Springer Science & Business Media.
- Bortolan, S., Barcellos, F., Marcelino, F. & Hungria, M. (2009). Expressão dos genes *nodC*, *nodW* e *nopP* em *Bradyrhizobium japonicum* estirpe CPAC 15 avaliada por RT-qPCR. *Pesq. agropec. bras., Brasília*, 44(11), 1491-1498.
- Botha, W., Jaftha, J., Bloem, J., Habig, J. & Law, I. (2004). Effect of soil bradyrhizobia on the success of soybean inoculant strain CB 1809. *Microbiological research*, 159(3), 219-231.
- Brigle, K., Weiss, M., Newton, W. & Dean, D. (1987). Products of the iron-molybdenum cofactor-specific biosynthetic genes, *nifE* and *nifN*, are structurally homologous to the products of the nitrogenase molybdenum-iron protein genes, *nifD* and *nifK*. *Journal of Bacteriology*, 169(4), 1547-1553.
- Broughton, W. & Perret, X. (1999). Genealogy of legume-*Rhizobium* symbioses. *Current opinion in plant biology*, 2(4), 305-311.
- Brutti, L., Rivero, E., Basurco, J., Nicolàs, M., Iriarte, L., Abbiati, N., Ljunggren, H. & Mårtensson, A. (1998). Persistence of *Bradyrhizobium japonicum* in arable soils of Argentina. *Applied Soil Ecology*, 10(1), 87-94.
- Burris, R. (1974). Methodology. In *The Biology of Nitrogen Fixation*, pp. 9-33. Edited by A. Quispel. Amsterdam, New York: North Holland Publishing Co.
- Chan, J., Halachev, M., Loman, N., Constantinidou, C. & Pallen, M., (2012). Defining bacterial species in the genomic era: insights from the genus *Acinetobacter*. *BioMed Central Microbiology*, 12, 302.
- Chen, L., Fuigeredo, A., Pedrosa, F. & Hungria, M. (2000). Genetic characterization of soybean rhizobia in Paraguay. *Appl Environ Microbiol* 66, 5099–5103.
- Chen, W., Wang, E., Wang, S., Li, Y., Chen, X. & Li, Y. (1995). Characteristics of *Rhizobium tianshanense* sp. nov., a moderately and slowly growing root nodule bacterium isolated from an arid saline environment in Xinjiang, People's Republic of China. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 45(1), 153-159.
- Chen, W., Yan, G. & Li, J. L. (1988). Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(4), 392-397.
- Cohn, J., Stokkermans, T., Kolli, V., Day, R., Dunlap, J., Carlson, R., Hughes, D., Peters, N. & Stacey, G. (1999). Aberrant nodulation response of *Vigna umbellata* to a

- Bradyrhizobium japonicum* NodZ mutant and nodulation signals. *Molecular plant-microbe interactions*, 12(9), 766-773.
- Cooper, J. (2004). Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Advances in Botanical Research*, 41, 1-62.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D., & Lappin-Scott, H. (1995). Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 711-745.
- Covelli, J., Althabegoiti, M., López, M. & Lodeiro, A. (2013). Swarming motility in *Bradyrhizobium japonicum*. *Research in microbiology*, 164(2), 136-144.
- Da Costa Coutinho H, Kay, H., Manfio, G., Neves, M., Ribeiro, J., Rumjanek, N. & Beringer, J. (1999). Molecular evidence for shifts in polysaccharide composition associated with adaptation of soybean *Bradyrhizobium* strains to the Brazilian Cerrado soils. *Environ Microbiol* 1, 401–408.
- da Silva Batista, J. & Hungria, M. (2012). Proteomics reveals differential expression of proteins related to a variety of metabolic pathways by genistein-induced *Bradyrhizobium japonicum* strains. *Journal of proteomics*, 75(4), 1211-1219.
- da Silva Batista, J., Torres, A. & Hungria, M. (2010). Towards a two-dimensional proteomic reference map of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15: Spotting “hypothetical proteins”. *Proteomics*, 10(17), 3176-3189.
- Davison, J. (1999). Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 42(2), 73-91.
- Dazzo, F. & Hubbell, D. (1975). Cross-reactive antigens and lectin as determinants of symbiotic specificity in the *Rhizobium*-clover association. *Applied microbiology*, 30(6), 1017-1033.
- De Bruijn, F. (1992). Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 58(7), 2180-2187.
- de Felipe, M. (2006). Fijación biológica de dinitrógeno atmosférico en vida libre. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada, 9-16.
- De Hoff, P., Brill, L. & Hirsch, A. (2009). Plant lectins: the ties that bind in root symbiosis and plant defense. *Molecular genetics and genomics*, 282(1), 1-15.

- Deakin, W. & Broughton, W. (2009). Symbiotic use of pathogenic strategies: rhizobial protein secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 7(4), 312-320.
- Delihias, N. (2011). Impact of small repeat sequences on bacterial genome evolution. *Genome biology and evolution*, 3, 959-973.
- Dénarie, J., Debelle, F. & Rosenberg, C. (1992). Signaling and host range variation in nodulation. *Annual Reviews in Microbiology*, 46(1), 497-531.
- Denison, R. (2000). Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *The American Naturalist*, 156(6), 567-576.
- Dice, L. (1945). Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26(3), 297-302.
- Dobrindt, U. & Hacker, J. (2001). Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Current opinion in microbiology*, 4(5), 550-557.
- dos Santos, J., Ferreira, E., Kasuya, M., da Silva, A. & de Oliveira Procópio, S. (2005). Tolerance of *Bradyrhizobium* strains to glyphosate formulations. *Crop Protection*, 24 (6), 543-547.
- Downie, J. (2005). Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current biology*, 15(6), 196-198.
- Downie, J. (2010). The roles of extracellular proteins, polysaccharides and signals in the interactions of rhizobia with legume roots. *FEMS microbiology reviews*, 34(2), 150-170.
- Dubois, M., Gilles, K., Hamilton, J., Rebers, P. & Smith, F. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Ebeling, S., Hahn, M., Fischer, H. & Hennecke, H. (1987). Identification of *nifE*-, *nifN*-and *nifS*-like genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular and General Genetics MGG*, 207(2-3), 503-508.
- Ehinger, M., Mohr, T., Starcevich, J., Sachs, J., Porter, S. & Simms, E. (2014). Specialization-generalization trade-off in a *Bradyrhizobium symbiosis* with wild legume hosts. *BMC ecology*, 14(1), 8.
- Fauvart, M. & Michiels, J. (2008). Rhizobial secreted proteins as determinants of host specificity in the *rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS microbiology letters*, 285(1), 1-9.

- Fedorov, D., Ivanova, E., Doronina, N. & Trotsenko, Y. (2008). A new system of degenerate oligonucleotide primers for detection and amplification of *nifHD* genes. *Microbiology*, 77(2), 247-249.
- Ferguson, B., Indrasumunar, A., Hayashi, S., Lin, M., Lin, Y., Reid, D., & Gresshoff, P. (2010). Molecular analysis of legume nodule development and autoregulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 61-76.
- Ferreira, M. & Hungria, M. (2002). Recovery of soybean inoculant strains from uncropped soils in Brazil. *Field Crops Research*, 79(2), 139-152.
- Ferreira, M., Andrade, D., Chueire, L., Takemura, S. & Hungria, M. (2000). Tillage method and crop rotation effects on the population sizes and diversity of bradyrhizobia nodulating soybean. *Soil Biology and Biochemistry*, 32(5), 627-637.
- Fischer, H. (1994). Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiological reviews*, 58(3), 352.
- Fraysse, N., Couderc, F. & Poinso, V. (2003). Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *European Journal of Biochemistry*, 270 (7), 1365-1380.
- Fred, E., Baldwin, I. & McCoy, E. (1932). Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. University of Wisconsin Studies in Sciences, Number 5. Madison, WI: University of Wisconsin Press.
- Fuhrmann, J. (1989). Serological distribution of *Bradyrhizobium japonicum* as influenced by soybean cultivar and sampling location. *Soil Biology and Biochemistry*, 21(8), 1079-1081.
- Fuhrmann, M., Fischer, H. & Hennecke, H. (1985). Mapping of *Rhizobium japonicum* *nifB*-, *fixBC*-, and *fixA*-like genes and identification of the *fixA* promoter. *Molecular and General Genetics MGG*, 199(2), 315-322.
- Gage, D. (2004). Infection and invasion of roots by symbiotic, nitrogen-fixing rhizobia during nodulation of temperate legumes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 280-300.
- Galibert, F., Finan, T., Long, S., Pühler, A., Abola, P., Ampe, F. & Vandenbol, M. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science*, 293(5530), 668-672.
- Galloway, J., Dentener, F., Capone, D., Boyer, E., Howarth, R., Seitzinger, S., Asner, G., Cleveland, C., Green, P., Holland, E., Karl, D., Michaels, A., Porter, J., Townsend,

- A. & Vöösmary, C. (2004). Nitrogen cycles: past, present, and future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153-226.
- Gancel, F. & Novel, G. (1994). Exopolysaccharide production by *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* cultures. Conditions of production. *Journal of Dairy Science*, 77(3), 685-688.
- Gepts, P. (2006). Plant genetic resources conservation and utilization. *Crop Science*, 46(5), 2278-2292.
- Gibson, K., Kobayashi, H. & Walker, G. (2008). Molecular determinants of a symbiotic chronic infection. *Annu. Rev. Genet.*, 42, 413–441.
- Glick, B. (2014). Bacteria with ACC deaminase can promote plant growth and help to feed the world. *Microbiological research*, 169(1), 30-39.
- Godoy, L., Vasconcelos, A., Chueire, L., Souza, R., Nicolás, M., Barcellos, F. & Hungria, M. (2008). Genomic panorama of *Bradyrhizobium japonicum* CPAC 15, a commercial inoculant strain largely established in Brazilian soils and belonging to the same serogroup as USDA 123. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(11), 2743-2753.
- Gomez, M., Silva, N., Hartmann, A., Sagardoy, M. & Catroux, G. (1997). Evaluation of commercial soybean inoculants from Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13(2), 167-173.
- González, N. (2007). Fijación de Nitrógeno en soja. Inoculantes: situación actual y perspectivas en la Argentina. De la Biología del Suelo a la Agricultura (Thuar A, Cassan F & Olmedo C, eds), pp. 161–169. Universidad Nac. de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- Goris, J., Konstantinidis, K., Klappenbach, J., Coenye, T., Vandamme, P. & Tiedje, J. (2007). DNA–DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(1), 81-91.
- Gosink, M., Franklin, N. & Roberts, G. (1990). The product of the *Klebsiella pneumoniae* *nifX* gene is a negative regulator of the nitrogen fixation (*nif*) regulon. *Journal of bacteriology*, 172(3), 1441-1447.
- Göttfert, M., Grob, P. & Hennecke, H. (1990). Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(7), 2680-2684.

- Göttfert, M., Holzhäuser, D., Bäni, D. & Hennecke, H. (1992). Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Mol. Plant-Microbe Interact*, 5(3), 257-265.
- Göttfert, M., Röthlisberger, S., Kündig, C., Beck, C., Marty, R. & Hennecke, H. (2001). Potential symbiosis-specific genes uncovered by sequencing a 410-kilobase DNA region of the *Bradyrhizobium japonicum* chromosome. *Journal of bacteriology*, 183(4), 1405-1412.
- Grageda-Cabrera, O., Mora, M., Castellanos, R., Follett, R. & Pena-Cabriales, J. (2003). Fertilizer nitrogen recovery under different tillage treatments and cropping sequences in a vertisol in Central Mexico. *Management of crop residues for sustainable crop production*, 1354, 39-55.
- Graham, T. (1991). Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant physiology*, 95(2), 594-603.
- Grange, L. & Hungria, M. (2004). Genetic diversity of indigenous common bean (*Phaseolus vulgaris*) rhizobia in two Brazilian ecosystems. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(9), 1389-1398.
- Gubler, M. & Hennecke, H. (1986). *fixA*, *B* and *C* genes are essential for symbiotic and free-living, microaerobic nitrogen fixation. *FEBS letters*, 200(1), 186-192.
- Gyaneshwar, P., Hirsch, A., Moulin, L., Chen, W., Elliott, G., Bontemps, C., Estrada-de los Santos, P., Gross, E., Bueno dos Reis, F., Sprent, J., Young, P. & James, E. (2011). Legume-nodulating betaproteobacteria: diversity, host range, and future prospects. *Molecular plant-microbe interactions*, 24(11), 1276-1288.
- Haag, A., Arnold, M., Myka, K., Kerscher, B., Dall'Angelo, S., Zanda, M., Mergaert, P. & Ferguson, G. (2013). Molecular insights into bacteroid development during *Rhizobium*-legume symbiosis. *FEMS microbiology reviews*, 37(3), 364-383.
- Hagen, M. & Hamrick, J. (1996). A hierarchical analysis of population genetic structure in *Rhizobium leguminosarum* *bv. trifolii*. *Molecular Ecology*, 5(2), 177-186.
- Hahn, M. & Hennecke, H. (1987). Conservation of a symbiotic DNA region in soybean root nodule bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 53(9), 2253-2255.
- Hahn, M., Meyer, L., Studer, D., Regensburger, B. & Hennecke, H. (1984). Insertion and deletion mutations within the *nif* region of *Rhizobium japonicum*. *Plant molecular biology*, 3(3), 159-168.
- Halbleib, C. & Ludden, P. (2000). Regulation of biological nitrogen fixation. *The Journal of nutrition*, 130(5), 1081-1084.

- Hardy, R., Holsten, R., Jackson, E. & Burns, R. (1968). The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant physiology*, 43(8), 1185-1207.
- Harshey, R. (2003). Bacterial motility on a surface: many ways to a common goal. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 249-273.
- Hartmann, A., Gündisch, C. & Bode, W. (1992). *Azospirillum* mutants improved in iron acquisition and osmotolerance as tools for the investigation of environmental fitness traits. *Symbiosis*, 13, 271-279.
- Hennecke, H. (1990). Nitrogen fixation genes involved in the *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis. *FEBS letters*, 268(2), 422-426.
- Huber, T., Agarwal, A. & Keister, D. (1984). Extracellular polysaccharide composition, ex planta nitrogenase activity, and DNA homology in *Rhizobium japonicum*. *Journal Bacteriol.*, 158, 1168-1171.
- Hungria, M. & Araujo, R. (1994). *Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola*. Embrapa-Serviço de Produção e Informação.
- Hungria, M. & Stacey, G. (1997). Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(5), 819-830.
- Hungria, M. & Vargas, M. (2000). Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Research*, 65 (2), 151-164.
- Hungria, M., Boddey, L., Santos, M. & Vargas, M. (1998). Nitrogen fixation capacity and nodule occupancy by *Bradyrhizobium japonicum* and *B. elkanii* strains. *Biology and fertility of soils*, 27(4), 393-399.
- Hungria, M., Franchini, J., Campo, R. & Graham, P. (2005). The importance of nitrogen fixation to soybean cropping in South America. In *Nitrogen fixation in agriculture, forestry, ecology, and the environment* (pp. 25-42). Springer Netherlands.
- Hungria, M., Franchini, J., Campo, R., Crispino, C., Moraes, J., Sibaldelli, R., Mendes, L. & Arihara, J. (2006). Nitrogen nutrition of soybean in Brazil: contributions of biological N<sub>2</sub> fixation and N fertilizer to grain yield. *Canadian Journal of Plant Science*, 86 (4), 927-939.
- Hungria, M., Nishi, C., Cohn, J. & Stacey, G. (1996). Comparison between parental and variant soybean *Bradyrhizobium* strains with regard to the production of lipo-chitin nodulation signals, early stages of root infection, nodule occupancy, and N<sub>2</sub> fixation rates. *Plant and Soil*, 186(2), 331-341.

- Itakura, M., Saeki, K., Omori, H., Yokoyama, T., Kaneko, T., Tabata, S. & Minamisawa, K. (2009). Genomic comparison of *Bradyrhizobium japonicum* strains with different symbiotic nitrogen-fixing capabilities and other *Bradyrhizobiaceae* members. *The ISME journal*, 3(3), 326-339.
- Jensen, E., Peoples, M., Boddey, R., Gresshoff, P., Hauggaard-Nielsen, H., Alves, B. & Morrison, M. (2012). Legumes for mitigation of climate change and the provision of feedstock for biofuels and biorefineries. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(2), 329-364.
- Jiménez-Zurdo, J., Fernández-López, M., Martínez-Abarca, F. & Toro, N. (2006). Genómica de endosimbiontes diazotróficos. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada, 53-63.
- Jones, K., Kobayashi, H., Davies, B., Taga, M. & Walker, G. (2007). How rhizobial symbionts invade plants: the *Sinorhizobium*-Medicago model. *Nature Reviews Microbiology*, 5(8), 619-633.
- Jordan, D. (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.*, 32, 136- 139.
- Judd, A., Schneider, M., Sadowsky, M. & de Bruijn, F. (1993). Use of repetitive sequences and the polymerase chain reaction technique to classify genetically related *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1702-1708.
- Kaluza, K., Hahn, M. & Hennecke, H. (1985). Repeated sequences similar to insertion elements clustered around the *nif* region of the *Rhizobium japonicum* genome. *Journal of bacteriology*, 162(2), 535-542.
- Kambara, K., Ardissone, S., Kobayashi, H., Saad, M., Schumpp, O., Broughton, W. & Deakin, W. (2009). Rhizobia utilize pathogen-like effector proteins during symbiosis. *Molecular microbiology*, 71(1), 92-106.
- 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 USDA6T. *Genes*, 2(4), 763-787.
- Kaneko, T., Nakamura, Y., Sato, S., Asamizu, E., Kato, T., Sasamoto, S., Watanabe, A., Idesawa, K., Ishikawa, A., Kawashima, K., Kimura, Y., Kiyokawa, C., Kohara, M., Matsumoto, M., Matsuno, A., Mochizuki, Y., Nakayama, S., Nakazaki, N., Shimpo, S., Sugimoto, M., Takeuchi, C., Yamada, M. & Tabata, S. (2000). Complete genome

- structure of the nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Mesorhizobium loti*. *DNA research*, 7(6), 331-338.
- 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 research*, 9(6), 189-197.
- Kaschuk, G., Hungria, M., Andrade, D. & Campo, R. (2006). Genetic diversity of rhizobia associated with common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) grown under no-tillage and conventional systems in Southern Brazil. *Applied Soil Ecology*, 32 (2), 210-220.
- Kennedy, A. (2005) Rhizosphere. Principles and Applications of Soil Microbiology (2<sup>nd</sup> Ed) (Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P & Zuberer D, Eds), pp. 242-262. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Kereszt A., Mergaert P. & Kondorosi, E. (2011). Bacteroid development in legume nodules: evolution of mutual benefit or of sacrificial victims?. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, 24(11), 1300-1309.
- Kerstens, K. & Vancanneyt, M. (2005). *Bergey's manual of systematic bacteriology*.
- Keyser, H. & Griffin, R. (1987). Beltsville *Rhizobium* culture collection catalog. *Publ./US. Dep. of agriculture, Agr. research service*.
- Keyser, H., Bohlool, B., Hu, T. & Weber, D. (1982). Fast-growing rhizobia isolated from root nodules of soybean. *Science*, 215 (4540), 1631-1632.
- Kim, M., Oh, H., Park, S. & Chun, J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and *16S rRNA* gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt 2), 346-351.
- Knight, C., Rossen, L., Robertson, J., Wells, B. & Downie, J. (1986). Nodulation inhibition by *Rhizobium leguminosarum* multicopy *nodABC* genes and analysis of early stages of plant infection. *Journal of bacteriology*, 166(2), 552-558.
- Koeth, T., Versalovic, J. & Lupski, J. (1995). Differential subsequence conservation of interspersed repetitive *Streptococcus pneumoniae* BOX elements in diverse bacteria. *Genome Research*, 5(4), 408-418.
- Konstantinidis, K., Ramette, A. & Tiedje, J. (2006). The bacterial species definition in the genomic era. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1475), 1929-1940.

- Kosslak, R., Bookland, R., Barkei, J., Paaren, H. & Appelbaum, E. (1987). Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common *nod* genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7428-7432.
- Krause, A., Doerfel, A. & Göttfert, M. (2002). Mutational and transcriptional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular plant-microbe interactions*, 15(12), 1228-1235.
- Krishnan, H. & Pueppke, S. (1993). Flavonoid inducers of nodulation genes stimulate *Rhizobium fredii* USDA257 to export proteins into the environment. *Molecular plant-microbe interactions*, 6, 107-107.
- Krishnan, H., Lorio, J., Kim, W., Jiang, G., Kim, K., DeBoer, M. & Pueppke, S. (2003). Extracellular proteins involved in soybean cultivar-specific nodulation are associated with pilus-like surface appendages and exported by a type III protein secretion system in *Sinorhizobium fredii* USDA257. *Molecular plant-microbe interactions*, 16(7), 617-625.
- Kundu, S., Trent, J. & Hargrove, M. (2003). Plants, humans and hemoglobins. *Trends in plant science*, 8(8), 387-393.
- Kuykendall, L. (2005). *Bradyrhizobium* Jordan 1982, 137 VP. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*, 438-443.
- Kuykendall, L., Barnett, M. & Mathis, J. (1997). Duplication of DNA regions carrying repetitive sequence RSc in *Bradyrhizobium japonicum* 110. *Letters in applied microbiology*, 25(6), 410-414.
- Kuykendall, L., Roy, M., O'Neill, J. & Devine, T. (1988). Fatty acids, antibiotic resistance, and deoxyribonucleic acid homology groups of *Bradyrhizobium japonicum*. *International journal of systematic bacteriology*, 38(4), 358-361.
- Kuykendall, L., Saxena, B., Devine, T. & Udell, S. (1992). Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* Jordan 1982 and a proposal for *Bradyrhizobium elkanii* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(6), 501-505.
- Kwon, S., Park, J., Kim, J., Kang, J., Cho, Y., Lim, C., Parker, M. & Lee, G. (2005). Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of *16S rRNA* gene and internally transcribed spacer region sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(1), 263-270.
- Laguerre, G., Nour, S., Macheret, V., Sanjuan, J., Drouin, P. & Amarger, N. (2001). Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close

- phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology*, 147(4), 981-993.
- Lang, K., Lindemann, A., Hauser, F. & Göttfert, M. (2008). The genistein stimulon of *Bradyrhizobium japonicum*. *Molecular Genetics and Genomics*, 279(3), 203-211.
- Lewis, G., Schrire, B. & Lock, M. (Eds.). (2005). *Legumes of the World* (p. 592). Kew: Royal Botanic Gardens.
- Li, Q., Wang, E., Zhang, Y., Zhang, Y., Tian, C., Sui, X., Chen, W. & Chen, W. (2011). Diversity and biogeography of rhizobia isolated from root nodules of *Glycine max* grown in Hebei Province, China. *Microbial ecology*, 61(4), 917-931.
- Lindemann, A., Moser, A., Pessi, G., Hauser, F., Friberg, M., Hennecke, H. & Fischer, H. (2007). New target genes controlled by the *Bradyrhizobium japonicum* two-component regulatory system RegSR. *Journal of bacteriology*, 189(24), 8928-8943.
- Liu, C., McLean, P., Sookdeo, C. & Cannon, F. (1991). Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(6), 1799-1804.
- Lloret, L. & Martínez-Romero, E. (2005). Evolución y filogenia de *Rhizobium*. *Rev. Latinoam. Microbiol*, 47(1-2), 43-60.
- Lodeiro, A. (2014). How Flagella Expression May be Regulated by the Carbon and Energy Source? *SOJ Biochemistry*, DOI: <http://dx.doi.org/10.15226/2376-4589/1/100104>.
- Loh, J. & Stacey, G. (2003). Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 10-17.
- Loh, J., Garcia, M. & Stacey, G. (1997). NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology*, 179(9), 3013-3020.
- Loh, J., Lohar, D., Andersen, B. & Stacey, G. (2002). A two-component regulator mediates population-density-dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Journal of bacteriology*, 184(6), 1759-1766.
- Loh, J., Yuen, J., Stacey, M. & Stacey, G. (1999). Unique aspects of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. In *Highlights of Nitrogen Fixation Research* (pp. 115-120). Springer US.

- Loh, J., Yuen-Tsai, J., Stacey, M., Lohar, D., Welborn, A. & Stacey, G. (2001). Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Molecular microbiology*, 42(1), 37-46.
- Lohrke, S., Madrzak, C., Hur, H., Judd, A., Orf, J. & Sadowsky, M. (2000). Inoculum density-dependent restriction of nodulation in the soybean-*Bradyrhizobium japonicum* symbiosis. *Symbiosis (Rehovot)*, 29(1), 59-70.
- López, S. & Balatti, P. (2012). Closely related strains of *Bradyrhizobium* contained in commercial inoculates of soybean are identified by a set of PCR reactions. *Genetic Engineering and Biotechnology Journal*, 2011. GEBJ-34.
- López, S., Pastorino, G. & Balatti, P. (2010). *Bradyrhizobium japonicum* and *Bradyrhizobium elkanii* isolates recovered from soils cultured with soybean in a zero tillage management. The 21<sup>st</sup> North American Symbiotic Nitrogen Fixation Conference. June 13 - 18, 2010 Christopher S. Bond Life Sciences Center University of Missouri-Columbia, MO USA
- López, S., Pastorino, G., Martínez-Alcántara, V., Salvucci, D. & Balatti, P., (2013). Los rizobios que nodulan soja en sitios con ambientes nativos y cultivados de la Argentina. *Microbiología Agrícola: un aporte de la investigación en Argentina*. 2<sup>a</sup> ed.- Tucumán: Magna Publicaciones, 2013:237-252.
- López-García, S., Vázquez, T., Favelukes, G. & Lodeiro, A. (2002). Rhizobial position as a main determinant in the problem of competition for nodulation in soybean. *Environmental microbiology*, 4(4), 216-224.
- Loureiro, M., Kaschuk, G., Alberton, O. & Hungria, M. (2007). Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] rhizobial diversity in Brazilian oxisols under various soil, cropping, and inoculation managements. *Biology and Fertility of Soils*, 43 (6), 665-674.
- Lupski, J. & Weinstock, G. (1992). Short, interspersed repetitive DNA sequences in prokaryotic genomes. *Journal of bacteriology*, 174(14), 4525.
- Ma, W., Charles, T. & Glick, B. (2004). Expression of an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase gene in *Sinorhizobium meliloti* increases its ability to nodulate alfalfa. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 5891-5897.
- Ma, W., Sebastianova, S., Sebastian, J., Burd, G., Guinel, F. & Glick, B. (2003<sup>a</sup>). Prevalence of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase in *Rhizobium spp.* *Antonie Van Leeuwenhoek*, 83(3), 285-291.
- Marçon Delamuta, J., Ribeiro, R., Ormeño-Orrillo, E., Soares Melo, I., Martínez-Romero, E. & Hungria, M., (2013). Polyphasic evidence supporting the reclassification of

- Bradyrhizobium japonicum* group Ia strains as *Bradyrhizobium diazoefficiens* sp. Nov. *International Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63, 3342-3351.
- Marie, C., Deakin, W. J., Viprey, V., Kopcińska, J., Golinowski, W., Krishnan, H., Perret, X. & Broughton, W. (2003). Characterization of Nops, nodulation outer proteins, secreted via the type III secretion system of NGR234. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 16(9), 743-751.
- Martin, B., Humbert, O., Camara, M., Guenzi, E., Walker, J., Mitchell, T., Andrew, P., Prudhomme, M., Alloing, G., Hakenbeck, R., Morrison, D., Boulnois, G. & Claverys, J. (1992). A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic acids research*, 20(13), 3479-3483.
- Martinez, E., Poupot, R., Promé, J. C., Pardo, M. A., Segovia, L., Truchet, G. & Dénarié, J. (1993). Chemical signaling of *Rhizobium* nodulating bean. In *New horizons in nitrogen fixation* (pp. 171-175). Springer Netherlands.
- Martínez-Romero, E. (2009). Coevolution in Rhizobium-legume symbiosis? *DNA and cell biology*, 28(8), 361-370.
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X. & Batut, J. (2009). Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *rhizobium* recipes?. *Trends in microbiology*, 17(10), 458-466.
- Matthews, E. & Hammond, A. (1999). Critical consumption trends and implications. *World Resources Institute*, 1-30.
- Mayr, E. (1970). *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution*. Harvard University Press.
- Meksem, K., Njiti, V., Banz, W., Iqbal, M., Kassem, M., Hyten, D., Yuang, J., Winters, T. & Lightfoot, D. (2001). Genomic regions that underlie soybean seed isoflavone content. *BioMed Research International*, 1(1), 38-44.
- Melchiorre, M., De Luca, M., Anta, G., Suarez, P., Lopez, C., Lascano, R. & Racca, R. (2011). Evaluation of bradyrhizobia strains isolated from field-grown soybean plants in Argentina as improved inoculants. *Biology and Fertility of Soils*, 47(1), 81-89.
- Menna, P., Barcellos, F. & Hungria, M. (2009). Phylogeny and taxonomy of a diverse collection of *Bradyrhizobium* strains based on multilocus sequence analysis of the

- 16S rRNA* gene, ITS region and *glnII*, *recA*, *atpD* and *dnaK* genes. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 59(12), 2934-2950.
- Menna, P., Hungria, M., Barcellos, F., Bangel, E., Hess, P. & Martínez-Romero, E. (2006). Molecular phylogeny based on the *16S rRNA* gene of elite rhizobial strains used in Brazilian commercial inoculants. *Systematic and Applied Microbiology*, 29(4), 315-332.
- Menna, P., Pereira, A., Bangel, E. & Hungria, M. (2009). Rep-PCR of tropical rhizobia for strain fingerprinting, biodiversity appraisal and as a taxonomic and phylogenetic tool. *Symbiosis*, 48(1-3), 120-130.
- Mesa, S., Hauser, F., Friberg, M., Malaguti, E., Fischer, H. & Hennecke, H. (2008). Comprehensive assessment of the regulons controlled by the FixLJ-FixK<sub>2</sub>-FixK<sub>1</sub> cascade in *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of bacteriology*, 190(20), 6568-6579.
- Miller, M. & Bassler, B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
- Minamisawa, K., Isawa, T., Nakatsuka, Y. & Ichikawa, N. (1998). New *Bradyrhizobium japonicum* strains that possess high copy numbers of the repeated sequence RS $\alpha$ . *Applied and environmental microbiology*, 64(5), 1845-1851.
- Minamisawa, K., Nakatsuka, Y. & Isawa, T. (1999). Diversity and field site variation of indigenous populations of soybean bradyrhizobia in Japan by fingerprints with repeated sequences RS $\alpha$  and RS $\beta$ . *FEMS microbiology ecology*, 29(2), 171-178.
- Minamisawa, K., Seki, T., Onodera, S., Kubota, M. & Asami, T. (1992). Genetic relatedness of *Bradyrhizobium japonicum* field isolates as revealed by repeated sequences and various other characteristics. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2832-2839.
- Mithöfer, A. (2002). Suppression of plant defence in rhizobia-legume symbiosis. *Trends in plant science*, 7(10), 440-444.
- Moorman, T., Becerril, J., Lydon, J. & Duke, S. (1992). Production of hydroxybenzoic acids by *Bradyrhizobium japonicum* strains after treatment with glyphosate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(2), 289-293.
- Morett, E., Fischer, H., & Hennecke, H. (1991). Influence of oxygen on DNA binding, positive control, and stability of the *Bradyrhizobium japonicum* NifA regulatory protein. *Journal of bacteriology*, 173(11), 3478-3487.
- Morris, C. & Monier, J. (2003). The ecological significance of biofilm formation by plant-associated bacteria. *Annual review of phytopathology*. 41, 429-53.

- Moulin, L., Béna, G., Boivin-Masson, C. & Stępkowski, T. (2004). Phylogenetic analyses of symbiotic nodulation genes support vertical and lateral gene co-transfer within the *Bradyrhizobium* genus. *Molecular phylogenetics and evolution*, 30(3), 720-732.
- Moulin, L., Munive, A., Dreyfus, B. & Boivin-Masson, C. (2001). Nodulation of legumes by members of the  $\beta$ -subclass of Proteobacteria. *Nature*, 411(6840), 948-950.
- Munoz, V., Ibanez, F., Tonelli, M., Valetti, L., Anzuay, M. & Fabra, A. (2011). Phenotypic and phylogenetic characterization of native peanut *Bradyrhizobium* isolates obtained from Córdoba, Argentina. *Systematic and applied microbiology*, 34(6), 446-452.
- Murset, V., Hennecke, H. & Pessi, G. (2012). Disparate role of rhizobial ACC deaminase in root-nodule symbioses. *Symbiosis*, 57(1), 43-50.
- Myrold, D. (2005) Transformations of nitrogen. Principles and Applications of Soil Microbiology (2<sup>nd</sup> Ed) (Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P & Zuberer D, Eds), pp. 333-372. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Nakatsu, C. (2005) Microbial Genetics. Principles and Applications of Soil Microbiology (2<sup>nd</sup> ed) (Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P & Zuberer D, eds), pp. 85-98. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.
- Nascimento, F., Brígido, C., Glick, B., Oliveira, S. & Alho, L. (2012). *Mesorhizobium ciceri* LMS-1 expressing an exogenous 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase increases its nodulation abilities and chickpea plant resistance to soil constraints. *Letters in applied microbiology*, 55(1), 15-21.
- Nellen-Anthamatten, D., Rossi, P., Preisig, O., Kullik, I., Babst, M., Fischer, H. & Hennecke, H. (1998). *Bradyrhizobium japonicum* FixK<sub>2</sub>, a crucial distributor in the FixLJ-dependent regulatory cascade for control of genes inducible by low oxygen levels. *Journal of bacteriology*, 180(19), 5251-5255.
- Noel, K. & Brill, W. (1980). Diversity and dynamics of indigenous *Rhizobium japonicum* populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 40(5), 931-938.
- Nomura, M., Arunothayanan, H., Van dao, T., Le, H., Kaneko, T., Sato, S., Satoshi, T. & Tajima, S. (2010). Differential protein profiles of *Bradyrhizobium japonicum* USDA110 bacteroid during soybean nodule development. *Soil Science & Plant Nutrition*, 56(4), 579-590.
- Obaton, M., Bouniols, A., Piva, G. & Vadez, V. (2002). Are *Bradyrhizobium japonicum* stable during a long stay in soil?. *Plant and soil*, 245(2), 315-326.

- Okazaki, S., Zehner, S., Hempel, J., Lang, K. & Göttfert, M. (2009). Genetic organization and functional analysis of the type III secretion system of *Bradyrhizobium elkanii*. *FEMS microbiology letters*, 295(1), 88-95.
- Okubo, T., Fukushima, S., Itakura, M., Oshima, K., Longtonglang, A., Teaumroong, N., Mitsui, H., Hattori, M., Hattori, R., Hattori, T. & Minamisawa, K. (2013). Genome analysis suggests that the soil oligotrophic bacterium *Agromonas oligotrophica* (*Bradyrhizobium oligotrophicum*) is a nitrogen-fixing symbiont of *Aeschynomene indica*. *Applied and environmental microbiology*, 79(8), 2542-2551.
- Oldroyd, G. & Downie, J. (2008). Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 519-546.
- Olivares, J., Bedmar, E. & Sanjuán, J. (2013). Biological nitrogen fixation in the context of global change. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(5), 486-494.
- O'Toole, G., Kaplan, H. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Parker, M. & Kennedy, D. (2006). Diversity and relationships of bradyrhizobia from legumes native to eastern North America. *Canadian journal of microbiology*, 52(12), 1148-1157.
- Parker, M., Lafay, B., Burdon, J. & Van Berkum, P. (2002). Conflicting phylogeographic patterns in *rRNA* and *nifD* indicate regionally restricted gene transfer in *Bradyrhizobium*. *Microbiology*, 148(8), 2557-2565.
- Pastorino, G., Alcántara, V. & Balatti, P. (2003). Identification of fast and slow growing rhizobia nodulating soybean (*Glycine max* [L.] Merr) by a multiplex PCR reaction. *FEMS microbiology letters*, 229(2), 153-158.
- Pastorino, G., De Titto, C., López, S. & Balatti, P. (2011). Respuesta de las poblaciones de rizobios de soja del suelo al manejo de cultivos. Quinto Congreso de Soja del Mercosur – Primer Foro de la Soja Asia – Mercosur. [http://www.acsoja.org.ar/images/cms/contenidos/332\\_b.pdf](http://www.acsoja.org.ar/images/cms/contenidos/332_b.pdf).
- Pena-Cabriales, J. & Alexander, M. (1983). Growth of *Rhizobium* in soil amended with organic matter. *Soil Science Society of America Journal*, 47 (2), 241-245.
- 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(1), 1-10.
- Pérez-Giménez, J., Lodeiro, A. & Quelas, J. (2011). *Competition for nodulation*. INTECH Open Access Publisher.

- Pérez-Giménez, J., Mongiardini, E., Althabegoiti, M., Covelli, J., Quelas, J., López-García, S. & Lodeiro, A. (2009). Soybean lectin enhances biofilm formation by *Bradyrhizobium japonicum* in the absence of plants. *International journal of microbiology*, 1-8.
- Pérez-Montaño, F., Alías-Villegas, C., Bellogín, R., Del Cerro, P., Espuny, M., Jiménez-Guerrero, I., López-Baena, F. & Cubo, T. (2014). Plant growth promotion in cereal and leguminous agricultural important plants: From microorganism capacities to crop production. *Microbiological research*, 169(5), 325-336.
- Pérez-Ramírez, N., Rogel, M., Wang, E., Castellanos, J. & Martínez-Romero, E. (1998). Seeds of *Phaseolus vulgaris* bean carry *Rhizobium etli*. *FEMS Microbiology Ecology*, 26(4), 289-296.
- Perticari, A., Parra, R., Balatti, P., Fiqueni, M. & Rodríguez Cáceres, E. (1996) Selección de cepas de *Bradyrhizobium japonicum*, *B. elkanii* y *Sinorhizobium fredii* para la inoculación de soja. Memorias de la XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología, Santa Cruz de La Sierra, Bolivia, pp 103–104.
- Perticari, A., Puente, M., Echegaray, R. & Piccinetti, C. (2007). Uso eficiente de los inoculantes y de la fijación biológica de nitrógeno. De la biología del suelo a la agricultura (Thuar A, Cassan F, & Olmedo C, eds), pp. 53-64. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina.
- Pessi, G., Ahrens, C., Rehrauer, H., Lindemann, A., Hauser, F., Fischer, H. & Hennecke, H. (2007). Genome-wide transcript analysis of *Bradyrhizobium japonicum* bacteroids in soybean root nodules. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(11), 1353-1363.
- Piccinetti, C., Arias, N., Ventimiglia, L., Díaz Zorita, M., Murua, L., Sanchez, H., Ferraris, G., Mousegne, F., Fontanetto, H., Sá Pereira, E., Capurro, J., Rnerico, J., López, C., Carrizo, A., Salvagiotti, F., Collino, D. & Perticari, A. (2013). Efectos positivos de la inoculación de soja sobre la nodulación, la FBN y en los parámetros de producción del cultivo. *Microbiología Agrícola: un aporte de la investigación en Argentina*. 2<sup>a</sup> ed.- Tucumán: Magna Publicaciones, 2013:237-252.
- Piñero, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *Capital natural de México*, 1, 437-494.
- Preisig, O., Zufferey, R. & Hennecke, H. (1996). The *Bradyrhizobium japonicum* *fixGHIS* genes are required for the formation of the high-affinity *ccb3*-type cytochrome oxidase. *Archives of microbiology*, 165(5), 297-305.

- Prévost, D. & Bromfield, E. (2003). Diversity of symbiotic rhizobia resident in Canadian soils. *Canadian journal of soil science*, 83(Special Issue), 311-319.
- Rademaker, J., Louws, F., Schultz, M., Rossbach, U., Vauterin, L., Swings, J. & De Bruijn, F. (2005). A comprehensive species to strain taxonomic framework for *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 95(9), 1098-1111.
- Rao, J. & Cooper, J. (1995). Soybean nodulating rhizobia modify nod gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 855-862.
- Rappé, M. & Giovannoni, S. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.
- Raymond, J., Siefert, J., Staples, C. & Blankenship, R. (2004). The natural history of nitrogen fixation. *Molecular Biology and Evolution*, 21(3), 541-554.
- Richter, M. & Rosselló-Móra, R. (2009). Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(45), 19126-19131.
- Rinaudi, L. & Giordano, W. (2010). An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS microbiology letters*, 304 (1), 1-11.
- Rodríguez-Navarro, D., Dardanelli, M. & Ruíz-Saíenz, J. (2007). Attachment of bacteria to the roots of higher plants. *FEMS microbiology letters*, 272(2), 127-136.
- Rodríguez-Quinones, F., Judd, A., Sadowsky, M., Liu, R. & Cregan, P. (1992). Hyperreiterated DNA regions are conserved among *Bradyrhizobium japonicum* serocluster 123 strains. *Applied and environmental microbiology*, 58(6), 1878-1885.
- Rohlf, F. (1992). *NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system*. *Applied Biostatistics*.
- Rossello-Mora, R. & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- Saad, M., Kobayashi, H., Marie, C., Brown, I., Mansfield, J., Broughton, W. & Deakin, W. (2005). NopB, a type III secreted protein of *Rhizobium sp.* strain NGR234, is associated with pilus-like surface appendages. *Journal of bacteriology*, 187(3), 1173-1181.
- Sadowsky, M., Cregan, P., Gottfert, M., Sharma, A., Gerhold, D., Rodríguez-Quinones, F., Keyser, H., Hennecke, H. & Stacey, G. (1991). The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(2), 637-641.

- Saldaña, G., Martinez-Alcántara, V., Vinardell, J., Bellogín, R., Ruíz-Sainz, J. & Balatti, P. (2003). Genetic diversity of fast-growing rhizobia that nodulate soybean (*Glycine max* L. Merr). *Archives of microbiology*, 180(1), 45-52.
- Salvucci, D., Aulicino, M., Hungria, M. & Balatti, P. (2011). Nodulation capacity of Argentinean soybean (*Glycine max* L. Merr) cultivars inoculated with commercial strains of *Bradyrhizobium japonicum*. *American Journal of Plant Sciences*, 2012(3),130-140.
- Samac, D. & Graham, M. (2007). Recent advances in legume-microbe interactions: recognition, defense response, and symbiosis from a genomic perspective. *Plant Physiology*, 144(2), 582-587.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*.
- Sameshima, R., Isawa, T., Sadowsky, M., Hamada, T., Kasai, H., Shutsrirung, A., Mitsui, H. & Minamisawa, K. (2003). Phylogeny and distribution of extra-slow-growing *Bradyrhizobium japonicum* harboring high copy numbers of RS $\alpha$  RS $\beta$  and IS1631. *FEMS Microbiology Ecology*, 44, 191-202.
- Sanchez-Contreras, M., Bauer, W., Gao, M., Robinson, J. & Downie, J. (2007). Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362(1483), 1149-1163.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Sanjuan, J., Grob, P., Göttfert, M., Hennecke, H. & Stacey, G. (1994). NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 7(3), 364-369.
- Satterlee, J., Suquet, C., Bidwai, A., Erman, J., Schwall, L. & Jimenez, R. (2008). Mass instability in isolated recombinant FixL heme domains of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biochemistry*, 47(6), 1540-1553.
- Schechter, L., Guenther, J., Olcay, E., Jang, S. & Krishnan, H. (2010). Translocation of NopP by *Sinorhizobium fredii* USDA257 into *Vigna unguiculata* root nodules. *Applied and environmental microbiology*, 76(11), 3758-3761.
- Schmidt, P., Broughton, W. & Werner, D. (1994). Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *MPMI-Molecular Plant Microbe Interactions*, 7( 3), 384-390.

- Schultze, M. & Kondorosi, A. (1998). Regulation of symbiotic root nodule development. *Annual review of genetics*, 32(1), 33-57.
- Schumpp, O. & Deakin, W. (2010). How inefficient rhizobia prolong their existence within nodules. *Trends in plant science*, 15(4), 189-195.
- Seneviratne, G., Weerasekara, M., Seneviratne, K., Zavahir, J., Kecskés, M. & Kennedy, I. (2011). Importance of biofilm formation in plant growth promoting rhizobacterial action. In *Plant growth and health promoting bacteria* (pp. 81-95). Springer Berlin Heidelberg.
- Shah, V. & Brill, W. (1977). Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(8), 3249-3253.
- Silva, C. & Vinuesa, P. (2007). Ecología evolutiva de bacterias y el concepto de especie: el caso de los Rizobios. *Eguiarte, LE, V. Souza y X. Aguirre (Comps.): Ecología Molecular. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México*, 351-392.
- Siqueira, A., Ormeño-Orrillo, E., Souza, R., Rodrigues, E., Almeida, L., Barcellos, F., Silva Batista, J., Nakatani, A., Martínez-Romero, E., Vasconcelos, A. & 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(1), 420.
- Smit, G., Puvanesarajah, V., Carlson, R., Barbour, W. & Stacey, G. (1992). *Bradyrhizobium japonicum nodD1* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. *Journal of Biological Chemistry*, 267(1), 310-318.
- Sneath, P. & Sokal, R. (1973). *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*.
- Somasegaran, P. & Hoben, H. (1985). *Methods in legume-Rhizobium technology*. University of Hawaii NifTAL Project and MIRCEN, Department of Agronomy and Soil Science, Hawaii Institute of Tropical Agriculture and Human Resources, College of Tropical Agriculture and Human Resources.
- Sorroche, F., Rinaudi, L., Zorreguieta, Á. & Giordano, W. (2010). EPS II-dependent autoaggregation of *Sinorhizobium meliloti* planktonic cells. *Current microbiology*, 61(5), 465-470.
- Sorroche, F., Spesia, M., Zorreguieta, Á. & Giordano, W. (2012). A positive correlation between bacterial autoaggregation and biofilm formation in native *Sinorhizobium*

- meliloti* isolates from Argentina. *Applied and environmental microbiology*, 78(12), 4092-4101.
- Spaink, H. P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G. V., Lugtenberg, B. J. & Kennedy, E. P. (1992). Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol Plant Microbe Interact*, 5, 72-80.
- Stackebrandt, E. & Goebel, B. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and *16S rRNA* sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(4), 846-849.
- Stanley, N. & Lazazzera, B. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular microbiology*, 52(4), 917-924.
- Stukenbrock, E. & McDonald, B. (2008). The origins of plant pathogens in agroecosystems. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 75-100.
- Subramanian, S., Stacey, G. & Yu, O. (2006). Endogenous isoflavones are essential for the establishment of symbiosis between soybean and *Bradyrhizobium japonicum*. *The Plant Journal*, 48(2), 261-273.
- Sullivan, J., Patrick, H., Lowther, W., Scott, D. & Ronson, C. (1995). Nodulating strains of *Rhizobium loti* arise through chromosomal symbiotic gene transfer in the environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(19), 8985-8989.
- Terpolilli, J., Hood, G. & Poole, P. (2012). What determines the efficiency of N<sub>2</sub>-fixing *Rhizobium*-legume symbioses? *Advances in microbial physiology*, 60, 326.
- Torres, A. R., Kaschuk, G., Saridakis, G. P. & Hungria, M. (2012). Genetic variability in *Bradyrhizobium japonicum* strains nodulating soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28 (4), 1831-1835.
- Torres, D., Revale, S., Obando, M., Maroniche, G., Paris, G., Peticari, A., Vazquez, M., Wisniewski-Dyé, F., Martínez-Abarca, F. & Cassán, F. (2015). Genome sequence of *Bradyrhizobium japonicum* E109, one of the most agronomically used nitrogen-fixing rhizobacteria in Argentina. *Genome announcements*, 3(1), e01566-14.
- Udvardi, M. & Poole, P. (2013). Transport and metabolism in legume-rhizobia symbioses. *Annual review of plant biology*, 64, 781-805.
- Vachot-Griffin, A. & Thies, J. E. (2005). Fingerprinting the Australian rhizobial inoculant mother cultures using refined PCR protocols yields beneficial inoculant management applications. *Animal Production Science*, 45(3), 141-150.

- Vairinhos, F., Wallace, W. & Nicholas, D. (1989). Simultaneous assimilation and denitrification of nitrate by *Bradyrhizobium japonicum*. *Journal of general microbiology*, 135(1), 189-193.
- Van Belkum, A., Scherer, S., Van Alphen, L. & Verbrugh, H. (1998). Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(2), 275-293.
- van Rhijn, P. & Vanderleyden, J. (1995). The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiological reviews*, 59(1), 124-142.
- Vasse, J., Billy, F. & Truchet, G. (1993). Abortion of infection during the *Rhizobium meliloti*—alfalfa symbiotic interaction is accompanied by a hypersensitive reaction. *The Plant Journal*, 4(3), 555-566.
- Velázquez, E., Mateos, P., Trujillo, M., Rivas, R. & Martínez-Molina, E. (2006). Diversidad de bacterias rizoendosimbióticas de plantas. Fijación de nitrógeno: fundamentos y aplicaciones, Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Universidad de Granada, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Granada, 45-52.
- Versalovic, J., Koeth, T. & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic acids research*, 19(24), 6823-6831.
- Versalovic, J., Koeth, T., Zhang, Y., McCabe, E. & Lupski, J. (1992). Quality control for bacterial inhibition assays: DNA fingerprinting of microorganisms by rep-PCR. *Screening*, 1(3), 175-183.
- Vicario, J., Dardanelli, M., & Giordano, W. (2015). Swimming and swarming motility properties of peanut-nodulating rhizobia. *FEMS microbiology letters*, 362(2), 1-6.
- Vincent, J. (1970). A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. *A manual for the practical study of the root-nodule bacteria*.
- Vinuesa, P. & Silva, C. (2004). Species delineation and biogeography of symbiotic bacteria associated with cultivated and wild legumes. In: Werner D (Ed) Biological resources and migration. Springer, Berlin, pp 143–161.
- Vinuesa, P., Leon-Barrios, M., Silva, C., Willems, A., Jarabo-Lorenzo, A., Perez-Galdona, R., Werner, D. & Martinez-Romero, E. (2005<sup>a</sup>). *Bradyrhizobium canariense* sp. nov., an acid-tolerant endosymbiont that nodulates endemic genistoid legumes (Papilionoideae: Genisteae) from the Canary Islands, along with *Bradyrhizobium japonicum* bv. *genistearum*, *Bradyrhizobium* genospecies alpha and *Bradyrhizobium* genospecies beta. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 55, 569–575.

- Vinuesa, P., Rojas-Jiménez, K., Contreras-Moreira, B., Mahna, S., Prasad, B., Moe, H., Selvaraju, B., Thierfelder, H. & Werner, D. (2008). Multilocus sequence analysis for assessment of the biogeography and evolutionary genetics of four *Bradyrhizobium* species that nodulate soybeans on the Asiatic continent. *Applied and environmental microbiology*, 74(22), 6987-6996.
- Viprey, V., Del Greco, A., Golinowski, W., Broughton, W. J. & Perret, X. (1998). Symbiotic implications of type III protein secretion machinery in *Rhizobium*. *Molecular microbiology*, 28(6), 1381-1389.
- Vitousek, P., Aber, J., Howarth, R., Likens, G., Matson, P., Schindler, D., Schlessinger, H. & Tilman, D. (1997). Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. *Ecological applications*, 7(3), 737-750.
- Ward, D. (1998). A natural species concept for prokaryotes. *Current opinion in microbiology*, 1(3), 271-277.
- Wassem, R., Kobayashi, H., Kambara, K., Le Quéré, A., Walker, G., Broughton, W. & Deakin, W. (2008). TtsI regulates symbiotic genes in *Rhizobium* species NGR234 by binding to *tts* boxes. *Molecular microbiology*, 68(3), 736-748.
- Wei, M., Yokoyama, T., Minamisawa, K., Mitsui, H., Itakura, M., Kaneko, T., Tabata, S., Saeki, K., Omori, H., Tajima, S., Uchiumi, T., Abe, M. & Ohwada, T. (2008). Soybean seed extracts preferentially express genomic loci of *Bradyrhizobium japonicum* in the initial interaction with soybean, *Glycine max* (L.) Merr. *DNA research*, 15(4), 201-214.
- Wenzel, M., Friedrich, L., Göttfert, M. & Zehner, S. (2010). The type III-secreted protein NopE1 affects symbiosis and exhibits a calcium-dependent autocleavage activity. *Molecular plant-microbe interactions*, 23(1), 124-129.
- Willems, A., Munive, A., de Lajudie, P. & Gillis, M. (2003). In most *Bradyrhizobium* groups sequence comparison of 16S-23S rDNA internal transcribed spacer regions corroborates DNA-DNA hybridizations. *Systematic and applied microbiology*, 26(2), 203-210.
- Wu, L., Wang, H., Wang, E., Chen, W. & Tian, C. (2011). Genetic diversity of nodulating and non-nodulating rhizobia associated with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. & Zucc.) in different ecoregions of China. *FEMS microbiology ecology*, 76(3), 439-450.
- Xie, F., Murray, J., Kim, J., Heckmann, A., Edwards, A., Oldroyd, G. & Downie, J. (2012). Legume pectate lyase required for root infection by rhizobia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(2), 633-638.

- Xu, L., Ge, C., Cui, Z., Li, J. & Fan, H. 1995. *Bradyrhizobium liaoningense* sp. nov., isolated from the root nodules of soybeans. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 45, 706–711.
- Yang, J., Zhang, W., Yuan, T. & Zhou, J. (2006). Genotypic characteristics of the *rrn* operon and genome of indigenous soybean bradyrhizobia in cropping zones of China. *Canadian journal of microbiology*, 52(10), 968-976.
- Yokoyama, T., Tomooka, N., Okabayashi, M., Kaga, A., Boonkerd, N. & Vaughan, D. (2006). Variation in the nod gene RFLPs, nucleotide sequences of 16S rRNA genes, Nod factors, and nodulation abilities of *Bradyrhizobium* strains isolated from Thai *Vigna* plants. *Canadian journal of microbiology*, 52(1), 31-46.
- Zablotowicz, R. & Reddy, K. (2004). Impact of glyphosate on the symbiosis with glyphosate-resistant transgenic soybean. *Journal of Environmental Quality*, 33(3), 825-831.
- Zablotowicz, R. & Reddy, K. (2007). Nitrogenase activity, nitrogen content, and yield responses to glyphosate in glyphosate-resistant soybean. *Crop Protection*, 26(3), 370-376.
- Zehner, S., Schober, G., Wenzel, M., Lang, K. & Göttfert, M. (2008). Expression of the *Bradyrhizobium japonicum* type III secretion system in legume nodules and analysis of the associated *tts* box promoter. *Molecular plant-microbe interactions*, 21(8), 1087-1093.
- Zhang, T., Shao, M. & Ye, L. (2012). 454 Pyrosequencing reveals bacterial diversity of activated sludge from 14 sewage treatment plants. *The ISME journal*, 6(6), 1137-1147.
- Zhang, X., Yue-Yu, S., Zhang, X., Kai, M. & Herbert, S. (2007). Spatial variability of nutrient properties in black soil of northeast China. *Pedosphere*, 17(1), 19-29.
- Zuberer, D. (2005) Biological dinitrogen fixation: Introduction and nonsymbiotic. Principles and Applications of Soil Microbiology (2<sup>nd</sup> Ed.) (Sylvia D, Fuhrmann J, Hartel P & Zuberer D, Eds), pp. 373-404. Upper Saddle River, NJ: Pearson Prentice Hall.