

Tesis Doctoral  
Año 2004



Universidad Nacional de La Plata  
Facultad de Ciencias Exactas  
Departamento de Ciencias Biológicas



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

**“Interacciones tempranas entre  
*Bradyrhizobium japonicum* y soja: efectos  
de la escasez de N y la distribución de  
los rizobios sobre la raíz.”**

TESIS  
Nº 1054

DOACION.....  
A.....  
Fecha... 16-09-04  
Inv. B..... Inv..... 57160

**Silvina Laura López García**



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

TESIS  
Nº 1054

***El presente trabajo de Tesis para optar al grado de Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas ha sido realizado en el Instituto de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata bajo la dirección de Dr. Aníbal Lodeiro.***

DONACION.....  
▲.....  
Fecha. 18-09-04.....  
Inv. S. inv. B. 57160.....


## CON TODO MI AMOR A CLAUDIO

Mi compañero de la vida, que está siempre incondicionalmente conmigo, que me apoya, me aguanta y me ayuda en todo, por su inagotable paciencia, que me enseña que la vida es más fácil de lo que uno cree. Por todo ese derroche de Amor, Felicidad y Positivismo. Y Fundamentalmente, por estar y hacerme sentir tan bien.

**Con mucho Amor a Zulema y Quito**

que les debo todo lo que soy, por su inmensurable amor, comprensión, ayuda, apoyo, preocupación, por todo lo que me enseñaron y me guiaron, y porque siempre y en cualquier circunstancia están al lado mío.

**GRACIAS MAMA Y PAPA!!!!**



**Mi reconocimiento:**

Al Instituto de Bioquímica y Biología Molecular (IBBM) y a la Facultad de Ciencias Exactas, por haberme brindado el espacio físico para desarrollar este trabajo de Tesis Doctoral y un ámbito propicio para mi crecimiento profesional.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y a la Fundación Antorchas por el otorgamiento de las becas que posibilitaron mi dedicación exclusiva a la investigación científica.

**Mi agradecimiento:**

Al Dr. Aníbal Lodeiro, por dirigir mi trabajo y mi formación académica, por sus enseñanzas, por brindarme su permanente estímulo, ayuda y amistad, por hacerme comprender que la ciencia y la tarea académica son caminos sinuosos que hay que recorrer con perseverancia y paciencia, por sus valiosos consejos e inyecciones de confianza, por recibirme en su laboratorio, aceptar mis limitaciones, permitir y alentar mi crecimiento científico.

Al Prof. Dr. Gabriel Favelukes, por brindarme la posibilidad de obtener la beca de postgrado y por todos sus sabios consejos.

A la Dra. Daniela Hozbor, por su permanente estímulo, apoyo, por los valiosos consejos en forma desinteresada, por toda la energía, empuje, ganas de luchar, amistad y capacidad que emana hacia todos.

Al Prof. Dr. Antonio Lagares por sus consejos y apoyo desinteresado, su buena disposición, su amistad y por hacer que RPS parezca mi lugar de trabajo.

A Tirso Emiliano Vázquez, “mi primer compañerito”, por su gran amistad, por esos buenos momentos inolvidables, esas charlas, mates, anécdotas, consejos, vivencias y alegrías que compartimos durante cuatro años, por su valiosa ayuda en el laboratorio, por toda su locura, su desbordante humor y buena onda, por todos los dibujos buenísimos en especial la tapa de esta Tesis, y por ser “tan Tirso”....

A Ignacio Quelas “Que lujo Teté” y a Elías Mongiardini “Pero que lindo, es lindo”, mis actuales compañeritos, por la amistad, aguante ..... gran aguante sobretodo en estos últimos tiempos, la inmensa ayuda fundamentalmente con los gráficos y compaginación de este trabajo, por enseñarme un glosario de términos imposibles de reproducir en esta tesis, por todos los mates, charlas compartidas, y fundamentalmente por hacerme reír tanto, hacer divertidas mis largas horas en el laboratorio, y por enseñarme que la vida es “Un asiatic Luxe”.

A Julia Althabegoiti por su amistad, su afecto espontáneo, su compañerismo, ayuda y su muy buena disposición.

A María Florencia Del Papa, mi compañera y amiga, por todo su cariño, valiosa amistad, incondicional ayuda, constante preocupación y predisposición permanente, por sus largas charlas, gran fuerza, por el estímulo, por levantarme siempre el ánimo y por estar siempre conmigo y aguantarme tantas veces. Gracias por todo Flor!!!!

A Julieta Fernández y Federico Sisti, por su afecto, compañerismo y amistad, por la buena disposición para ayudarme en cualquier momento y por su constante apoyo.

A Augusto Pich Otero y a Mariano Pistorio, por su compañerismo, amistad y ayuda, por esas horas divertidas y por las buenas SAAIBBM, y por sacarme siempre del flujo a los gritos.

A Walter Draghi por su buena disposición, compañerismo, buena onda, por sus ricos mates y por acompañarme en los malogrados C.C.

A Laura Balagué, María Laura Molinari y Matías Fingermann, por el compañerismo y disponibilidad para ayudarme.

A los profesores Oscar Grau, Victor Romanowski y Mario Aguilar, por los consejos y por permitirme utilizar sus equipos.

A todos mis compañeros del IBBM con los que compartí todos estos años y me ayudaron de una u otra forma: Pedro David Gara, Cecilia Muglia, Pablo Riccilo, Juan Carlos López, Verónica López, Katy López, Mónica Collavino, Germán Robles, Daniel Grasso, Vanina Perez, Omar Riva, Gonzalo Legarreta, Daniel Ghiringuelli, Selma Gago Zachert, María Laura García, Verónica El Mujtar, Diego Posik, Alejandra Manzán, Silvia Moya, Alejandra Tortorici, Eloisa Arana, Christina Mc Carthy, Alejandro Parola, Cecilia Zaneck, Marina Biedma, Eduardo Peña, Eitel Peltzer, Nora Martinez, Karina Reyes, Laura Diberto, Agustín Ure.

A Carlitos Illiano, por todas sus instalaciones eléctricas, a Rubén Bustos por sus lavados y por todas sus botellas de Gatorade y a Catalina López por sus autoclavadas.

Al Ing. Agr. Alejandro Peticari, por su valiosa colaboración en los ensayos a campo y por su buena disposición.

A Cecilia Bernardelli, Flavia Luna, María Lina Galar, Carlos Gallego y Sebastián Cavalitto por la colaboración desinteresada en todo momento, y por esas charlas y mates compartidos.

A María Alejandra Bosch por realizar el espectro de FTIR del Capítulo IV.

Al CINDEFI por permitirme utilizar los equipos y materiales.

A Claudio, por su incondicional amor, apoyo constante, paciencia, y aguante... muchísimo aguante, y mil disculpas por todo el tiempo que este trabajo nos quitó.

A mis padres por su gran amor, su constante apoyo, aliento, y fundamentalmente por estar siempre.

A Ignacio, Agustín, Federico y los dos que están por aterrizar en este mundo, mis sobrinos queridos, que me llenan de alegría y amor, me hacen pasar tan buenos momentos y porque son un cable a tierra para mí.

A mis hermanos Santiago, Diego, Adela y Eugenia, por su amor, paciencia y por estar siempre a mi lado.

A Porota, Norberto, Luicina, Emiliano, Tomás, Patricia y Gabriel, por su gran afecto, ayuda y por todos los momentos compartidos.

A Cynthia Sequeiros, mi gran amiga, por su inmenso cariño, su valiosa e infinita amistad, por estar siempre y en cualquier momento al lado mío, por su constante preocupación, todas sus charlas y llamadas a pesar de la distancia, por todos los momentos inolvidables, todo el ánimo y el apoyo incondicional brindado, simplemente por ser mi amiga y estar!!!!

A mis amigas de la infancia y adolescencia sanjuanina: Cecilia, Ivana, Flavia, Mariana y Eliana, por la buena amistad que nos une, los momentos vividos, y porque a pesar de la distancia, ahí están.

A mis amigas de la facultad: Cynthia Sequeiros, Florencia Del Papa, Roxana Hilal, Pilar Estevan, Silvia Cabodevilla y Graciela Garrote, por todo su cariño, amistad, comprensión, apoyo, ánimo, sus buenas ondas y por esos mails tan esperados.

A mis compañeras de los martes de la Cátedra de Ciencias Biológicas: María José Bellini, Paula Lombardi, Valeria Dávila, Sandra Demichelis, por esas horas tan divertidas en al cátedra, transcurridas entre conversaciones (algunas profundas y otras no tanto), mates y humo.....mucho humo.

A todos mis compañeros de Cátedra de Ciencias Biológicas, por los momentos vividos y por estimular mi carrera docente, en especial a Margarita Bravo y Mónica Polo por el constante estímulo y apoyo.

Al Chino Flores, por su gran amistad, afecto, apoyo y ayuda desinteresada en todo momento, y por las fotos de la tapa de la Tesis.

A mis amigos de la vida, Verónica, Fernando, Mechi y Ricardo, por su valiosa amistad, su preocupación y por todos los hermosos momentos vividos.

A los que me iniciaron en la investigación: los integrantes de la cátedra de Microbiología general (también me ayudaron en mis primeros pasos como docente), los integrantes del LIPROBE, a PROPIA, en especial a Graciela Peterson que me guió y ayudó durante mi beca de entrenamiento de la CIC.

Al banco de flujo laminar, por las horas sufridas ahí adentro.....que creo que son más horas de las que paso en mi hogar.

Al Enterprise, por no dejarme saber si afuera hace frío, llueve, hay piquetes, cayó algún presidente, o simplemente hay vida y sol.....

A la soja que nos está dando de comer tanto.

Y a todos los que de una forma u otra me ayudaron a llegar a esta meta.

Tapa: *"lenta vida de raíz que sobrevives encerrada en la dulce planta máxima"*. Acuarela de 24 x 44 cm. realizada sobre cartulina. Autor: Tirso Vázquez Brust. Marzo de 2004.



Sólo por hoy trataré de vivir exclusivamente el día, sin querer resolver el problema de mi vida todo de una vez. (Juan XXIII)

Parte de este Trabajo de Tesis ha sido publicado en las siguientes revistas internacionales con referato, proceedings y libros de texto:

"Stimulation of adhesiveness, infectivity and competitiveness for nodulation in *Bradyrhizobium japonicum* by its pretreatment with soybean seed lectin".

Lodeiro, A. R., López García, S. L., Vazquez, T, y Favelukes, G.  
FEMS Microbiology Letters, 188: 177-184. Mayo 2000.

"Improved Soybean Root Association of N-Starved *Bradyrhizobium japonicum*"

López García, Silvina L., Vazquez, Tirso, Favelukes, Gabriel y Lodeiro, Anibal.

J. Bacteriol. 183: 7241-7252. Diciembre 2001.

"Rhizobial Position as a Main Determinant in the Problem of Competition for Nodulation in Soybean".

Silvina L. López García; Tirso E. E. Vazquez; Gabriel Favelukes y Aníbal Lodeiro.

Environmental Microbiology. 4: 216-24. Abril 2002.

"Infectivity and Competitiveness for Nodulation of N-limited *Bradyrhizobium japonicum*".

López García Silvina L., G. Favelukes y A. Lodeiro (2000). En: Nitrogen Fixation. From Molecules to Crop Productivity. F.O. Pedrosa, M. Hungria, M. G. Yates and W.E. Newton, eds. Kluwer Academic Publishers, p. 609.

"LOS RIZOBIOS Y LA INOCULACIÓN DE LAS LEGUMINOSAS PARA LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO".

*Rhizobia and the legume inoculation for symbiotic nitrogen fixation.*

Aníbal R. Lodeiro, Silvina L. López García, Elías Mongiardini, Juan Ignacio Quelas y Alejandro Peticari. En: MICROBIOLOGÍA AGRÍCOLA: UN APORTE DE LA INVESTIGACIÓN ARGENTINA. Comité Editor: Albanesi A., Anriquez A., Luna S., Kunst C. y Ledesma R. Págs. 159-193. Editorial: Universidad Nacional de Santiago del Estero. ISBN: 987- 99083-5-X. Argentina. Julio 2003.

Además, se han presentado numerosos trabajos en congresos nacionales e internacionales

## INDICE

<b>Capítulo I</b>	<b>Introducción</b>	
I.1	Los microorganismos del suelo	1
I.2	Importancia de la simbiosis rizobio-leguminosa	4
I.3	Los rizobios	9
I.3.1	Sistemática	9
I.3.2	Morfología	10
I.3.3	Rango de planta hospedadora de los rizobios	10
I.4	Los rizobios como habitantes de la microflora del suelo	13
I.5	Desarrollo de la simbiosis	15
I.5.1	Intercambio de señales solubles: flavonoides y factores de nodulación	15
I.5.1.1	Acción de los flavonoides sobre los rizobios	15
I.5.1.2	Regulación de la expresión de los genes <i>nod</i>	17
I.5.1.3	Acción del Factor Nod sobre la raíz	20
I.5.2	Adsorción de los rizobios a las raíces	22
I.5.3	Infección de la raíz	25
I.5.4	Organogénesis del nódulo	28
I.5.5	La invasión del nódulo y la fijación de N <sub>2</sub>	31
I.6	Metabolismo de los rizobios	32
I.6.1	Metabolismo energético y biosíntesis de polímeros ricos en C	32
I.6.2	Asimilación del N	36
I.6.3	Integración del metabolismo de C y N	41
I.7	Objetivos de este Trabajo de Tesis	43
I.7.1	Objetivos específicos	44
I.8	Significado de esta investigación	45
<b>Capítulo II</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	
II.1	Cultivo de rizobios y plantas	46
II.1.1	Variedades de plantas y cepas bacterianas utilizadas en este estudio	46
II.1.1.1	Rizobios	46
II.1.1.2	Plantas	46

II.1.2	Medios para el cultivo de rizobios y plantas	46
II.1.2.1	Medios de cultivo y conservación de los rizobios	46
II.1.2.2	Soluciones para el cultivo hidropónico de plantas	47
II.1.3	Cultivos bacterianos y preparación de inóculos	47
II.1.4	Esterilización superficial y germinación de las semillas	48
II.1.5	Métodos para el recuento de rizobios	48
II.2	Ensayos Bioquímicos	49
II.2.1	Medida de la actividad de glutamino sintetasa (GS)	49
II.2.2	Determinación de polisacáridos extracelulares	50
II.2.3	Determinación de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB)	50
II.2.4	Cuantificación de proteínas	50
II.2.5	Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)	51
II.2.6	Inducción de la expresión del gen <i>nodC</i> por genisteína	51
II.2.7	Purificación de lectina de soja (SBL)	51
II.2.8	Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	52
II.2.9	Marcación de SBL	52
II.2.10	Unión de SBL a células de <i>B. japonicum</i>	52
II.3	Estudios Biológicos	53
II.3.1	Ensayos de adsorción	53
II.3.2	Ensayos de infectividad	54
II.3.3	Establecimiento de poblaciones y ensayos de persistencia de rizobios en vermiculita	55
II.3.4	Ensayos de competición para la nodulación	55
II.3.5	Extracción de nódulos y evaluación de experimentos de competición para la nodulación	56

### Capítulo III

#### *Establecimiento de una limitación para la asimilación de N*

Introducción	57
--------------	----



		Resultados y discusión	59
	III.1	Crecimiento bacteriano en medios limitados en la fuente de nitrógeno	59
	III.2	Asimilación de N en <i>B. japonicum</i>	62
<b>Capítulo IV</b>		<b><i>Destinos del C durante el crecimiento limitado en N</i></b>	
		Introducción	66
		Resultados y Discusión	67
	IV.1	Acumulación de compuestos de C durante el cultivo en <i>B. japonicum</i>	67
	IV.2	Crecimiento de un mutante defectivo en la síntesis de EPS de <i>B. japonicum</i> con diferentes limitaciones en su fuente de nitrógeno	71
	IV.3	Acumulación de PSE y PHB en la cepa <i>exoB</i> en comparación con la cepa salvaje	73
<b>Capítulo V</b>		<b><i>La alta relación C/N mejora la eficiencia de las etapas tempranas de pre-infección e infección</i></b>	
		Introducción	76
		Resultados y discusión	77
	V.1	Evaluación de etapas clave de preinfección en cultivos de rizobios limitados en N	77
	V.2	Estudios de infectividad	81
	V.2.1	Infectividad en relación con la edad del cultivo y la disponibilidad del N	82
	V.2.2	Infectividad en relación con la síntesis de PSE	84
<b>Capítulo VI</b>		<b><i>Competitividad de los rizobios para la nodulación de soja: efecto del estado metabólico y de la posición</i></b>	
		Introducción	90
		Resultados y Discusión	91
	VI.1	Competición para la nodulación en relación con el nivel de la fuente de N durante el crecimiento del inóculo bacteriano	91

VI.2	Crecimiento y persistencia de <i>B. japonicum</i> en vermiculita	93
VI.3	Competitividad frente a una población establecida en la vermiculita	96
VI.4	Estimación de las contribuciones del estado fisiológico y la posición de los rizobios de la población establecida en su competitividad	97
VI.5	Colonización de raíces de soja por <i>B. japonicum</i>	99
VI.6	Inoculación en profundidad	102
<b>Capítulo VII</b>		
<b><i>Mejora en la ocupación de nódulos por la inoculación en profundidad en un suelo con población naturalizada de rizobios noduladores de soja</i></b>		
	Introducción	104
	Resultados y Discusión	105
VII.1	Comparación de la inoculación en semilla con la inoculación en profundidad en un suelo sujeto a monocultivo de soja	105
<b>Capítulo VIII</b>		
<b><i>Discusión general y conclusión</i></b>		
VIII.1	Discusión general	110
VIII.1.1	La relación C/N y la eficiencia de la infección	111
VIII.1.2	Posibilidades de aprovechar la mayor infectividad para solucionar el problema de la competición para la nodulación	114
VIII.2	Conclusión	116
VIII.3	Perspectivas	116
<b>Referencias Bibliográficas</b>		
	Bibliografía	118

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

### ***I.1. Los microorganismos del suelo***

La pregunta por la vida ha sido una de las más fundamentales de la humanidad a lo largo de toda su historia, no sólo desde un punto de vista filosófico sino también desde el punto de vista práctico relacionado con la producción de alimentos y la lucha contra las enfermedades. Su respuesta se fue ampliando con el paso del tiempo, primero gracias al invento del microscopio por van Leeuwenhoek en el siglo XVII, luego al descubrimiento de la fermentación por Pasteur en el siglo XIX, y finalmente al desarrollo de la biología molecular en la segunda mitad del siglo XX. En los últimos años el descubrimiento de organismos vivos en ambientes en los cuales se creía imposible encontrarlos, llevó la frontera del concepto aún más lejos. Entre las especies adaptadas a ambientes extremos, Kashefi y Lovley (2003) documentaron la existencia de un *Archaea* capaz de duplicarse en 24 horas a 121°C, es decir la temperatura normalmente utilizada para la esterilización con vapor de agua. Notablemente todas estas especies extremófilas son microorganismos, lo cual indica la enorme plasticidad adaptativa de los mismos.

Un grupo importante de microorganismos son los procariotas, que se cree que habitan en la Tierra desde hace más de  $3,5 \cdot 10^9$  años. Las especies pertenecientes a este grupo han desarrollado una gran diversidad basada en procesos evolutivos que no sólo implican la transferencia vertical de información genética -de generación en generación- sino también horizontal -entre individuos de la misma generación. Gracias a esta diversidad se han optimizado diferentes procesos bioquímicos para la utilización de una amplia variedad de sustancias nutritivas a través de rutas metabólicas y sistemas de regulación genéticos específicos, lo cual permite la colonización de una gran variedad de ambientes.

Uno de los ambientes en el cual coexisten diversas comunidades microbianas es el suelo. Este es un hábitat en el cual la composición nutritiva varía permanentemente en el tiempo y en el espacio, y en consecuencia, permite el crecimiento bacteriano en forma esporádica. El ambiente edáfico es tan complejo que una única partícula de suelo en sí misma puede contener varios microhábitats, ya que por ejemplo la concentración de  $O_2$  va disminuyendo hacia el interior de la partícula y además pueden existir gradientes de otros nutrientes (Paul y Clark, 1996). Así, no es raro observar cambios en la composición de las comunidades bacterianas a escalas tan pequeñas como una partícula de unos pocos mm de diámetro. Además de los nutrientes, los microorganismos del suelo



están expuestos a grandes variaciones de otros factores tales como temperatura, pH, humedad, salinidad, presencia de sustancias tóxicas, etc. El hombre también juega un papel importante en inducir estos cambios al utilizar el suelo para la agricultura.

Las bacterias que habitan el suelo han desarrollado sistemas específicos que les permiten sobrevivir y adaptarse a condiciones fluctuantes de "hambre y abundancia" y a los diferentes estreses ambientales que soportan. La microflora bacteriana de los suelos agrícolas encuentra condiciones de inanición en el suelo desnudo y altas concentraciones de nutrientes en las zonas rizosféricas, aunque estos nutrientes deben ser captados en las condiciones de muy bajo potencial agua impuestas por la succión que ejerce la raíz. Así, dichas bacterias sufren importantes cambios morfológicos y fisiológicos para adaptarse a estas condiciones nutritivas cambiantes. Se ha documentado un número de casos donde la condición de inanición de algún nutriente puede ser crítica para el desarrollo de un proceso microbiano de interés para el hombre.

Entre los nutrientes que a menudo son escasos en el suelo encontramos al N en sus diversas formas combinadas, tanto orgánicas como inorgánicas. Si bien el N<sub>2</sub> es el gas más abundante en la atmósfera terrestre (aproximadamente 80%), no es útil *per se* como fuente de N para el desarrollo de la vida en la Tierra ya que la mayoría de los organismos vivos sólo son capaces de asimilarlo como parte de un estrecho rango de moléculas, principalmente aminoácidos, amonio o nitratos. No obstante, entre las adaptaciones de los procariontes a la vida en escasez de N, se encuentra la capacidad de fijar (reducir) N<sub>2</sub> atmosférico propia de un cierto grupo de especies denominadas diazótrofes. La actividad de estas especies es de fundamental importancia para el mantenimiento del ciclo del N. Entre los diazótrofes encontramos tres grupos: los fijadores de vida libre, las rizocenosis diazotróficas y las bacterias fijadoras en simbiosis. Los rizobios son los miembros más prominentes de este último grupo, (ver Tabla 1.1).

La asociación simbiótica fijadora de N<sub>2</sub> de los rizobios se lleva a cabo con plantas leguminosas (excepto el caso de la Ulmácea *Parasponia*, que es nodulada por *Rhizobium* sp.). Se entiende por simbiosis a la estrecha asociación entre dos organismos de especies distintas en la cual ambos obtienen algún beneficio. Sin embargo, Meeting (1993) tomando la definición de Odum (1959) describe a todas las interacciones como simbiosis, ya sean positivas o negativas.

Tabla 1.1: Géneros que incluyen organismos procariotas fijadores de N<sub>2</sub>.

Forma en la que fijan N <sub>2</sub>	Géneros que incluyen especies fijadoras de N <sub>2</sub>	Características principales
	<i>Chromatium, Chlorobium, Thiopedia, Ectothiospira</i>	Fotótrofos, anaerobios obligados
	<i>Clostridium, Desulfovibrio, Desulfomaculum, Methanococcus, Methanosarcina</i>	Heterótrofos, anaerobios obligados
	<i>Rhodospirillum, Rhodopseudomonas</i>	Fotótrofos, anaerobios facultativos
	<i>Klebsiella, Bacillus, Enterobacter, Citrobacter, Escherichia, Propionibacterium</i>	Heterótrofos, anaerobios facultativos
Vida libre	<i>Spirulina, Oscillatoria, Pseudoanabaena, Lyngbia, Plectonema, Phormidium, Synechococcus, Dermocarpa, Xenococcus, Myxosarcina, Chroococcidioopsis, Pleurocapsa</i>	Fotótrofos, microaerobios
	<i>Xanthobacter, Thiobacillus, Aquaspirillum, Campylobacter, Arthrobacter, Methylocistus, Methylococcus, Methilomonas, Methylobacter, Azospirillum</i>	Heterótrofos, microaerobios
	<i>Cylindrosperma, Chlorogloeopsis, Fischerella, Gloeotheca</i>	Cianobacterias (fotótrofos), aerobios
	<i>Azotobacter, Azotococcus, Azomonas, Beijerinckia, Derxia</i>	Heterótrofos, aerobios
Rizocenosis diazotróficas	<i>Azospirillum, Azotobacter, Gluconacetobacter,</i>	Heterótrofos
	<i>Anabaena, Nostoc, Scytonema, Stigonema, Calothrix, Dicothrix</i>	Fotótrofos
Simbióticas	<i>Rhizobium, Azorhizobium, Sinorhizobium, Mesorhizobium, Bradyrhizobium, Allorhizobium, Frankia,</i>	Heterótrofos

En este contexto, la interacción rizobio-leguminosa es una protooperación, en la cual los dos individuos pueden vivir separados

pero cuando entran en contacto sacan provecho uno del otro. Dicha protooperación le permite a la planta disponer de N asimilable para sus diferentes requerimientos metabólicos y adaptarse bien a suelos empobrecidos en este nutriente. Por otro lado, la planta le suministra a los rizobios la fuente de C necesaria para subsistir y fijar  $N_2$ , además de protección frente a las condiciones adversas del suelo. Dado que en la literatura se suele utilizar el término simbiosis en vez de protooperación, seguiremos refiriéndonos a esta asociación como simbiosis a lo largo de esta Tesis. La simbiosis rizobio-leguminosa se inicia en el suelo con interacciones que conducen a la formación de nódulos en las raíces de las leguminosas y su infección y ocupación por los rizobios (Pueppke, 1996) (Figura 1.1). Las poblaciones de rizobios aumentan notablemente en el suelo luego del cultivo de leguminosas. Un punto importante a remarcar es que si en el suelo existen fuentes de N asimilable, la planta las utiliza de preferencia a la simbiosis, ya que ésta es más costosa en términos energéticos. De este modo, varias etapas de la simbiosis se ven inhibidas por el N, el cual actúa como señal no sólo sobre la planta sino también sobre el rizobio (para una revisión véase Streeter, 1988; Wang y Stacey, 1990; Dusha y Kondorosi, 1993; Zahran, 1999; Patriarca *et al.*, 2002; Dusha, 2002).

## **1.2. Importancia de la simbiosis rizobio-leguminosa**

Desde los inicios de la agricultura se ha valorado la capacidad de las plantas leguminosas para “nutrir al suelo”. Sin embargo, no se pudo establecer una relación entre esta propiedad y una actividad bacteriana sino hasta 1888, cuando Hellriegel y Wilfarth propusieron por primera vez la existencia de la simbiosis fijadora de  $N_2$  entre dicha familia de plantas y los rizobios. Este descubrimiento hizo posible aprovechar tecnológicamente el potencial de esta asociación. A comienzos del siglo XX ya se cultivaba industrialmente a los rizobios para distribuirlos como inoculantes en diversos cultivos de leguminosas. La selección de cepas bacterianas más eficaces y la optimización de los métodos de fermentación e inoculación continuaron hasta nuestros días, en los que las industrias productoras de inoculantes conforman un importante segmento de la agroindustria, y en el mercado se encuentran disponibles diversas marcas y presentaciones de inoculantes para todos los cultivos importantes de leguminosas (Lodeiro *et al.*, 2003).

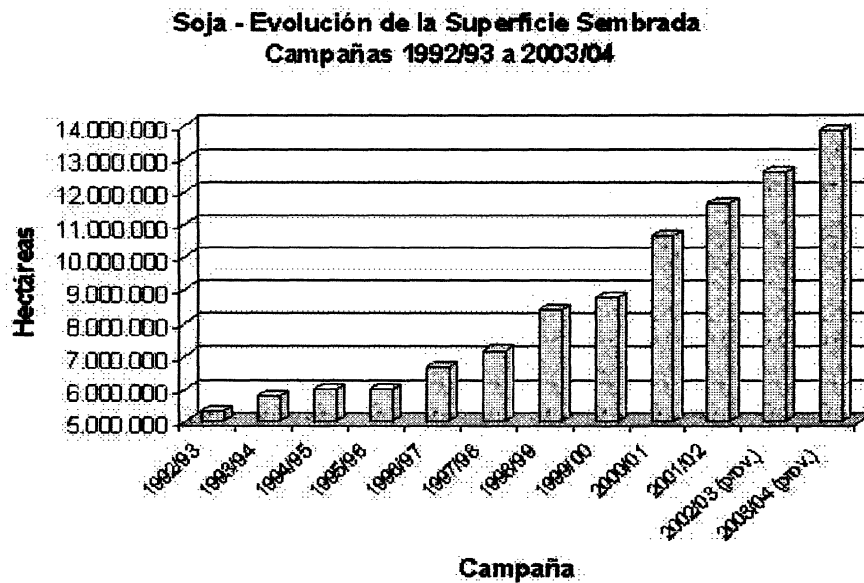




Así, actualmente es una práctica común la inoculación de las semillas de leguminosas con suspensiones de rizobios, la cual se realiza normalmente a la siembra cubriendo las semillas con un alto número de rizobios activos para la nodulación y fijación de  $N_2$ .

Entre las leguminosas se destacan una serie de especies de gran interés agronómico, tales como los cultivos de soja, poroto, arveja, garbanzo, maní y otros para la producción de grano, y las forrajeras alfalfa y trébol. Todas las leguminosas se caracterizan por presentar altos contenidos de nitrógeno tanto en materia verde como en granos, lo que podría guardar relación con su capacidad de asociarse simbióticamente con los rizobios. A escala planetaria, la simbiosis rizobio-leguminosa contribuye aproximadamente con 48 millones de toneladas de N por año, lo que corresponde al 60 a 80% de la fijación biológica de  $N_2$ , por lo que estas asociaciones representan uno de los sistemas más importantes de incorporación de N en la biósfera. Las otras fuentes de aporte de N son: fijación industrial -proceso de Haber-Bosch, principalmente para la producción de fertilizantes nitrogenados- con 95 millones de toneladas, y combustión -fijación espontánea de N a partir de la actividad natural de descargas eléctricas sobre el  $N_2$  de la atmósfera- con 30 millones de toneladas (Socolow, 1999).

La soja es el principal cultivo de leguminosas de nuestro país, superando los 13,5 millones de hectáreas, con una producción estimada en unos 35 millones de toneladas para la campaña 2003-2004. Gran parte de esta producción se destina a la exportación tanto de grano como de productos agroindustriales, destacando entre ellos el aceite de soja. Su importancia en la actualidad se debe a la introducción de sojas transgénicas resistentes al herbicida glifosato y la puesta a punto de la tecnología de la siembra directa, todo lo cual facilitó enormemente su cultivo. Así, nuestro país es uno de los principales productores y exportadores de esta oleaginosa y sus derivados, constituyendo esta producción uno de los pilares de la economía nacional. En este momento existe incluso cierta preocupación por el gran auge de la soja dado que este cultivo está desplazando a otras actividades de alto valor, como por ejemplo girasol, maíz o tambo, disminuyendo en consecuencia la diversificación de las actividades agropecuarias, lo que puede suponer riesgos económicos y ecológicos en el mediano plazo ([www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar)). Esta situación puede apreciarse en la Figura 1.2, donde se muestra la evolución de la superficie sembrada con soja en nuestro país desde 1992 hasta la actualidad.



**Figura 1.2.** Esquema de la evolución de superficies sembradas con soja en Argentina desde 1992 hasta la cosecha 2003/2004. (Fuente: [www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar)).

De esta manera, cualquier factor adverso que influya sobre el cultivo de soja tendrá un gran impacto a escala nacional. Nuestra preocupación se enfoca sobre la eficiencia con que se lleva a cabo la fijación simbiótica de  $N_2$  en este cultivo, dado que una ineficiente fijación impone límites al rendimiento y obliga al cultivo a extraer una mayor cantidad de N del suelo.

Cuando las semillas inoculadas con rizobios activos se siembran en suelos con historia previa de cultivos de soja, la inoculación produce muy pequeños aumentos de rendimiento respecto del suelo no inoculado, que a veces son indistinguibles en magnitud de la variación estadística entre potreros y/o entre años. Este efecto se debe a que las bacterias llevadas por los inoculantes aplicados en años anteriores permanecen en el suelo y desarrollan una población naturalizada capaz de mantener una alta eficiencia en el proceso de infección de las raíces que conduce a la nodulación, pero parece resultar muy variable con respecto a su efectividad en fijar  $N_2$ . Esta ineficiencia podría estar relacionada a fenómenos de deriva genética al no ser la alta efectividad en la fijación de  $N_2$  un fenotipo seleccionado por la naturaleza. Dado que la cantidad de  $N_2$

fijado por una planta de soja depende del número total de nódulos y de la efectividad de la cepa bacteriana que ocupe dichos nódulos, cuando los rizobios de la población del suelo, de baja efectividad para la fijación de  $N_2$  forman una mayor cantidad de nódulos que los inoculados, la contribución de la fijación de  $N_2$  en el N total acumulado en la planta o Nda (N derivado de la atmósfera) se reduce. Como consecuencia de ello, las plantas pasan a depender del N combinado del suelo y la inoculación va perdiendo su efecto sobre el rendimiento, aún cuando el número de rizobios inoculados supere ampliamente a los de la población naturalizada (véase por ejemplo Thies *et al.*, 1991).

Dado que la soja es un cultivo que exporta una gran cantidad de N al grano, una proporción de Nda de 30-40% o menor sobre el N total asimilado puede determinar que este cultivo se convierta en un expoliador de N del suelo. Considerando que en el país hay más de 13 millones de ha sembradas con un rendimiento promedio de 2.600 kg.ha<sup>-1</sup> ([www.sagpya.mecon.gov.ar](http://www.sagpya.mecon.gov.ar)) y un 2,5% p/p de N en el grano de soja, podemos estimar que 845.000 toneladas de N están contenidas en esos granos. Si estimamos que una deficiente fijación aporta 30% de Nda (Unkovich y Pate, 2000), esto implica extraer anualmente casi 600.000 toneladas de N de nuestros suelos. Por el contrario, una eficiente fijación de N puede aportar hasta 90% de Nda (Unkovich y Pate, 2000), con lo cual una diferencia de medio millón de toneladas de N permanecería en el suelo. En términos económicos, el costo de reponer 500.000 toneladas con urea sería de \$ 882 millones, sin considerar el daño ambiental (Socolow, 1999).

La escasa respuesta del rendimiento a la inoculación en suelos con población naturalizada de rizobios estimula a los agricultores a abandonar esta práctica, y si los suelos no están bien provistos de N, a reemplazarla por fertilizantes químicos, más costosos y más riesgosos para el ambiente. Dada la expansión del cultivo de soja (Figura 1.2), más y más tierras tendrán pronto una considerable población naturalizada de rizobios, con lo cual cabe esperar que en breve el problema se agudice y se extienda.

Este problema, conocido como el *problema de la competición* (véase Sadowski y Graham, 1998) ha sido encarado de muchas maneras (Toro, 1996; Sadowski y Graham, 1999) pero dada su gran complejidad, aún no se encuentra una solución al mismo. En este trabajo de Tesis nos hemos propuesto conocer más acerca de este problema y dentro de lo posible, encontrar a partir de allí respuestas aplicables a los cultivos de soja. Con el fin de clarificar nuestros enfoques y estrategias, a continuación

expondremos los rasgos esenciales del proceso de infección y nodulación sobre los cuales hemos basado nuestros estudios.

### **1.3 Los rizobios**

#### **I.3.1. Sistemática**

Los rizobios están agrupados sistemáticamente en la familia *Rhizobiaceae*, que se caracteriza porque sus miembros tienen la capacidad de interactuar con plantas, ya sea formando simbiosis estrechas, o dando origen a interacciones patogénicas. En 1888 Beijerinck obtuvo el primer cultivo bacteriano puro de un nódulo de raíz de leguminosa y lo llamó *Bacillus radicicola*. Posteriormente, Frank en 1889, propuso el nombre *Rhizobium* para estos aislados. Ya entrado el siglo XX, y con el conocimiento de la existencia de cierta selectividad en el par rizobio/leguminosa, se habían reconocido seis especies teniendo en cuenta la especie principal de leguminosa que nodulaban. Esto permitió definir los siguientes grupos: *R. leguminosarum*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. meliloti*, *R. japonicum* y *R. lupini*. Esta clasificación continuó hasta que observaciones posteriores obligaron a realizar una nueva (Jordan, 1984). Así, se dividieron en dos grupos de acuerdo fundamentalmente a su tasa de crecimiento, y designaron como *Bradyrhizobium* a los rizobios de crecimiento lento, mientras que los de crecimiento rápido se separaron en cuatro géneros: *Azorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*. El Manual de Taxonomía Sistemática de Bergey (Jordan *et al.*, 1984) situaba la familia *Rhizobiaceae* en el reino Procariotas, división Gracilicutes, clase Scotobacteria, en su grupo cuatro: bacilos y cocos gram-negativos aerobios/microaerófilos. Todos esos organismos se han encuadrado en el subgrupo alfa de las proteobacterias (Young, 1992). En la actualidad, se están realizando numerosos estudios para clarificar la taxonomía y filogenia de bacterias que son capaces de inducir nódulos en plantas leguminosas (Broughton, 2003). La taxonomía actual de los rizobios se basa en múltiples características que incluyen morfología, bioquímica, fisiología, genética y filogenia. Gracias a las nuevas tecnologías genéticas y fundamentalmente a la comparación de secuencias homólogas de ADN, surgen rápidos cambios en la clasificación de esos organismos y se están describiendo nuevos géneros y especies. Así, recientemente se ha incorporado el género *Allorhizobium*, que contiene a una sola especie *A. undicola*, que fue aislado originalmente de nódulos de

raíces de una planta acuática. Por otra parte, hay numerosas cepas de rizobios a las que aún no se le ha asignado especie y que muestran características genéticas próximas a otros grupos. Se les llama genéricamente *Rhizobium spp.*

### **1.3.2. Morfología**

Los rizobios son bacilos gram-negativos, móviles con flagelación peritrica, polar o subpolar. Se los encuentra aislados, de a pares, y a veces en disposición estrellada formando rosetas. No forman esporos, y en cultivos de células en estado estacionario pueden contener gránulos de poli- $\beta$ - hidroxibutirato (PHB).

Los rizobios son bacterias que viven tanto en vida libre en el suelo o dentro de los nódulos de las leguminosas en una forma llamada bacteroide. Ambas formas difieren en su morfología y en su metabolismo (Quispel, 1974; Lodwig y Poole, 2003) . Principalmente, en vida libre son bacilos móviles, incapaces de fijar  $N_2$  y utilizan una variedad de fuentes de C, mientras que los bacteroides tienen formas irregulares, son inmóviles, fijan  $N_2$  y sólo pueden utilizar ácidos dicarboxílicos como succinato o malato como fuentes de C. La diferenciación del rizobio a bacteroide va acompañada de profundos cambios en el patrón de expresión génica, que se traduce en los cambios morfológicos y fisiológicos mencionados (Oke y Long, 1999; Natera *et al.*, 2000). Los bacteroides son totalmente dependientes de la planta hospedadora para la adquisición de nutrientes, siendo por ejemplo el suministro de C por parte de la planta esencial para la fijación biológica de N (Lodwig *et al.*, 2003).

### **1.3.3 Rango de planta hospedadora de los rizobios**

Las clasificaciones iniciales de los rizobios fueron basadas en agrupamientos de cepas cuya característica común era el rango de la planta hospedadora. Varias de las especies y variedades de rizobios tienen un rango restringido de hospedador, es decir, infectan una o unas pocas especies concretas de leguminosas. Esto permitió definir los llamados grupos de inoculación cruzada: conjunto de cepas capaces de infectar una especie (o un grupo determinado de especies) de leguminosas.

Se ha comprobado que hay numerosas excepciones en las que plantas de un grupo de inoculación pueden ser infectadas por rizobios de otro

grupo. Tales observaciones mostraron un mayor grado de permisividad (promiscuidad) para infecciones cruzadas en relación con la idea original concebida en los grupos de inoculación (Wilson, 1939). En la Tabla 1.2 se muestran los huéspedes principales para las especies de los géneros *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* y *Allorhizobium*.

**Tabla 1.2.** Principales grupos de inoculación cruzada para los seis géneros de rizobios. Se indica con un asterisco la especie tipo dentro de cada género.

Rizobio nodulante y fijador de nitrógeno	Leguminosa hospedadora
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i>
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	<i>Macroptilium atropurpureum</i>
<i>Bradyrhizobium sp.</i>	<i>Arachis hipogea</i> , <i>Lotus uliginosus</i> , <i>L. pedunculatus</i> , <i>Vigna spp.</i> , <i>Lupinus spp.</i> , <i>Leucaena spp.</i> , <i>Sesbania rostrata</i> , <i>Lablab spp.</i> y otras leguminosas tropicales
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	<i>Pisum sativum</i> , <i>Vicia hirsuta</i> , <i>V. sativa</i> , <i>Lathyrus</i> , <i>Lens spp.</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	<i>Trifolium repens</i> , <i>T. subterraneum</i> , <i>T. pratense</i>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>P. angustifolius</i>
<i>Rhizobium etli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>P. angustifolius</i>

Tabla 1.2. (continuación)

<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>P. coccineus</i> , <i>P. angustifolius</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>L. esculenta</i> , <i>Dalaea leporina</i> , <i>Vigna vexillata</i> , <i>Crotalaria pumila</i> y otras leguminosas tropicales
<i>Rhizobium galegae</i>	<i>Galega officinales</i> , <i>G. orientales</i>
<i>Sinorhizobium fredii</i>	<i>Glycine max</i> , <i>G. soja</i> , <i>Macroptilium atropurpureum</i> , <i>M. lathyroides</i> , <i>Vigna radiata</i> , <i>V. unguiculata</i> , <i>Cajanus cajan</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> , <i>Sesbania cannabina</i>
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> , <i>M. truncatula</i> , <i>Melilotus alba</i> , <i>Trigonella spp.</i>
<i>Sinorhizobium medicae</i>	<i>Medicago</i>
<i>Sinorhizobium teranga</i>	<i>Acacia spp.</i>
<i>Sinorhizobium saheli</i>	<i>Acacia spp.</i>
<i>Mesorhizobium loti</i>	<i>Lotus corniculatus</i> , <i>L. tenuis</i> , <i>Acacia albida</i> , <i>Lupinus densiflorus</i> , <i>Cicer arietinum</i> , <i>Leucaena leucocephala</i> , <i>Mimosa spp.</i> , <i>Anthyllis vulneraria</i>
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	<i>Sesbania rostrata</i>
<i>Allorhizobium undicola</i>	<i>Neptunia natans</i> , <i>Medicago sativa</i> , <i>Acacia spp.</i> , <i>Lotus arabicus</i> , <i>Faidherbia albida</i> .

#### **I.4. Los rizobios como habitantes de la microflora del suelo**

Los rizobios en vida libre pueden persistir durante largos períodos en el suelo, aún en ausencia de leguminosas (McLoughlin *et al.*, 1990; Sadowski y Graham, 1998). Las características fisicoquímicas y biológicas del suelo vienen determinadas en gran medida por su textura y estructura. Estos parámetros dependen de la abundancia relativa de cada tamaño de partícula, que puede variar entre 0,1  $\mu\text{m}$  a 2 mm, dependiendo tanto del tipo de mineral del cual derivan, como de los procesos formadores que actuaron. Así, podemos encontrar suelos de naturaleza arcillosa, limosa o arenosa. La textura del suelo es importante porque de eso dependerá el tamaño y tipo de poros formados en el suelo y como consecuencia la capacidad de retención de agua y oxígeno de los mismos. Algunos de estos poros generan un microambiente muy favorable para el establecimiento de las bacterias.

Por otro lado, se sabe que las bacterias en el suelo son capaces de unirse a todo tipo de superficies vivas o inertes, como por ejemplo a la superficie de una partícula o restos celulares de hongos, micelios y las superficies de las raíces. En algunas de estas superficies las bacterias forman estructuras conocidas como *biofilms*, que consisten en microcolonias incluidas en una matriz de exopolisacáridos con pequeños canales que permiten la circulación de agua y nutrientes (Stoodley *et al.*, 2002). Las bacterias quedan inmovilizadas en estas estructuras y se cree que allí encuentran protección frente a agentes antibacterianos y predadores. Recientemente Seneviratne y Jayasinghearachchi (2003) observaron la formación de biofilms por parte de cepas de *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* sobre micelios de hongos y sugirieron que los mismos podrían ser comunes en el suelo. Una vez formando parte del biofilm, las bacterias sufren una serie de modificaciones que las especializan para la vida sésil. Es así que se conocen genes cuya expresión es exclusiva del estado sésil en el biofilm, y que sirven como marcadores del mismo (Stoodley *et al.*, 2002). Eventualmente, las bacterias pueden migrar de un biofilm a otro microhábitat ya sea por desprendimientos de la matriz que los incluye o por una reversión al estado planctónico móvil, que es el que se obtiene comúnmente en los cultivos en medio líquido. Este estado planctónico podría ser, para muchas bacterias del suelo incluyendo los rizobios, sólo un estado de transición o una forma de propágulos entre biofilms (Stoodley *et al.*, 2002).



Los rizobios presentan una quimiotaxis positiva a muchos de los exudados que liberan las raíces de las plantas hospedadoras y entonces podrían moverse a sitios determinados de la raíz (Barbour *et al.*, 1991; Caetano-Anollés *et al.*, 1992; Broughton *et al.*, 2000). Dentro de los compuestos quimiotácticos presentes en los exudados radicales, encontramos aminoácidos, proteínas, azúcares, ácidos orgánicos, flavonoides e isoflavonoides, carbohidratos complejos, alcoholes, vitaminas y hormonas (Peters y Verma, 1990; Kape *et al.*, 1991; Kluepfel, 1993). Pese a ello, existen evidencias de que la movilidad de los rizobios en el suelo es muy escasa (Madsen y Alexander, 1982; McDermott y Graham, 1989) con lo cual no es seguro si la movilidad y quimiotaxis de los rizobios hacia diferentes compuestos exudados por la raíz es un factor importante para competir en condiciones naturales por la ocupación de nódulos. En particular, la movilidad y la quimiotaxis sólo pueden realizarse en el estado planctónico, que como vimos antes, podría ser un estado poco frecuente en el ciclo de vida de los rizobios. Si éstos pasan la mayor parte de su vida libre integrados en biofilms, es concebible que la colonización de las raíces se inicie simplemente cuando los rizobios –inmóviles– entren en contacto con ellas a medida que estos órganos vegetales van creciendo y penetrando en el suelo, en vez de moverse activamente desde las partículas del suelo hacia la raíz. En este marco, la movilidad podría cobrar importancia sólo dentro del ambiente rizosférico o bien a muy cortas distancias del mismo.

Más allá de cuál sea el rol exacto que puedan desempeñar en la colonización la movilidad, la quimiotaxis y/o la presencia de biofilms, los rizobios son capaces de colonizar rápidamente una zona del suelo en íntimo contacto con las raíces, cuyas propiedades químicas y biológicas están determinadas por la actividad radical, y que se conoce con el nombre de *rizósfera*. Continuando desde la *rizósfera* hacia la raíz, existe una capa mucilaginosa (mucigel) de unos 0,5 a 8,0  $\mu\text{m}$  de espesor (Greaves y Darbyshire, 1972) por debajo de la cual se encuentra otra zona de la superficie radical llamada *rizoplano*, que también puede ser colonizada por los rizobios y a la cual se unen con una fuerza mayor que a la *rizósfera*. Por último, las bacterias también pueden colonizar zonas subcorticales de la raíz, en cuyo caso se dice que se encuentran en la *endorrinosfera*, y para liberarlas se requiere macerar los tejidos radicales. Los rizobios son capaces de colonizar eficientemente todos estos espacios no sólo en las leguminosas, sino también en otras especies como arroz (Reddy *et al.*, 1995; Yanni *et al.*, 1997), papa (Boogerd y van Rossum, 1997) y trigo (López García y Lodeiro, no publicado), y por otra parte, las

raíces de las leguminosas son eficientemente colonizadas no sólo por los rizobios sino también por una gran variedad de otras especies de microorganismos. Algunas de éstas son de gran interés, como p.ej. las micorrizas y las pseudomonas fluorescentes y actualmente se trabaja en el desarrollo de inoculantes que combinan rizobios con dichas especies.

### ***1.5. Desarrollo de la simbiosis***

La interacción simbiótica entre rizobios y leguminosas es un proceso complejo que requiere del reconocimiento mutuo expresado a lo largo de sus varias etapas y en muchos casos a través de factores desconocidos. Como resultado de este proceso, los rizobios de vida libre invaden los tejidos radicales, se transforman en bacteroides y fijan  $N_2$ .

El proceso de infección ha sido dividido para su estudio en varias etapas sucesivas (Figura 1.1) que incluyen:

- El reconocimiento de los simbiosomas previo a su contacto en el cual participan señales solubles tanto de la planta como de los rizobios.
- La adsorción de los rizobios a la superficie de la raíz y su colonización.
- La deformación de los pelos radiculares y su invasión a través de un canal (o hilo) de infección, por el cual las bacterias migran hasta llegar a las células corticales o subcorticales (dependiendo del tipo de nódulo).
- La organogénesis del nódulo.
- La invasión del nódulo por los rizobios y la formación del simbiosoma, dentro del cual los rizobios se diferencian en bacteroides.

Culminado este proceso de infección, se forma el nódulo radical maduro, y los bacteroides fijan  $N_2$ . A continuación haremos una reseña de las características principales de estas etapas.

#### **1.5.1. Intercambio de señales solubles: flavonoides y factores de nodulación**

**1.5.1.1. Acción de los flavonoides sobre los rizobios.** Las leguminosas liberan en sus exudados radicales una serie de moléculas que son reconocidas específicamente por los rizobios que están colonizando las

cercanías de la raíz con los que van a comenzar la simbiosis. Estas moléculas se denominan flavonoides y pertenecen al mismo tipo de moléculas que sirven de defensa a la planta ante el ataque de microorganismos patógenos, y también actúan como pigmentos protectores contra la luz ultravioleta, o atrayentes de insectos polinizadores, entre otras funciones (Heldt, 1997). Los flavonoides que actúan como señales simbióticas suelen ser isoflavonas en el caso de *Bradyrhizobium* o flavonas y flavononas en el caso de rizobios de crecimiento rápido (Hirsch *et al.*, 2001). (Tabla 1.3).

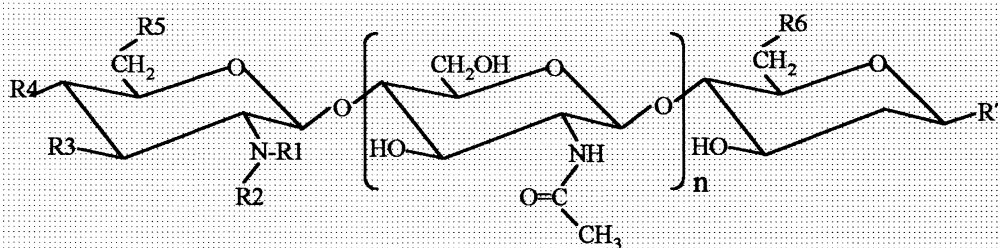
**Tabla 1.3.** Flavonoides inductores de los genes de nodulación producidos por las leguminosas más importantes.

<i>Leguminosa</i>	<i>Fuente</i>	<i>Flavonoides producidos</i>
<i>Medicago sativa</i> (alfalfa)	semilla	luteolina, crisoeriol
	raíz	liquiritigenina, 7,4´ dihidroxiflavona, 4,4´dihidroxi-2´-metoxichalcona
<i>Trifolium repens</i> (trébol blanco)	plántula	geraldona, 7,4´ dihidroxiflavona, 4´,hidroxi-7-metoxiflavona
<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto)	semilla	delpinidina, kaempferol, malvidina, miricetina, petunidina, quercetina
	raíz	eriodictiol, genisteína, naringenina
<i>Pisum sativum</i> (arveja)	semilla	apigenina, eriodictiol
<i>Glycine max</i> (soja)	plántula	daidzeína, genisteína
	raíz	coumestrol
<i>Vicia sativa</i> (arvejilla)	raíz	7,3´-dihidroxi-4´-metoxiflavonona, 3,5,7,3´-tetrahidroxi-4´metoxiflavonona, naringenina, liquiritigenina, 4,2´,4´-trihidroxichalcona, 4,4´-dihidroxi-2´metoxichalcona, 7,4´-dihidroxi-3´-metoxiflavonona, 5,7,4´-trihidroxi-3´metoxiflavonona, 5,7,3´-trihidroxi-4´-metoxiflavonona

Cada leguminosa produce y exuda un determinado y característico conjunto de flavonoides que activan específicamente a los genes de nodulación (genes *nod*) del rizobio con el cual hace simbiosis (Perret *et al.*, 2000; Hirsch *et al.*, 2001 y referencias citadas allí) (Tabla 1.3). Podemos decir entonces, que existe una correlación entre los flavonoides y los grupos de inoculación cruzada (véase Tabla 1.2).

Los flavonoides estimulan la expresión de los genes *nod* en los rizobios, cuyos productos catalizan la síntesis y secreción de un conjunto de moléculas señal conocidas como lipoquitos-oligosacáridos o factores de nodulación (factor Nod). El factor Nod está formado por un esqueleto de  $\beta$ -1,4-*N*-acetil-D-glucosaminas, cuya longitud varía entre tres y cinco unidades sacarídicas (similar a la estructura de la quitina). En el grupo amino correspondiente al azúcar del extremo no reductor se observa una marcada variedad de ácidos grasos formando uniones amida, los cuales, dependiendo de cada factor Nod, tendrán diferente grado de saturación. Sobre esa estructura básica, y dependiendo de la especie de rizobio, se encuentran modificaciones o sustituciones muy variadas tanto en el extremo reductor como en el no reductor, según se muestra en la Figura 1.3. Estas modificaciones son las que determinarán la especificidad de señal desde la bacteria a un determinado hospedador. *B. japonicum* produce factores Nod que pueden ser tetrámeros o pentámeros de *N*-acetilglucosamina con la modificación de una 2-O-metilfucosa, fucosa o glicerol en su extremo reductor. En su extremo no reductor está sustituido por ácidos grasos 18:1, 16:0 o 16:1 (Figura 1.3). Los factores Nod inducen en forma específica la organogénesis del nódulo, actuando a muy bajas concentraciones –menores que las de los reguladores de crecimiento vegetales más conocidos, como las auxinas o citoquininas– y pueden desencadenar este proceso aún si se aplican en forma purificada sobre la raíz (Foucher y Kondorosi, 2000).

**I.5.1.2. Regulación de la expresión de los genes *nod*.** La biosíntesis y secreción del factor Nod debe estar muy controlada puesto que se requiere sólo para disparar la formación del nódulo pero no debe continuar durante la invasión del mismo ni durante la diferenciación del rizobio a bacteroide. Asimismo, el sistema biosintético debe monitorear las condiciones ambientales de forma tal de inhibir la síntesis de esta señal cuando dichas condiciones no son propicias para la nodulación. En consecuencia, la regulación de la expresión de los genes *nod* es bastante compleja y está sujeta a múltiples puntos de control tanto positivo como negativo.



	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> 248	C18:4				O-acetil		
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> TOM	C18:4				O-acetil	O-acetil	
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>trifolii</i>	C20:4, C20:3, C18:3, C18:2 o común				O-acetil		
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011	C16:2				O-acetil (+/-)	sulfato	
<i>Sinorhizobium meliloti</i> AK 41	C16:2 C16:3					sulfato	
<i>Rhizobium sp</i> NGR 234	Común, N-metil	metil	O-carbamoil	O-carbamoil (+/-)		O-metilfucosa, 2-O-metilfucosa, 3-O-sulfufucosa, 2-O-metil-4-O-acetilfucosa	
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Común				O-acetil (+/-)	2-O-metilfucosa	
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Común N-metil (+/-)	metil hidrógeno	carbamoil (+/-)	carbamoil (+/-)	carbamoil (+/-) O-acetil (+/-)	2-O-metilfucosa	glicerol (+/-)
<i>Asorhizobium caulinodans</i>	Común N-metil	metil			O-carbamoil	D-arabinosa	

-“común”: está puesto en los casos donde no hay presente ni  $\alpha$  ni  $\beta$ -ácido graso insaturado, pero en general aparecen grupos como ácido *cis*-vaccénico  
 -(+/-) indica que tal grupo no siempre está presente.  
 -si no está indicado de otra manera; R1 representa hidrógeno y R3, R4, R5, R6 y R7 grupos hidroxilos.

Figura 1.3. Esquema general del lipo-quito-oligosacárido o factor Nod producido por los rizobios.  $n$  puede variar entre 1 y 4. Los sustituyentes que se describen como grupos R son incorporados específicamente por los distintos rizobios y constituyen la base del reconocimiento del factor Nod por parte de la planta.

En *B. japonicum* la regulación de la expresión de los genes *nod* resulta del balance de distintos sistemas inductores y represores (Stacey, 1995) (Figura 1.4). La inducción se lleva a cabo por dos sistemas. Por un lado, el gen *nodD1* es inducible por las isoflavonas específicas genisteína y daidzeína, además de ser autoinducible (Wang y Stacey, 1991; Stacey, 1995). En este sistema, la proteína NodD1 junto con los flavonoides actúan como reguladores positivos de la expresión de los otros genes *nod* (Kosslak *et al.*, 1987; Banfalvi *et al.*, 1988; Göttfert *et al.*, 1992). Por otro lado, en este rizobio actúa también como regulador positivo un sistema de dos componentes (Hotch y Silhavy, 1995) formado por *nodV* y *nodW*, el cual también es inducido por las isoflavonas específicas (Göttfert *et al.*, 1990; SanJuan *et al.*, 1994; Loh *et al.*, 1997; Loh *et al.*, 1999b). En este sistema de dos componentes NodV es la proteína sensora de membrana



Como represores de la expresión de los genes *nod* en *B. japonicum* encontramos las proteínas NodD2 y NolA. NolA activa a NodD2 y ésta a su vez reprime la expresión de los otros genes *nod*. NolA es miembro de la familia MerR de reguladores transcripcionales (Sadowsky *et al.*, 1991; Loh *et al.*, 1999a; Loh y Stacey, 2003). El gen *nolA* codifica en un mismo locus a tres proteínas diferentes y funcionales, siendo NolA1 la que regula la expresión de NolA2 y NolA3 (Loh *et al.*, 1999a; Loh y Stacey, 2003). Además, el gen *nolA* también ejerce la función de seleccionar el genotipo de soja con la cual el rizobio hace simbiosis (Sadowsky *et al.*, 1991; Loh y Stacey, 2003). De este modo, NolA ejerce la función primaria del control negativo de la expresión de los genes *nod*. Dos moléculas actúan como señales para llevar a cabo el control negativo a través de NolA. Por un lado, el propio factor Nod actúa como señal de retroalimentación, siempre y cuando tenga una estructura tetramérica (Figura 1.4). Un alto nivel de éste último incrementa la expresión de NolA y de NodD2 y éstos a su vez reprimen los genes *nod*. Por otro lado, existe un control por percepción del quórum (*quorum sensing*). Se ha observado que la inducción de la expresión de los genes *nod* disminuye significativamente cuando la densidad de población bacteriana es alta (Loh *et al.*, 2001). En estas condiciones se libera al medio extracelular un compuesto de cuatro anillos de oxetano que se conoce como bradióxetina (Loh *et al.*, 2002), el cual estimula la expresión de *nolA* y consecuentemente *nodD2* (Figura 1.4). Es interesante destacar que a diferencia de la mayoría de las moléculas señales mediadoras de la percepción del quórum la bradióxetina no es una homoserin lactona. Se cree que la síntesis de bradióxetina también está inducida por bajas cantidades de hierro (Loh *et al.*, 2002).

Otro nutriente que modifica la expresión de los genes *nod* es el N. Se ha observado que altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  en un medio de cultivo sintético provocan la disminución de la expresión de *nodY*, aunque no está claro si en esta regulación participa el sistema de dos componentes *nrBC*, sistema implicado en la regulación de las enzimas que actúan en el metabolismo del N. (Dusha *et al.*, 1989; Wang y Stacey, 1990).

**I.5.1.3. Acción del factor Nod sobre la raíz.** Los factores Nod purificados y agregados a las raíces desencadenan en las mismas, respuestas similares a las observadas en las primeras etapas de la simbiosis, o sea deformación de pelos radicales (Dénairié *et al.*, 1990), inducción de la despolarización de las membranas celulares vegetales (Felle *et al.*, 1995), cambio en el flujo de iones y oscilaciones en la concentración de calcio (Cárdenas *et al.*, 2000; Shaw *et al.*, 2003; Harris *et al.*, 2003) y reingreso al ciclo mitótico de

las células subcorticales de la raíz que van a dar origen al primordio del nódulo (Heidstra *et al.*, 1994; Lerouge *et al.*, 1990; Mergaert *et al.*, 1993; Relic *et al.*, 1993; Sanjuan *et al.*, 1992; Spaink *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991) y en algunos casos, desarrollo y diferenciación del nódulo. (Spaink *et al.*, 1991; Truchet *et al.*, 1991). Esta acción, que requiere que la raíz crezca con muy bajos niveles de fuentes de N, involucra la transcripción de genes específicos de la interacción que codifican las así llamadas nodulinas en las raíces de las plantas (Cohn *et al.*, 1998) y también se ejerce a través de las ciclinas que regulan al ciclo mitótico (Foucher y Kondorosi, 2000).

Son varios los estudios llevados a cabo para dilucidar el modo en que los factores Nod son percibidos por la planta. Recientemente, se encontraron unas moléculas que podrían actuar como receptores específicos del factor Nod (Cullimore *et al.*, 2001), lo cual brinda la oportunidad de describir acabadamente la vía de transducción de señales que va desde la percepción del factor Nod en la raíz hasta la inducción del ciclo celular en el primordio del nódulo. Estos receptores debieran ser de alta afinidad, ya que el factor Nod actúa en rangos de concentraciones entre  $10^{-9}$  y  $10^{-12}$  M. Además el receptor debería ser capaz de reconocer la longitud del factor Nod, así como las sustituciones presentes en el extremo no reductor dado que la presencia de los ácidos grasos es esencial para que cumpla su función. Probablemente, los ácidos grasos presentes en los factores Nod permitan la interacción de éstos con la membrana vegetal y faciliten su unión al posible receptor (Cullimore *et al.*, 2001). Timmers *et al.* (1998) han obtenido evidencias mediante el uso de anticuerpos contra factores Nod de que los mismos podrían ser internalizados en la pared celular de las raíces de las plantas. Evidencias de los últimos dos años en el sistema de *Lotus* muestran que en la percepción y transducción de la señal Nod participan proteínas receptoras de la familia tirosin-quinasa, que tienen un dominio extracelular con dominios LysM similares a los que presentan las proteínas de unión a peptidoglicanos y quitinas (Stougaard, 2001; Krusell *et al.*, 2002; Stracke *et al.*, 2002; Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003). Esta proteína está codificada por el gen *NFR5* clonado en *Lotus*. Parniske *et al.* (2003) han descrito posibles variantes de estos receptores en *Medicago truncatula* (*NFR1* y *LYK3*). La interacción con estos receptores eventualmente llevaría a que se produzcan fenómenos tardíos que incluyen deformación de los pelos radiculares, división de células corticales y la propia formación de los nódulos.



### **I.5.2. Adsorción de los rizobios a las raíces**

El proceso de adsorción también consta de varias etapas e involucra diversos factores, ya sea de la planta como lectinas y aglutininas, o del rizobio como fibrillas de celulosa, polisacáridos superficiales, fimbrias, y diversas adhesinas (como por ejemplo la proteína de unión de *Caricadhesina*) (Dazzo *et al.*, 1983; Vesper *et al.*, 1986; Smit *et al.*, 1987; Lagares, 1989; Smit *et al.*, 1989; Ho *et al.*, 1990; Wall *et al.*, 1991; Smit *et al.*, 1991; Lodeiro *et al.*, 1999; Lodeiro *et al.*, 2000; Bianciotto *et al.*, 2001; Ausmees *et al.*, 2001; Dardanelli *et al.*, 2003).

En un principio los rizobios se unen a la raíz en una forma laxa, que pasa a una unión firme después de algunas horas de contacto con la planta. Posteriormente, y luego de un tiempo más prolongado, se produce una colonización más numerosa con las bacterias firmemente unidas a la superficie radical. No es claro si esta última etapa tiene relevancia simbiótica. Varios autores han estudiado la adsorción en tiempos prolongados y aún postulan que es aquí donde se produce la colonización de la punta del pelo radicular que precede a su deformación (para una discusión, véase Lodeiro 1994). Sin embargo, dicha colonización es observada sobre pelos maduros, y por otro lado, el tiempo que transcurre desde la inoculación hasta la observación de esta colonización suele ser muy largo. Como veremos enseguida, la infección ocurre en un periodo de unas pocas horas y sobre pelos radiculares en desarrollo, siendo los pelos maduros no infectables. En consecuencia, nos referiremos principalmente a estudios de la adsorción temprana donde las metodologías empleadas hayan permitido la utilización de inóculos relativamente poco concentrados y durante cortos periodos de incubación, lo cual es probable que refleje mejor las actividades del inicio del proceso de infección.

La adsorción de *B. japonicum* a raíces de soja responde en general a las características del proceso en otros sistemas simbióticos. El proceso se inicia en forma inmediata al momento en que los rizobios son puestos en contacto con las raíces y es óptimo con rizobios en fase de crecimiento exponencial, siendo los de fase estacionaria muy poco eficientes en esta actividad (Vesper y Bauer, 1985; Lodeiro y Favelukes, 1999). No todos los rizobios presentes en un inóculo dado son capaces de adsorberse, sino que esta propiedad ha sido atribuida a una subpoblación (Vesper y Bauer, 1985) que probablemente coincida con los rizobios que poseen pili (Vesper y Bauer, 1986). En concordancia con ello, se han descrito lectinas de origen bacteriano que parecen jugar un rol en la adsorción (Ho *et al.*,

1990). Estas lectinas se ubican en uno de los polos de la célula bacteriana, lo cual ha sido observado no sólo en *B. japonicum* (Loh *et al.*, 1993) sino también en *Rhizobium lupini* (Wisniewski *et al.*, 1994) y en *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Ausmees *et al.*, 2001). Dichas lectinas podrían formar parte de los pili (Sauer *et al.*, 2000) aunque esta relación aún no ha sido demostrada en los rizobios mencionados.

A diferencia de algunos rizobios de crecimiento rápido como *S. meliloti* (Caetano Anollés *et al.*, 1989) o *R. etli* (Lodeiro *et al.*, 1995), *B. japonicum* no requiere la presencia de cationes divalentes durante la incubación con plantas para su adsorción a las raíces de soja (Lodeiro y Favelukes, 1999). Sin embargo, recientemente Dardanelli *et al.* (2003) describieron la participación de una adhesina dependiente de  $Ca^{+2}$  en *Bradyrhizobium* sp. similar a la ricadhesina (Smit *et al.*, 1989) que requeriría la presencia de dicho catión para anclarse a la superficie bacteriana durante el crecimiento de los rizobios previo al contacto con las raíces. Como en el caso de los rizobios de crecimiento rápido mencionados antes, existe un componente de especificidad simbiótica en la adsorción de *B. japonicum* a raíces de soja (Lodeiro y Favelukes, 1999).

La posible especificidad simbiótica del proceso de adsorción ha sido discutida por varios autores (véanse p.ej. Dazzo y Truchet, 1983; Smit *et al.*, 1992; Vande Broek y Vanderleyden, 1995) a partir de la idea formulada a principios de los '80 en relación con un rol de la lectina vegetal en el reconocimiento simbiótico, que sería ejercido estableciendo un puente entre los polisacáridos superficiales de la bacteria y el rizobio (Dazzo y Truchet, 1983). Si bien el rol asignado inicialmente a la lectina vegetal parece discutible (Kijne *et al.*, 1997; Hirsch, 1999), experimentos más recientes utilizando plantas transgénicas llevando lectinas de otras leguminosas han demostrado que esta proteína ciertamente participa en el proceso de reconocimiento simbiótico en *R. leguminosarum* *bv. viceae*-arveja (Díaz *et al.*, 1989) *R. leguminosarum* *bv. trifolii*-trébol (van Eijsden *et al.*, 1995), *B. japonicum*-soja (van Rhijn *et al.*, 1998) y *S. meliloti*-alfalfa (van Rhijn *et al.*, 2001). Actualmente se desconoce exactamente cómo las lectinas vegetales intervienen en el reconocimiento simbiótico, pero se cree que su acción se prolonga hasta la penetración de la raíz por parte de los rizobios y que tendría que ver con estrechar el rango de reconocimiento del factor Nod (Hirsch, 1999). Si bien las lectinas tienen como función la unión específica de carbohidratos, se ha descartado que ellas mismas puedan desempeñarse como receptores del factor Nod (Hirsch, 1999).

En *B. japonicum*-soja Halverson y Stacey (1986) demostraron que muy bajas concentraciones de lectina de soja (SBL) son capaces de incrementar

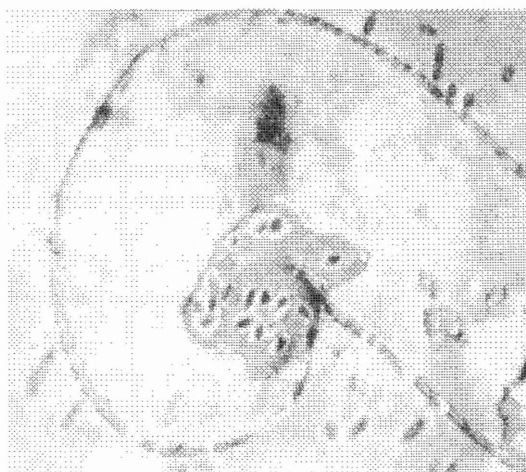
la infectividad de los rizobios. Este efecto requirió además de la preincubación de las bacterias en presencia de SBL y evidencias indirectas señalaron la necesidad de cambios en la expresión génica para que se produzca este aumento de infectividad. Resultados similares fueron luego obtenidos por Wall y Favelukes (1991) para la adsorción de *S. meliloti* a raíces de alfalfa y Lodeiro *et al.* (2000), quienes en el sistema de soja extendieron las observaciones de los efectos estimuladores de SBL a la adhesividad, infectividad y competitividad para la ocupación de nódulos por parte de *B. japonicum*.

Curiosamente, el sitio de unión de SBL –en el polisacárido capsular o CPS– se ubica en el polo celular opuesto al que contiene la lectina bacteriana mencionada más arriba. Este polo es el “polo joven”, es decir el polo que se origina en el punto de separación de las dos células hijas luego de la división celular. Por su parte, la lectina bacteriana está ubicada en el “polo viejo”, o sea aquél que ya está presente antes del alargamiento celular. Si las bacterias se unen a las superficies a través del “polo viejo”, como ha sido observado en *B. japonicum* (Loh *et al.*, 1993) y *R. leguminosarum* *bv. trifolii* (Asumees *et al.*, 2001), entonces la célula unida no necesita desprenderse para liberar células hijas, lo que parece ser un modo generalizado de colonización (Shapiro *et al.*, 2002). Esta posibilidad sugiere que la unión de los rizobios a la raíz podría producirse a través de la lectina bacteriana y que la lectina vegetal modificaría de alguna otra manera la capacidad de anclaje y/o de penetración a través de su unión al polo joven expuesto. En concordancia con ello, Lodeiro y Favelukes (1999) observaron que la SBL no participa durante el proceso de adsorción de *B. japonicum* a raíces de soja, mientras que la lectina bacteriana sí lo hace, y condiciona el componente específico de la adsorción. Por su parte, SBL es capaz de condicionar la capacidad adhesiva de los rizobios con anterioridad a su contacto con las raíces, lo cual requiere de unas 6 a 12 horas (Lodeiro *et al.*, 2000).

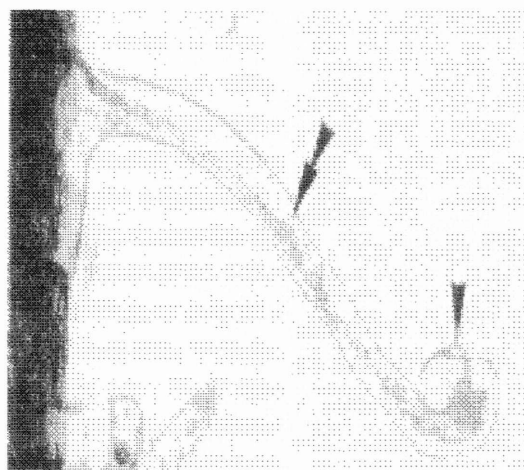
Estas hipótesis no requieren que la colonización de la rizosfera que ocurre después de la adsorción deba necesariamente preceder a la infección, lo cual concuerda con las observaciones de que la penetración de los pelos radiculares es un proceso relativamente rápido luego de la inoculación (Bhuvaneshwari *et al.*, 1980).

### 1.5.3. Infección de la raíz

El proceso de infección se inicia de dos maneras diferentes, que dependen de la especie de planta. El más estudiado es el proceso mediante el cual los rizobios penetran por los pelos radiculares a través de un canal que se prolonga hasta las zonas subcorticales (Gage y Margolin, 2000; Limpens y Bisseling, 2003). En el otro proceso, compartido con los nodos de infección en sistemas de fijación simbiótica de  $N_2$  en no leguminosas, los rizobios penetran por roturas que generalmente ocurren en las axilas de raíces secundarias emergentes y se dispersan luego por los espacios intercelulares (Boogerd y van Rossum, 1997). Dado que el primer proceso es el que ocurre en soja, lo expondremos con más detalles a continuación. El comienzo de este proceso de infección es visible al microscopio por un encorvamiento característico de la punta de los pelos radiculares, que atrapa a los rizobios en el interior de dicha curvatura o enrollado (Figura 1.5). No todos los pelos de las raíces son igualmente susceptibles a la infección por los rizobios, sino solamente aquellos que se denominan pelos emergentes. Inmediatamente la pared celular de las células corticales se debilita, comienza a invaginarse y forma una estructura en forma



**Figura 1.5.** Micrografía electrónica original de Sahlman y Fåhraeus (1963) mostrando el enrollado de un pelo radicular. Obsérvese a los rizobios englobados en la curvatura interior del pelo, y el inicio de la formación del hilo de infección (aumento: 5.500 veces).



**Figura 1.6.** Micrografía de un hilo de infección. La flecha simple señala el enrollado en la punta del pelo radicular y flecha doble el hilo o canal de infección, por donde los rizobios migran hacia las células subcorticales de la raíz. Reproducido de Truchet *et al.*, 1985.

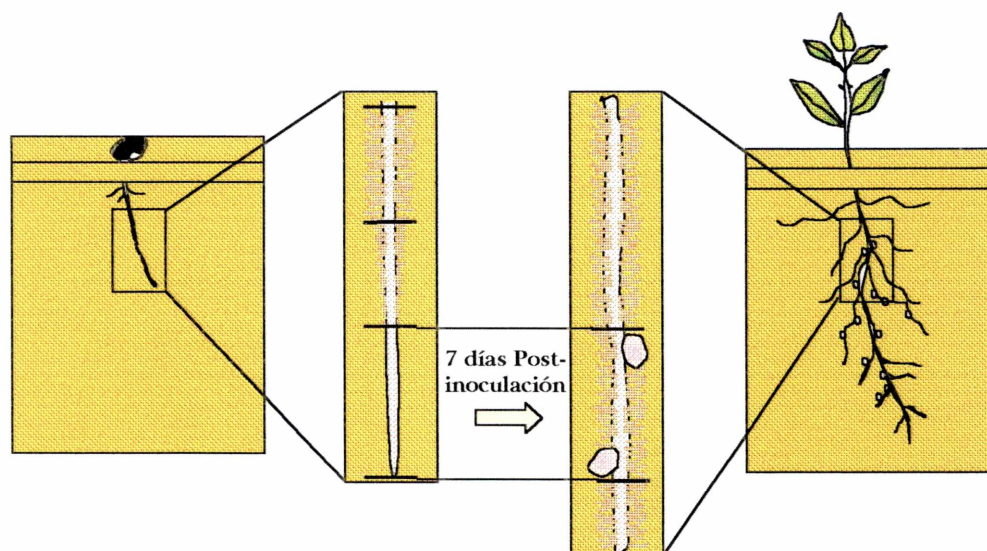
de tubo de composición similar a la pared celular, conocida como hilo de infección, dentro del cual los rizobios avanzan hacia la zona cortical o subcortical, e invaden los nódulos en desarrollo. (Kijne, 1992; Gage y Margolin, 2000 y referencias citadas allí). (Fig. 1.6).

El análisis del contenido de nódulos obtenidos de plantas coinoculadas con más de una cepa de rizobios mostró que los nódulos individuales tienden a estar ocupados por una sola cepa, sugiriendo que cada una de las infecciones es iniciada por una única bacteria. Recientemente Stuurman *et al.* (2000) obtuvieron una comprobación directa de esta hipótesis al observar la formación de hilos de infección por parte de mezclas de rizobios a los cuales se les incorporó genes que codifican para un juego de proteínas fluorescentes. Así, estos autores pudieron identificar *in vivo* a los ocupantes de cada hilo de infección y corroborar que provienen de sucesivas divisiones celulares de una bacteria inicial que penetró por el pelo, o a lo sumo de dos bacterias. Finalmente, los rizobios que se encuentran recorriendo el hilo de infección son liberados al citoplasma de las células del primordio del nódulo, donde se diferencian a bacteroides. La diferenciación de los rizobios en bacteroides requiere de la expresión diferencial de una gran cantidad de genes con lo cual se dispara en el rizobio programas de desarrollo (Stougaard, 2001; Patriarca *et al.*, 2002). Por ejemplo, en *S. meliloti* se ha detectado la expresión diferencial de más de 350 genes entre el estado de vida libre y el de bacteroide (Natera *et al.*, 2000). A lo largo de este proceso, en las células vegetales se observan rearrreglos del citoesqueleto (Cárdenas *et al.*, 2003) y depósito de material en la pared celular apical (Turgeon *et al.*, 1985; Oke y Long, 1999).

Durante todo el proceso de penetración a través del hilo de infección, invasión del nódulo y diferenciación a bacteroides los sistemas de defensa del vegetal deben estar inhibidos pese a que aún no se haya manifestado el potencial simbiótico de la asociación y el rizobio se esté comportando más bien como un parásito puesto que consume recursos de la planta cuando aún no empezó a fijar N<sub>2</sub>. La inhibición de estos sistemas de defensa parece estar provocada por los polisacáridos extracelulares de los rizobios (Fraysse *et al.*, 2003). En el caso particular de *B. japonicum* Parniske *et al.* (1994) describieron cómo ciertos sistemas de defensa de la soja, como la producción de gliceolina o la activación de quitinasas, se ponían en marcha cuando las plantas eran inoculadas con mutantes defectuosos en la producción de exopolisacáridos (EPS), a diferencia de la falta de respuesta observada con la cepa salvaje. No puede descartarse

que las lectinas vegetales como SBL, que se unen a los CPS y EPS, actúen también a este nivel de reconocimiento.

No todos los hilos de infección que se inician dan por resultado un nódulo. Muchos hilos de infección abortan, y en el caso de que más de una infección se inicie en un área pequeña de la raíz, se obtendrá un único nódulo, en algunos casos ocupado por más de una cepa. La cantidad de nódulos que un inoculante sea capaz de formar será entonces el resultado neto del número de infecciones iniciadas que culminan en una invasión exitosa. Esta capacidad se conoce como la *infectividad* del inoculante en cuestión. Es obvio que tanto para propósitos de estudio básico como de aplicación tecnológica resulta de primera importancia medir la infectividad. En 1980 Bhuvanewari *et al.* diseñaron una metodología ingeniosa para este fin, que se basa en el empleo del sistema de cultivo de las plantas en bolsas plásticas de crecimiento (Figura 1.7). Las plantas se colocan en una bolsa transparente que contiene en su interior un papel absorbente húmedo y a continuación se marcan en el exterior de la bolsa las posiciones de la punta de la raíz (PR) y la de los pelos emergentes más pequeños (PEMP) de cada planta. Estas marcas limitan la zona de la raíz que se encuentra infectable en ese momento – recuérdese que los pelos maduros no pueden ser infectados ya que no son capaces de deformarse ni de producir la invaginación de la pared celular que da origen al hilo de infección. Inmediatamente después de efectuadas las marcas, se inocula y se espera hasta que aparezcan los nódulos. Lógicamente, para entonces la raíz habrá crecido y muy probablemente aparezcan nódulos en zonas que no se hallaban presentes al momento de la inoculación, es decir que veremos esos nódulos por debajo de la marca de PR. Pero cuanto más cerca de PR aparezca un nódulo, más rápido se habrá iniciado la infección que lo originó ya que el tejido radical apenas se desplaza con el crecimiento de la raíz. Incluso, si aparecen nódulos entre las marcas de PR y PEMP, éstos se habrán originado inmediatamente después de la inoculación (Figura 1.7). De manera que la *distancia respecto de PR* a la cual se sitúe cada nódulo será proporcional a la rapidez con que se produjo la infección que lo originó y por lo tanto, cuantos más nódulos cerca o por encima de PR sea capaz de producir un inoculante, mayor será su infectividad. Con este dispositivo Bhuvanewari *et al.* (1980) pudieron establecer que en soja las infecciones más tempranas ocurren dentro de las 6 horas inmediatas a la inoculación. Actualmente este sistema experimental es ampliamente utilizado no sólo en estudios académicos sino también en la industria productora de inoculantes para cuantificar la infectividad.



**Figura 1.7.** Determinación de la infectividad en bolsas plásticas de crecimiento. Al momento de la inoculación se marca sobre la bolsa la región infectable comprendida entre los pelos emergentes más pequeños y la punta de la raíz (izquierda). Luego de unos 10 días se mapea la posición de los nódulos en relación con dicha zona (derecha). Los nódulos observados allí provienen de infecciones iniciadas dentro de las seis horas inmediatas a la inoculación (el tiempo requerido para que los pelos radiculares de esa zona maduren y se vuelvan no infectables). Los nódulos registrados por debajo de esa zona corresponden a infecciones más tardías. Así, el recuento de las proporciones relativas de nódulos en cada zona permite cuantificar la infectividad.

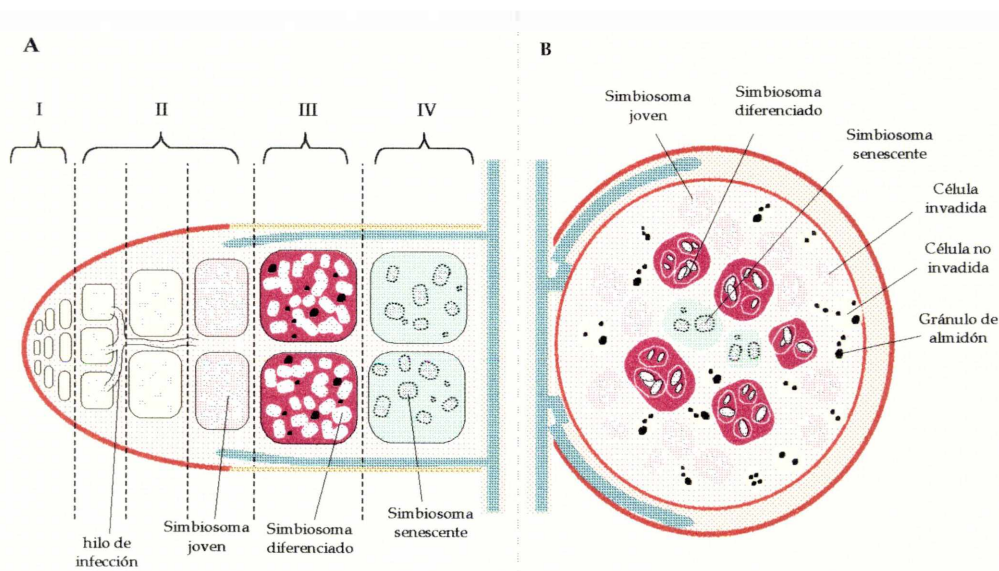
La planta no forma un número ilimitado de nódulos, sino unos pocos. La regulación de la cantidad de nódulos totales formados se ejerce a nivel de los nódulos más tempranos, que van inhibiendo la formación de nódulos ulteriores (Caetano Anollés y Gresshoff, 1991, Schauuser *et al.*, 1999). El mecanismo que inhibe la formación de nuevos nódulos cuando la planta ya dispone de un cierto número de nódulos funcionales o de fuentes de N alternativas en el suelo se basa en un sistema de retrocontrol en el cual participan señales controladas por la parte aérea (Krusell *et al.*, 2002).

### **I.5.5. Organogénesis del nódulo**

El primordio del nódulo se induce por la acción del factor Nod que en principio, se pone en contacto con la epidermis de la raíz. Este evento



ocurre en paralelo con la colonización de la rizosfera y la formación del hilo de infección. Una vez inducido, en el primordio continúan las divisiones mitóticas de las células corticales, que sufren un proceso de desdiferenciación, y esto conduce a la formación de un meristema cuya función será generar el tejido en crecimiento del nódulo. Según el tipo de célula subcortical que comienza a dividirse será el tipo de nódulo formado. Esto lleva a la formación de los tipos de nódulos diferentes: los determinados y los indeterminados (para una revisión véase Patriarca *et al.*, 2002) (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Esquemas de cortes longitudinales de un nódulo indeterminado (A) y un nódulo determinado (B). Para una descripción detallada, véase el texto.

En ciertas leguminosas, como soja, poroto y *Lotus* son las células del cortex externo las que se activan mitóticamente y éstas forman los llamados nódulos determinados; mientras que en leguminosas de climas templados, como arveja, trébol y alfalfa, son las células del cortex interno las que comienzan a dividirse (Kijne, 1992) y forman los nódulos indeterminados. Los nódulos determinados son redondeados y presentan un meristema apical que no es permanente. Los indeterminados son alargados y las células del cortex interno generan un meristema apical persistente.



El crecimiento de los nódulos determinados se basa en la expansión en vez de en la división celular, razón por la que presentan una morfología esférica en vez de cilíndrica (Hirsch, 1992). La causa de la ausencia de un meristema permanente la podemos encontrar en el proceso de formación. Se ha comprobado que las primeras divisiones celulares en respuesta a la presencia de los rizobios son anticlinales y se producen en la hipodermis (Newcomb *et al.*, 1979; Rolfe y Gresshoff, 1988). Después de estas divisiones comienzan las divisiones en el periciclo. Posteriormente, estos dos meristemas convergen generando el primordio nodular, en el cual podemos encontrar células no vacuoladas procedentes de las divisiones de la hipodermis conformando el tejido central del nódulo, y células con un elevado grado de vacuolización procedentes de las divisiones en el periciclo, componiendo el parénquima nodular que rodea al tejido central. En estos nódulos las células infectadas más jóvenes están inmediatamente por debajo del tejido periférico, los simbiosomas funcionales se encuentran en una capa intermedia, mientras que los simbiosomas senescentes se hallan en la zona central. Los simbiosomas funcionales, a diferencia de los existentes en nódulos indeterminados, pueden presentar más de un bacteroide en su interior. Al igual que en los nódulos indeterminados, los haces vasculares corren por el tejido periférico. En estos nódulos los rizobios luego de liberarse se dividen múltiples veces en las células de la planta que a su vez se están multiplicando (Oke *et al.*, 1999).

En los nódulos indeterminados en la zona más exterior se hallan las células vacuoladas del córtex, y hacia el interior se encuentran la endodermis y el parénquima, en donde también aparecen en la periferia los haces vasculares. En estos nódulos se distinguen cuatro zonas transversales, llamadas zona I o del meristema libre de bacterias, zona II o zona donde penetran los hilos de infección y los bacteroides se dividen y diferencian, zona III o zona de simbiosomas fijadores de N<sub>2</sub> y zona IV o zona donde se encuentran bacteroides en senescencia, y es la que está más cercana a la raíz. Estas zonas se suceden desde el ápice del nódulo hacia la base.

Durante la organogénesis del nódulo el patrón de expresión génica de la planta se modifica significativamente. Estudios recientes sugieren que unos 400 genes se expresan diferencialmente en el tejido nodular respecto del radical (Gyorgyey *et al.*, 2000). Entre estos genes se encuentran los que codifican nodulinas tempranas y tardías –así llamadas por su patrón de expresión temporal en el nódulo (Cohn *et al.*, 1998; Stougaard, 2000).

### **I.5.6. La invasión del nódulo y la fijación de N<sub>2</sub>**

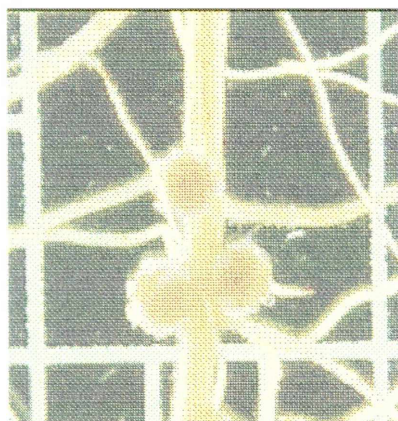
Los rizobios que provienen del hilo de infección se liberan en el citoplasma de las células del primordio del nódulo, donde son envueltos por una membrana de origen vegetal llamada membrana peribacteroidal. Esta membrana posee una composición de fosfolípidos (Hernández *et al.*, 1995) y proteínas (Verma, 1992; Verma y Hong, 1996; Cermola *et al.*, 2000) diferente a la de la membrana plasmática, con características que le confieren propiedades especiales. Además, esta membrana contiene nodulinas y probablemente proteínas de origen bacteriano (Verma y Hong, 1996).

Dentro de esta estructura los rizobios se diferencian a bacteroides. El conjunto de bacteroides rodeados por una misma membrana peribacteroidal se llama simbiosoma, y es en estas estructuras donde los bacteroides realizan la fijación de N<sub>2</sub>.

La fijación de N<sub>2</sub> es catalizada por la enzima nitrogenasa (EC 1.18.6.1.) de los rizobios de acuerdo a la siguiente reacción:



La nitrogenasa es un complejo multienzimático producido por los bacteroides, que cataliza varias etapas de la reacción. Esta enzima está constituida por dos componentes, un homodímero de una hierro-proteína que es capaz de unir ATP y que está codificada por el gen *nifH* y un heterotetrámero de una molibdeno-hierro (Mo-Fe) – proteína, codificada por los genes *nifD* y *nifK*, que contiene el cofactor Mo-Fe (Cebolla y Palomares, 1994; Halbleib y Ludden, 2000). La nitrogenasa es una enzima altamente sensible al O<sub>2</sub>, que desnaturaliza irreversiblemente a su cofactor Mo-Fe (Shaw y Brill, 1977). Por lo tanto en el cortex externo del nódulo existe una capa de células que actúa como barrera al O<sub>2</sub> posibilitando así un ambiente microaerófilo en el interior donde las concentraciones de O<sub>2</sub> son del orden de 3 a 30 nM, unas 10<sup>4</sup>-10<sup>5</sup> veces menores que las encontradas habitualmente en los fluidos de los tejidos aeróbicos. Dado que el proceso de fijación de N<sub>2</sub> demanda al menos 16 moles de ATP por mol de N<sub>2</sub> reducido, el bacteroide debe llevar adelante un metabolismo oxidativo para producir esa cantidad de energía. La solución a este problema la aporta la leghemoglobina, una proteína vegetal con similitud a las globinas animales y que es capaz de transportar O<sub>2</sub> a muy baja presión parcial en el ambiente del nódulo (Kundu *et al.*, 2003).



**Figura 1.9.** Nódulos de soja maduros expresando leghemoglobina.

Además, durante la diferenciación de los rizobios en bacteroides, se sintetiza un tipo de citocromos cuya afinidad por el  $O_2$  también es más elevada que la de sus contrapartes de vida libre (Fisher, 1994).

Dado que la leghemoglobina es roja, la actividad fijadora de  $N_2$  en los nódulos es fácilmente detectable visualmente por una coloración rosada del interior de dichos órganos, a diferencia de la coloración blanca de los nódulos inefectivos o la marrón-verdosa de los nódulos senescentes (Figura 1.9).

## **1.6. Metabolismo de los rizobios**

### **1.6.1. Metabolismo energético y biosíntesis de polímeros ricos en C**

Los rizobios utilizan varias fuentes de C para su metabolismo como por ejemplo: manitol, glucosa, gluconato, sacarosa, maltosa, ácidos orgánicos y algunas especies también pueden metabolizar compuestos aromáticos. La mayoría de estos compuestos se encuentran en la rizósfera. Por otra parte, los bacteroides sólo son capaces de utilizar malato y succinato provenientes de la planta como fuentes de C y energía (Lodwig y Poole, 2003).

Se sabe que existen diferencias en la utilización de los compuestos de C entre los rizobios de crecimiento rápido y lento (Stowers, 1985). En general los rizobios de crecimiento rápido son capaces de crecer en una variedad mayor de sustratos que los lentos. *B. japonicum* puede utilizar manitol, glucosa, malato, succinato o arabinosa pero no lactosa ni sacarosa. La asimilación de la glucosa y otros azúcares en los rizobios se lleva a cabo por medio de la ruta de Entner-Doudoroff, aunque existen evidencias de que en *B. japonicum* también tiene lugar la ruta de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) o glicólisis (Stowers, 1985; Martínez-Drets *et al.*, 1977). Además, se ha encontrado el gen que codifica para esta enzima, característica de la glicólisis, se halla presente en el genoma de *B. japonicum* (Kaneko *et al.*, 2002). También juega un rol importante la vía de las pentosas fosfato a partir de la cual las bacterias obtendrían poder

reductor. En *B. japonicum* la enzima 6-fosfogluconato dehidrogenasa (enzima clave de esta ruta) no es dependiente de  $\text{NADP}^+$ , como en la mayoría de las bacterias incluyendo los rizobios de crecimiento rápido, sino de  $\text{NAD}^+$ . Saavedra *et al.* (2001) demostraron que la vía de las pentosas fosfatos es la principal vía de degradación de las hexosas y otras fuentes de carbono en la cepa mutante *B. japonicum* BGA-1 en la cual están cortadas las rutas de Entner-Doudoroff y EMP, sugiriendo así que la vía de las pentosas fosfato podría cumplir funciones catabólicas en cepas normales de esta especie.

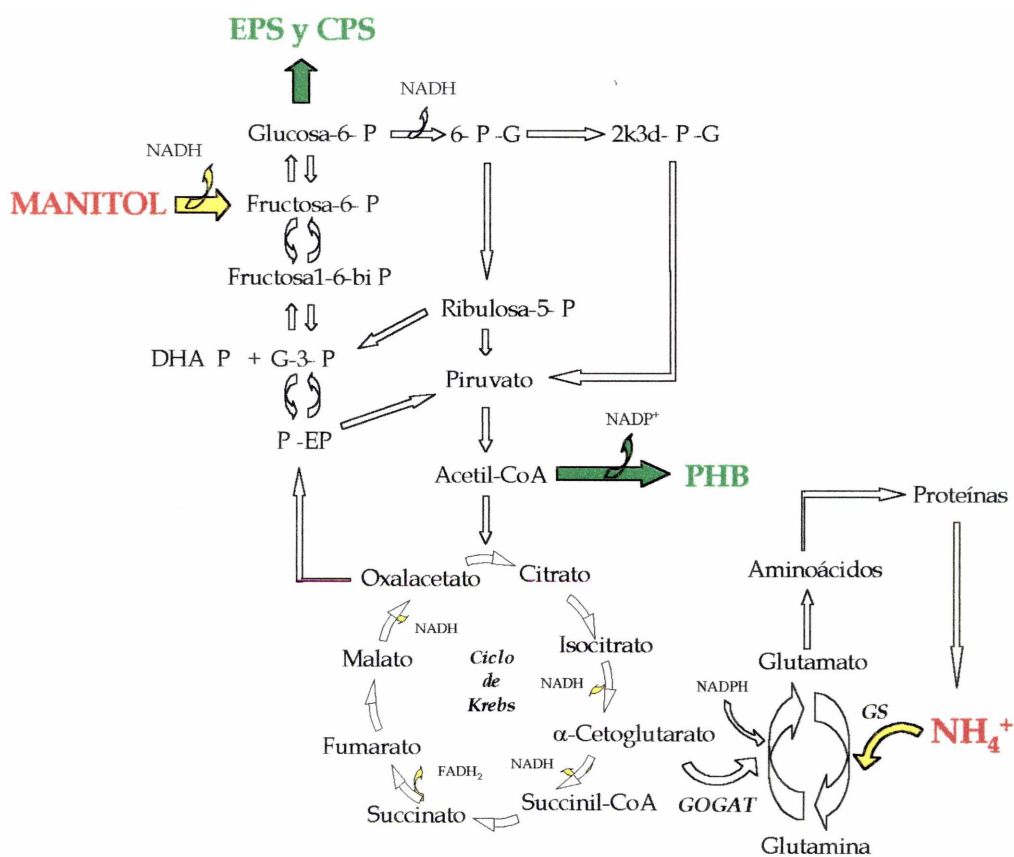


Figura 1.10. Esquema de las vías de asimilación de C y N en *B. japonicum*

Como en la mayoría de las bacterias, el piruvato formado en estas vías degradativas luego se descarboxila a acetil-CoA y este compuesto entra en el ciclo de Krebs (ver Figura 1.10). *B. japonicum* también es capaz de crecer, aunque con menor eficiencia, con compuestos de dos átomos de C ya que posee las reacciones anapleróticas del ciclo del glioxilato (Green y Emerich, 1997). Además, esta especie posee una Rubisco que le permite procesar el  $\text{CO}_2$ , aunque no está muy claro cuál es el rol de esta enzima en

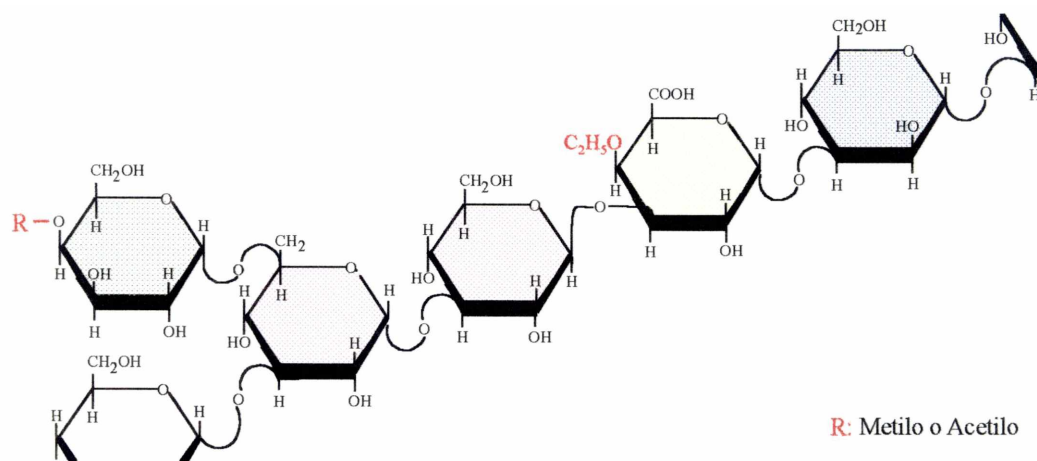
el metabolismo carbonado en vida libre o en nódulos (Horken y Tabita, 1999).

Cuando los cultivos bacterianos se encuentran en condiciones tales que se reduce su velocidad de crecimiento –como por ejemplo al pasar de la fase exponencial a la estacionaria en cultivos líquidos en batch– pueden encontrarse en una situación de exceso de C y carga energética, dependiendo de cuáles hayan sido los nutrientes limitantes que llevaron a esta situación (Zevenhuizen, 1981). En estas circunstancias, dicho exceso se acumulará como algún compuesto de reserva o algún polímero, y esto puede estar relacionado con la fuente de C utilizada y la relación C/N dentro de la célula.

Entre los compuestos de reserva se ha reportado al glucógeno y al poli-hidroxi-butirato (PHB), que se acumulan como gránulos en el citoplasma (Madison y Huisman, 1999). El PHB se forma a partir de acetil CoA en tres pasos y utiliza NADPH como fuente de poder reductor (ver figura 1.10). Los rizobios son capaces de degradarlo y utilizarlo como fuente de C en condiciones de escasez de C extracelular. Sin embargo, la biosíntesis de este polímero también ha cobrado importancia en el bacteroide (Lodwig y Poole, 2003): rizobios mutantes incapaces de sintetizar PHB resultaron poseer una aumentada capacidad de fijación de N<sub>2</sub>, quizás como resultado de su mayor disponibilidad de NADPH (Cevallos *et al.*, 1996). No está clara aún la función del PHB en el bacteroide, ya que los rizobios así diferenciados no pueden dividirse y son dependientes de la planta para satisfacer sus necesidades de C (Lodwig y Poole, 2003).

Otros polímeros sintetizados en situaciones de exceso de C no cumplen funciones como compuestos de reserva ya que no son metabolizables por los rizobios. En este grupo de polímeros encontramos a los polisacáridos extracelulares, donde podemos agrupar a los EPS y CPS (Zevenhuizen, 1981). En *B. japonicum* estos dos polisacáridos superficiales poseen idéntica estructura (Mort y Bauer, 1982) pero difieren en su localización, siendo los EPS los que se encuentran libres en el medio de cultivo y los CPS los que están unidos a la superficie celular. Están formados por la polimerización de una unidad pentamérica formada por: 1 manosa: 2 glucosas: 1 ácido galacturónico y 1: (O-acetil u O- metil)- galactosa (Figura 1.11). La abundancia relativa de la forma acetilada o metilada de este último azúcar en la composición del CPS cambia entre la fase de crecimiento exponencial, donde es más abundante la forma acetilada, y la

estacionaria, donde abunda más la metilada. Estos cambios tienen importancia con respecto a la unión de SBL, que es más afín por la forma acetilada (Bhuvaneswari *et al.*, 1977). Si bien ninguno de estos dos polisacáridos extracelulares sirven como reservas de C y energía ya que no pueden ser metabolizados por los rizobios, diversos estudios han demostrado que cumplen funciones en algunas de las etapas de la simbiosis (Frayse *et al.*, 2003). Además, estos polisacáridos extracelulares podrían ser esenciales para la formación de la matriz en una posible estructura de biofilm (Stoodley *et al.*, 2002).



**Figura 1.11.** Esquema de la unidad repetitiva de los EPS y CPS de *B. japonicum*.

En situaciones de estrés osmótico suele incrementarse la biosíntesis de glucanos cíclicos, que se acumulan en el periplasma y podrían cumplir un rol protector. Se trata de polímeros cíclicos de glucosa unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$ -1,2 en la mayoría de los rizobios. Sin embargo, en *Bradyrhizobium* los residuos de glucosa están unidos tanto por enlaces  $\beta$ -1,3, como por enlaces  $\beta$ -1,6 (Bhagwat *et al.*, 1996). Se ha sugerido que los  $\beta$ -1,2-glucanos cíclicos poseen roles tanto en los rizobios de vida libre como durante el proceso de infección a las raíces de las plantas leguminosas (Breedveld y Miller, 1994). Recientemente, Chen *et al.* (2003) postularon la hipótesis de que los glucanos cíclicos además de su rol protector ante la osmolaridad jugarían un papel en la supresión de los mecanismos de defensa de la planta durante la infección.



La biosíntesis de todos estos polisacáridos se inicia a partir de formas activadas de glucosa. En el caso del glucógeno la forma activada es ADP-glucosa, mientras que en el de los polisacáridos extracelulares y el glucano cíclico es UDP-glucosa (Zorreguieta y Ugalde, 1986; Zorreguieta *et al.*, 1988; Ielpi *et al.*, 1990). La ruta biosintética de estos polímeros puede dividirse en un conjunto de reacciones tempranas, donde la glucosa se activa y se isomeriza a otros azúcares simples –p.ej. galactosa, manosa– y otro de reacciones tardías, donde los componentes se combinan en una unidad estructural repetitiva (p.ej. la mostrada en la Figura 1.10 para el EPS de *B. japonicum*), la cual se ensamblaría en el periplasma en polímeros de gran longitud, los que luego se exportan al medio extracelular. Estudios llevados a cabo en *S. meliloti* por resonancia magnética nuclear han sugerido que las etapas tempranas se cumplen en una forma cíclica, donde el C pasa a través de la rama oxidativa de la vía de las pentosas fosfato antes de dirigirse a las reacciones tardías (Portais *et al.*, 1999). No está clara la función de este ciclo ni tampoco si el mismo opera en otras especies de rizobios.

### **1.6.2 Asimilación del N**

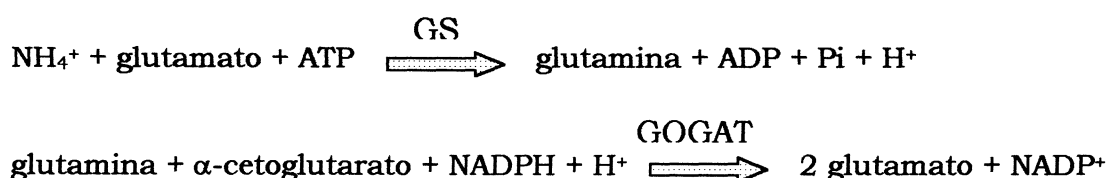
La asimilación de N tiene gran importancia puesto que este elemento actúa no sólo como nutriente sino también como señal en el proceso simbiótico. En particular, la simbiosis fijadora de N<sub>2</sub> sólo tiene lugar en ambientes pobres en N. Así, es esperable que los rizobios estén adaptados a captar y asimilar N presente en bajas concentraciones en el entorno.

Las fuentes de N más comúnmente utilizadas por los rizobios en vida libre son los aminoácidos, el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y el NO<sub>3</sub><sup>-</sup> mientras que bajo la forma de bacteroide se cree que utiliza mayormente aminoácidos suministrados por la planta. También se ha detectado una utilización de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> por los bacteroides, pero en este caso parecería cumplir un rol como aceptor de electrones en situaciones de caída brusca de la presión parcial de O<sub>2</sub> que suelen ocurrir como respuesta al estrés, más que como nutriente (Lucinski *et al.*, 2002). Como se explicó más arriba, si bien el bacteroide es notable por su capacidad de reducir el N<sub>2</sub> a NH<sub>3</sub>, este producto es enteramente transportado a la planta y no es utilizado por el propio bacteroide, a diferencia de lo que ocurre en los diazótrofos no simbióticos.

En vida libre, el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> parece ser el nutriente nitrogenado principal. Este entra al rizobio mediante un transportador de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> codificado por *amtB*, descrito en *Rhizobium etli* y que se cree es activo en las otras especies.

En el genoma de *B. japonicum* existe una secuencia a *amtB*, cuya secuencia de proteína deducida del gen corresponde con el mencionado transportador. Este transportador, que tiene alta afinidad por el  $\text{NH}_4^+$ , se inactiva en el bacteroide, previniendo así el reingreso del  $\text{NH}_4^+$  producido en la fijación de  $\text{N}_2$  (Tate *et al.*, 1998; Patriarca *et al.*, 2001) (ver Figura 1.13 en página 41).

La asimilación posterior del  $\text{NH}_4^+$  incorporado a la célula se lleva a cabo mediante el ciclo glutamino sintetasa (GS, EC 6.3.1.2) – glutamato sintasa (GOGAT, EC 1.4.1.14), cuya secuencia de reacciones se muestra a continuación



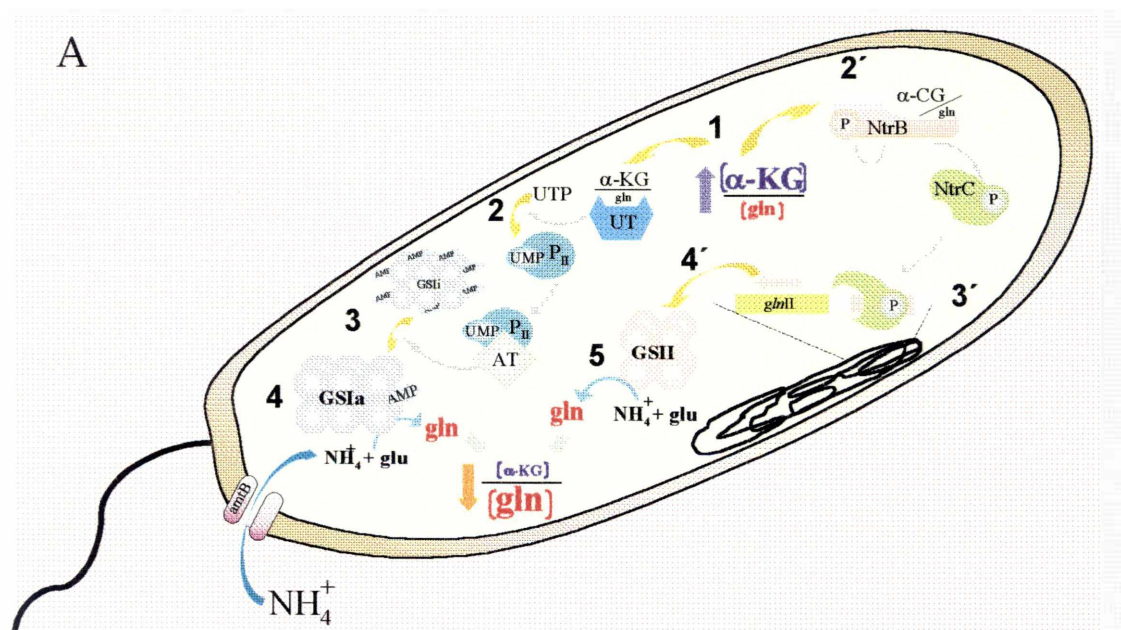
La enzima GS cataliza la formación de glutamina a partir del glutamato y  $\text{NH}_4^+$  disponible en la célula. La enzima GOGAT cataliza la formación de dos moléculas de glutamato a partir de una de glutamina y una de  $\alpha$ -cetoglutarato; una de las dos moléculas de glutamato producidas reinicia el ciclo, sirviendo otra vez como sustrato para la GS mientras que la segunda molécula contribuye a diversas vías metabólicas con el N asimilado. Así, el glutamato es un importante dador de nitrógeno a otros aminoácidos, purinas, pirimidinas y en general otros compuestos nitrogenados, con lo cual cumple un rol clave en las etapas iniciales de asimilación de N (Reitzer, 1996a y b). Un sistema alternativo, aunque de menor afinidad, para realizar la misma reacción es la glutamato deshidrogenasa (GDH), presente en otras bacterias pero no en los rizobios (Ludwig, 1978; Howitt y Gresshoff, 1985; Bravo y Mora, 1988; Mendoza *et al.*, 1995; Patriarca *et al.*, 2002, ).

*B. japonicum*, como casi todos los rizobios y a diferencia de las enterobacterias, posee dos formas de esta enzima : GS I y GS II (Carlson *et al.*, 1987). Hasta el momento sólo se ha descrito la presencia de GS III en *S. meliloti* y *R. leguminosarum* (de Bruijn *et al.*, 1989, Chiurazzi *et al.*, 1992; Shatters *et al.*, 1993). La forma I está codificada en el gen *glnA* y es similar a la enzima de *E. coli*: posee 12 subunidades idénticas, es estable a 50°C, y su actividad está regulada principalmente por el estado de adenilación de cada subunidad siendo inactiva la enzima totalmente adenilada. La reacción de adenilación está regulada por una proteína llamada  $\text{P}_{\text{II}}$  (codificada por el gen *glnB*), la cual se uridila cuando no hay



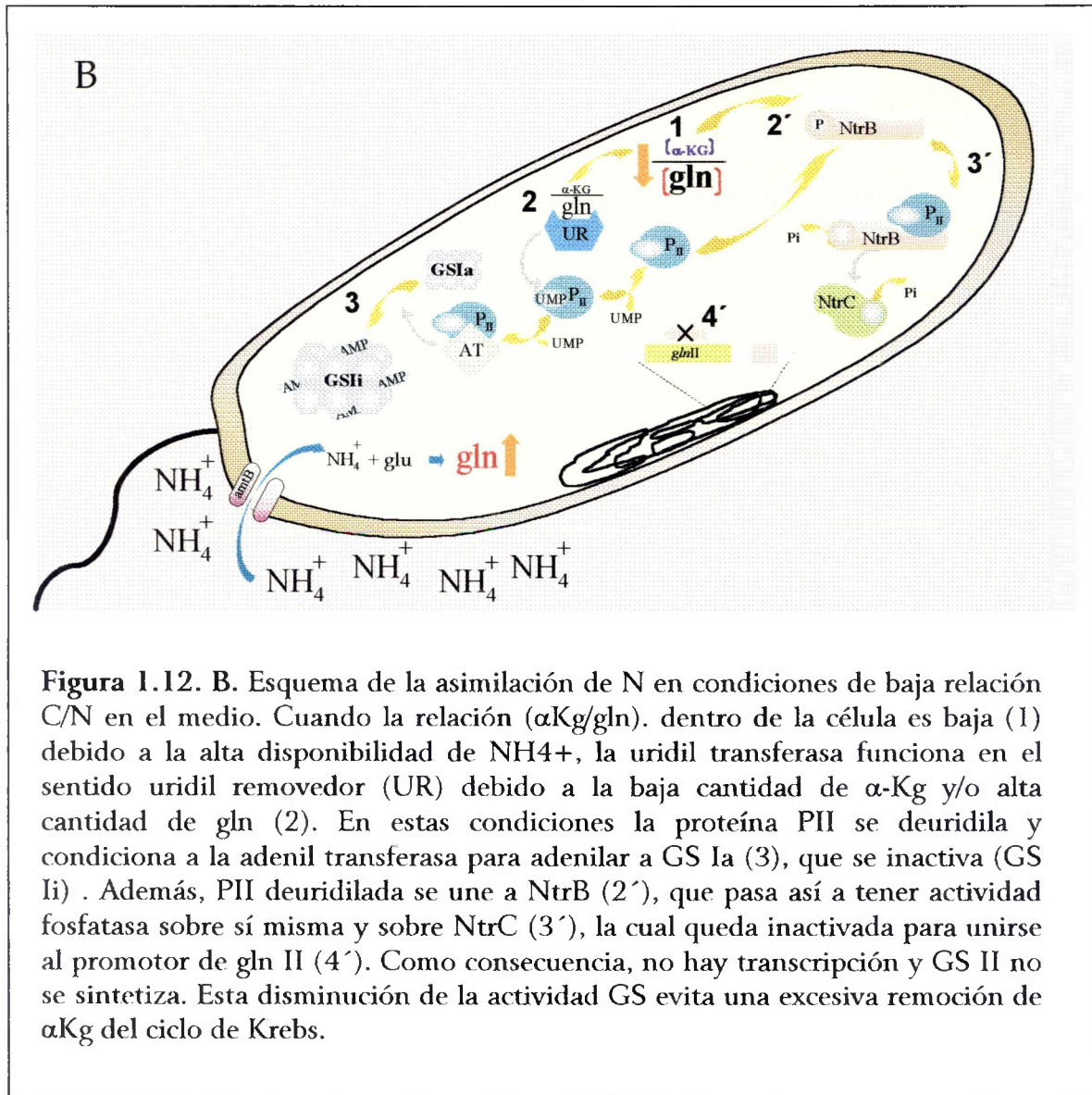
glutamina en la célula y en estas condiciones activa la deadenilación de GS I, (Patriarca et al., 2002; Arcondéguy, et al., 2001). La forma II está codificada en el gen *glnII*, es inestable a 50°C, guarda semejanza con la GS de cloroplastos, y su expresión se activa por medio del sistema de dos componentes NtrBC cuando los rizobios crecen en medios limitados en determinadas fuentes de N como por ejemplo NH<sub>4</sub><sup>+</sup> y glutamina (Bravo y Mora, 1988, Martin et al., 1988) (Figura 1.12). La actividad de GS I y GS II está regulada por la relación de las cantidades relativas de  $\alpha$ -cetoglutarato y de glutamina dentro de la célula (ambos son sustratos del ciclo GS-GOGAT e indican el balance metabólico entre C y N intracelular, Ninfa et al., 1995). Cuando la cantidad de N dentro de la célula es suficiente, o sea la relación de  $\alpha$ -cetoglutarato/glutamina es baja, GS I está parcialmente activa, dependiendo del número de subunidades adeniladas, y hay baja expresión de *glnII*. Sin embargo, cuando la demanda celular de compuestos nitrogenados aumenta y el nivel de glutamato es bajo en relación al de  $\alpha$ -cetoglutarato, la actividad de GS I y GS II aumentan para incrementar la captación de NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (se induce la síntesis de GS II y se deadenilan las subunidades de GS I). En estos casos, el NH<sub>4</sub><sup>+</sup> puede provenir no sólo del medio extracelular, sino también del reciclado de proteínas y otros polímeros intracelulares que contengan N, el cual también se canaliza a través del ciclo GS-GOGAT luego de la degradación de dichos polímeros.

El sistema de dos componentes NtrBC es diferente a los clásicos sistemas descritos debido a que tanto el sensor como el regulador son intracelulares. NtrB se autofosforila y se activa, como dijimos, cuando hay baja cantidad de glutamina en la célula. De esta manera, fosforila a NtrC y éste activa la transcripción de *glnII* (Figura 1.12). En *R. leguminosarum* se ha descrito además, que la actividad quinasa de NtrB está regulada por P<sub>II</sub> (ver Figura 1.12). Cuando P<sub>II</sub> está deuridilada (esto sucede cuando hay exceso de N en la célula) se une a NtrB estimulando su actividad fosfatasa sobre NtrC. De esta manera, NtrC desfosfofrilado no puede activar la síntesis de GS II (Figura 1.12). Por otra parte, se ha reportado en *R. leguminosarum* biovar *viciae* que la expresión de GS II está regulada también por una proteína denominada GstI (Taté et al., 2001). La expresión del gen (*gstI*) que codifica para esta proteína está inhibida cuando NtrC está fosforilado. En *B. japonicum* todavía no se ha reportado la presencia de *gstI* (Patriarca et al., 2002).



**Figura 1.12. A.** Esquema de la asimilación de N en condiciones de alta relación C/N en el medio. Dentro de la célula la relación de C/N se expresa como relación  $\alpha$ -cetoglutarato / glutamina ( $\alpha$ Kg/gln). Cuando esta relación es alta (1) y la fuente de N escasea la uridil transferasa (UT) funciona en el sentido de transferir un resto uridilo a la proteína PII (2), la cual se activa para modificar la adenil transferasa (AT). En estas condiciones la adenil transferasa deadenila a la glutamino sintetasa I (GS Ii), activándola (GS Ia) (3) para catalizar la conversión de glutamato (glu) en glutamina (gln) (4). Paralelamente, la alta relación de ( $\alpha$ Kg/gln) también activa a la proteína sensora NtrB, la cual se autofosforila (2') y así actúa como quinasa sobre NtrC, el cual es fosforilado y actúa para unirse a su sitio en el promotor del gen gln II (3'). Así se activa la síntesis de la glutamino sintetasa II (GS II) (4') la cual también cataliza la conversión de glutamato en glutamina (5). La acción conjunta de GS I y GS II permite captar bajas cantidades de  $\text{NH}_4^+$  del medio.

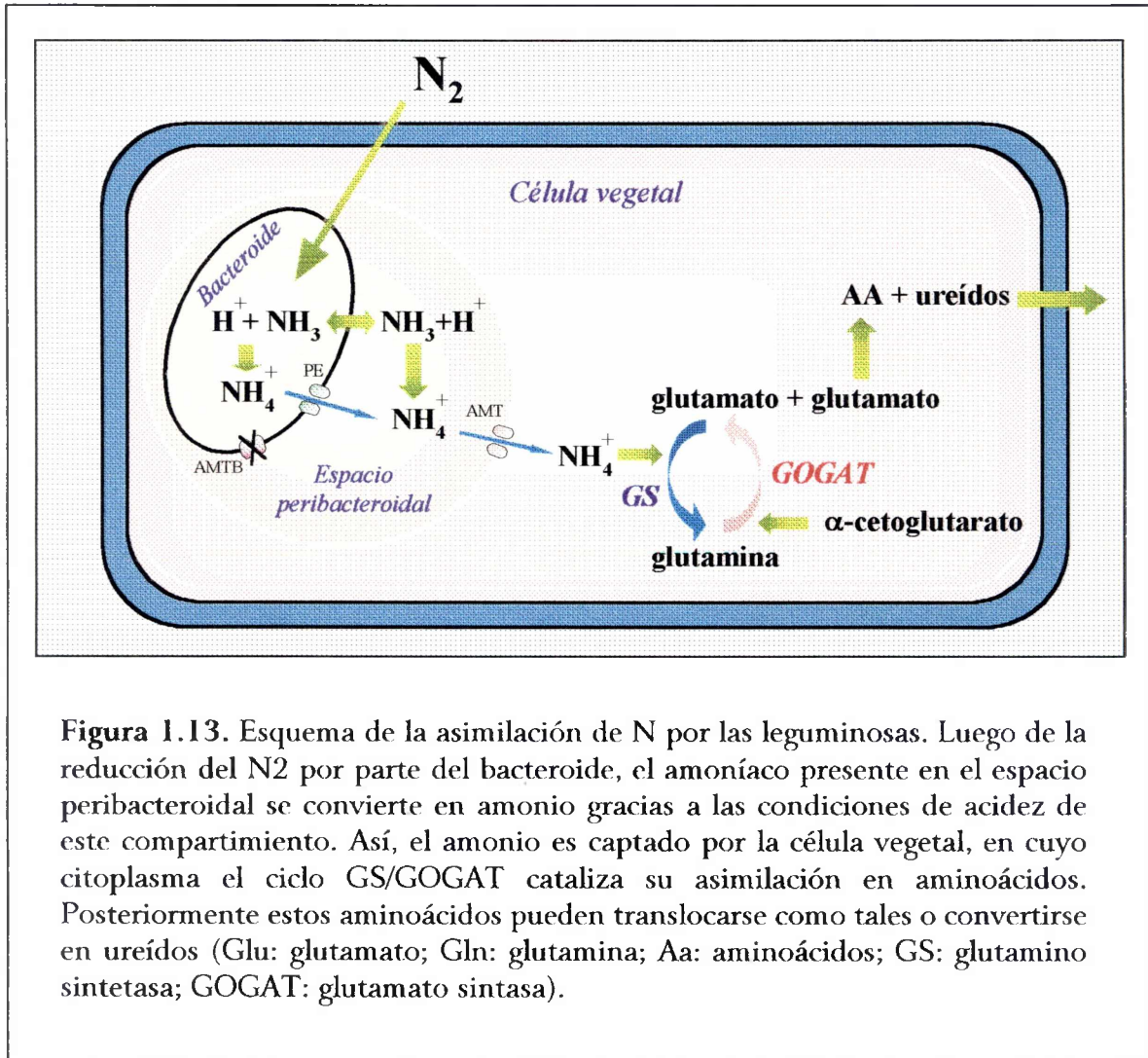
Las actividades del ciclo GS-GOGAT no parecen estar restringidas al estado de vida libre. En el bacteroide también se han detectado actividades GOGAT y GS I, aunque ésta última está muy disminuida. Además, se ha demostrado que mutantes de *B. japonicum* en GOGAT tienen alterada la fijación de  $\text{N}_2$  (Hilgert *et al.*, 1987; O'Gara *et al.*, 1984), y también mutantes de la misma especie en *glnA* y *glnII* tienen afectada la nodulación (Carlson *et al.*, 1987).



Estudios recientes sugieren que el  $\text{NH}_4^+$  no es el único producto exportado por el bacterioide sino que también se ha detectado la liberación de alanina *in vitro* (Waters *et al.*, 1998; Allaway *et al.*, 2000; Ludwig y Poole, 2003).

En la figura 1.13 se esquematiza el flujo de N fijado por el bacterioide, que luego pasa por un transportador de amonio situado en la membrana del simbiosoma a la célula del nódulo donde las enzimas GS I y GOGAT son las primeras en transformar el  $\text{NH}_4^+$  en formas menos tóxicas como aminoácidos o ureídos (Schubert, 1986, Lam *et al.*, 1995).





**Figura 1.13.** Esquema de la asimilación de N por las leguminosas. Luego de la reducción del  $N_2$  por parte del bacteroide, el amoníaco presente en el espacio peribacteroidal se convierte en amonio gracias a las condiciones de acidez de este compartimiento. Así, el amonio es captado por la célula vegetal, en cuyo citoplasma el ciclo GS/GOGAT cataliza su asimilación en aminoácidos. Posteriormente estos aminoácidos pueden translocarse como tales o convertirse en ureídos (Glu: glutamato; Gln: glutamina; Aa: aminoácidos; GS: glutamino sintetasa; GOGAT: glutamato sintasa).

### I.6.3 Integración del metabolismo de C y N

El ciclo GS – GOGAT es al mismo tiempo que un punto de entrada de N, un sitio de integración de las vías del C y el N ya que conecta un sitio de asimilación y distribución de N con un ciclo catabólico del C. Además, su regulación depende de la relación C/N intracelular, expresada a través de la relación  $\alpha$ -cetoglutarato/glutamina. Así, el flujo de  $\alpha$ -cetoglutarato dentro del ciclo GS – GOGAT disminuirá la concentración relativa de este metabolito en el ciclo de Krebs, y será necesario reponerlo o bien con alguna reacción anaplerótica o bien con el ingreso de más C que el total circulante en el ciclo de Krebs. Si la relación C/N es alta, la salida de  $\alpha$ -cetoglutarato del ciclo de Krebs no implicaría un desbalance en el flujo metabólico a través de esta vía, pero si la relación C/N es baja, tal

desbalance podría ocurrir a menos que el ciclo GS – GOGAT se desacelere para frenar la demanda de  $\alpha$ -cetoglutarato. Así, la inhibición de GS en situaciones de baja relación C/N puede cumplir un papel importante en mantener las concentraciones de estado estacionario entre los metabolitos del ciclo de Krebs, con lo cual es esperable que esta enzima ejerza un grado apreciable de control no sólo sobre la asimilación de N sino también sobre el proceso catabólico de oxidación de los ácidos tricarbónicos. En concordancia con esto, GS es una de las enzimas más reguladas de estas vías. La regulación por modificación covalente de GS I está modulada a su vez por al menos una docena de metabolitos que representan diferentes estados tanto de la vía de asimilación de N como de la vía catabólica (Fell, 1997). Además, GS II está regulada a nivel de síntesis aunque podría actuar a diferentes niveles de demanda de N que GS I y sobre  $\text{NH}_4^+$  proveniente de diferentes fuentes: captación de  $\text{NH}_4^+$  extracelular o bien  $\text{NH}_4^+$  proveniente de procesos degradativos. Toda esta red de regulación a su vez está controlada por el sistema de dos componentes NtrBC, lo cual indica su gran importancia en el control metabólico en este punto central donde convergen las vías del C y el N.

Las vías principales del C y el N también se interconectan a través de otros metabolitos intermedios, principalmente el piruvato y el gliceraldehído-3-fosfato. Sin embargo, estos puntos de intercambio probablemente no utilizan el  $\text{NH}_4^+$  recién captado del medio extracelular, sino N proveniente de aminoácidos sintetizados con anterioridad –a menos que las células estén usando estos aminoácidos como fuentes de N y eventualmente también de C.

El flujo en las vías catabólicas depende de la relación C/N en otro aspecto importante, a saber, la carga energética. Las vías biosintéticas están más activas si la relación C/N es baja y lo contrario ocurre cuando la relación C/N es alta por la simple disponibilidad de precursores. Así, la utilización de ATP es menor en la última situación, lo que en presencia de una fuente de C adecuada incrementa la carga energética. En esta situación, las vías gluconeogénicas se verán activadas en relación con las rutas glicolíticas, lo que podría favorecer la síntesis de polisacáridos tanto de reserva como extracelulares. Además, el poder reductor no utilizado podría contribuir a la formación de PHB a partir de acetyl-CoA, introduciendo aún menos precursores al ciclo de Krebs.

### **1.7. Objetivos de Trabajo de Tesis**

Dado que una simbiosis exitosa requiere bajos niveles de N biodisponible en el suelo y que ciertas evidencias sugieren que la escasez de nutrientes podría favorecer la capacidad infectiva de los rizobios sobre las raíces de las leguminosas (por ejemplo Kijne *et al.*, 1988; Brelles Mariño *et al.*, 1996; Lodeiro *et al.*, 2000), puede plantearse la alternativa de preparar inoculantes en medios de alta relación C/N. Los medios de cultivo empleados comúnmente para la obtención de caldos de rizobios para inoculantes son diversos, pero en todos los casos están bien balanceados y se procura obtener con ellos altas concentraciones bacterianas, con lo cual generalmente se trata además de medios ricos. Esta condición podría dar por resultado inoculantes poco infectivos no sólo por la abundancia de nutrientes, sino porque los sistemas de percepción del quórum en estos cultivos densos podrían determinar la liberación de bradióxetina y la posterior inhibición de la expresión de los genes *nod* (Loh *et al.*, 2001; 2002).

El método más común de aplicación de los inoculantes en soja consiste en ponerlos en contacto con las semillas antes de sembrar y permitir su adhesión a las mismas. Este método es muy conveniente desde el punto de vista práctico debido a su simplicidad y a que no requiere de operaciones adicionales ni equipos especiales. Sin embargo, la inoculación sobre las semillas puede constituir otro problema para la eficiencia final obtenida con cualquier inoculante por su mala distribución en el suelo debida a los problemas de movilidad que ya hemos analizado. Por lo tanto, debería compararse esta metodología de aplicación del inoculante con otras que lo distribuyan mejor en el sustrato en el cual crecen las raíces.

En vista de estos problemas hemos enfocado nuestro trabajo de Tesis al estudio de la eficiencia de los rizobios para nodular, asociada a aspectos del metabolismo bacteriano bajo diversos grados de limitación de N y a la distribución de los rizobios respecto de la zona infectable de la raíz. En particular, es de nuestro interés investigar si la limitación en N favorece o no el desarrollo de las etapas tempranas de preinfección e infección y encarar el análisis de la competitividad de rizobios cultivados bajo nuestras condiciones de limitación o suficiencia de N frente a poblaciones como las naturalizadas en los suelos.

### **1.7.1. Objetivos específicos**

- *Establecer condiciones de cultivo con distintos grados de limitación de N.*

Realizamos el cultivo de los rizobios en medios sintéticos de composición definida, con diferentes concentraciones de la fuente de N. Estudiamos el crecimiento y determinamos mediante la actividad GS I y GS II el grado en que el metabolismo celular queda limitado por la escasez de este nutriente.

- *Caracterizar los destinos del C bajo limitación y suficiencia de N.*

Determinamos el contenido de EPS y CPS –dado el rol que éstos juegan en la infectividad y competitividad– y un polímero de reserva como PHB. Estas medidas se evaluaron tanto en una cepa salvaje como en un mutante incapaz de sintetizar EPS. Con estos resultados intentamos vincular la asimilación de N y la acumulación de C, y observar si existe una competición por el C disponible entre ambas vías biosintéticas.

- *Estudiar cómo son afectadas la preinfección, infectividad y competitividad para la formación de nódulos por el nivel de N.*

Se realizaron estudios de la expresión de genes *nod*, la unión de SBL a la superficie bacteriana y la adsorción de los rizobios a las raíces de soja. Además, se evaluaron la infectividad y la competitividad de los rizobios en distintas fases del crecimiento en medios con escasez o suficiencia de la fuente de N.

- *Estudiar la competitividad para la formación de nódulos de rizobios cultivados en medios con escasez o suficiencia de la fuente de N frente a poblaciones como las establecidas en los suelos.*

Determinamos si alguna condición de cultivo bajo escasez de N condiciona a los rizobios a una mayor competitividad para nodular soja en presencia de poblaciones de rizobios compatibles establecidas en el sustrato. Se estudiaron otros factores importantes para la competitividad, como la manera de aplicar el inoculante, ya sea sobre las semillas o en profundidad.

- *Corroborar a campo los resultados obtenidos en laboratorio.*

Realizamos un ensayo a campo con el fin de evaluar el comportamiento de los inoculantes mejorados ante la acción de todas las variables presentes en la naturaleza. El ensayo abarcó un ciclo completo de cultivo de soja

para poder obtener, además de datos de competitividad para la ocupación de nódulos, información sobre rendimiento y calidad de los granos.

### ***1.8. Significado de esta investigación***

Los trabajos propuestos están orientados en dos direcciones complementarias, una de carácter básico y otra de aplicación directa en la industria y el agro.

En el aspecto básico, se intentó comprender mejor ciertos aspectos del metabolismo bacteriano bajo diversos grados de limitación de N. El hecho de utilizarse para ello una especie que normalmente vive en ambientes pobres y que además realiza un proceso de interés para el hombre en medios escasos en N (y quizás, estimulada por esta condición) asigna un interés adicional al modelo de estudio, ya que los conocimientos adquiridos tendrán significado directo en relación con condiciones de vida más similares a las normales de esta bacteria (para la que los cultivos de laboratorio representan una condición exótica). En este aspecto, esperamos observar cómo los flujos de biosíntesis de polímeros ricos en C se canalizan hacia distintos destinos según los rizobios se encuentren o no limitados en N. Nuestros resultados podrían permitir encarar luego otras cuestiones importantes acerca de la regulación general del metabolismo en *B. japonicum* en vida libre, un aspecto no muy estudiado pero que debe enfocarse para comprender la biología de esta especie en el suelo.

Asociado a este último aspecto se encuentra el grave problema de la competencia que ejercen las poblaciones naturalizadas en los suelos para la formación de nódulos frente a los inoculantes. Uno de los aspectos clave en esta cuestión es la forma en que las raíces de soja son colonizadas por los rizobios de la población del suelo o los del inoculante, dado que probablemente unos y otros tengan escasa movilidad y por lo tanto su posición inicial con respecto a las zonas infectables de la raíz puede jugar un papel determinante.

Así, en el aspecto aplicado intentaremos aprovechar el conocimiento adquirido para desarrollar inoculantes rizobianos más efectivos para las leguminosas y formas más eficaces de aplicarlos para aumentar su competitividad en suelos con población naturalizada. Este último aspecto será evaluado a campo como primer paso para validar nuestras propuestas de desarrollo.



## **CAPÍTULO II**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

## **II-1. Cultivo de Rizobios y Plantas**

### **II.1.1 Variedades de plantas y cepas bacterianas utilizadas en este estudio**

**II-1.1.1. Rizobios.** *B. japonicum* LP 3001, LP 3004 y LP 3007 son derivados resistentes a antibióticos obtenidos en el laboratorio a partir de *B. japonicum* E111 (Lodeiro, 1994). LP 3001 es resistente a espectinomina (Sp) 300 mg.l<sup>-1</sup>, LP 3004 es resistente a estreptomina (Sm) 500 mg.l<sup>-1</sup> y LP 3007 es doble resistente a Sp y Sm. *B. japonicum* Bj 110-573 (cedida por el Dr. Michael Göttfert) posee una fusión cromosomal *nodC::lacZ* y es resistente a tetraciclina (Tc) 100 mg.l<sup>-1</sup> (Dockendorff *et al.*, 1994). *B. japonicum* USDA 110 (cedida por el Departamento de Agricultura de EEUU) es una cepa salvaje sensible a antibióticos. *B. japonicum* ΔP22 (cedida por el Dr. Peter Müller) deriva de USDA 110 y posee una delección de 2,1 kpb que abarca la región C-terminal de *exoP*, el ORF completo de *exoT* y la mitad N-terminal de *exoB* (Becker *et al.*, 1998). Esta cepa carece de actividad UDP-glucosa 4-epimerasa y es resistente a Sp y kanamicina (Km) 150 mg.l<sup>-1</sup> (Parniske *et al.*, 1993).

**II-1.1.2. Plantas.** *Glycine max* (soja): Federada INTA, Promax INTA y Don Mario 4800 fueron provistas por el Ing. Agr. Alejandro Peticari del Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del Centro de Investigaciones en Ciencias Agropecuarias de INTA (Castelar, Pcia. de Buenos Aires).

### **II-1.2. Medios para el cultivo de rizobios y plantas**

**II-1.2.1. Medios de cultivo y conservación de los rizobios.** El medio extracto de levadura-manitol (YEM, Vincent, 1970), se compone de: extracto de levadura 0,4 g.l<sup>-1</sup>, manitol 10 g.l<sup>-1</sup>, NaCl 0.1 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>.7 H<sub>2</sub>O 0.2 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g.l<sup>-1</sup>. El medio YEM agarizado se preparó con agar 1.5% (p/v) y rojo congo 0.25% (p/v). La esterilización se realizó durante 20 minutos a 121°C en autoclave.

El medio mínimo de Götz. (Götz *et al.*, 1982) se preparó siempre con agua bidestilada. Su composición (salvo donde se indica) es: manitol 5,0 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,06 g.l<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,53 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> 0,25 g.l<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,13 g.l<sup>-1</sup>, CaCl<sub>2</sub> 15 mg.l<sup>-1</sup>, NaCl 5,85 mg.l<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 2,42 mg.l<sup>-1</sup>, FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 0,28 mg.l<sup>-1</sup>, biotina 20 µg.l<sup>-1</sup>, tiamina-HCl 20 µg.l<sup>-1</sup>, riboflavina 20 µg.l<sup>-1</sup>,

ácido p-aminobenzoico 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , piridoxina 20  $\mu\text{g.l}^{-1}$ . La mezcla de manitol, fosfatos, sulfato de amonio, cloruro de sodio y molibdato fue esterilizada en autoclave a 121°C por 20 minutos. Las soluciones de calcio y magnesio fueron esterilizadas en forma separada también por calor húmedo y se agregaron a la mezcla anterior una vez enfriada. Las mezcla de vitaminas y la solución de sulfato ferroso fueron esterilizadas por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ ) y luego agregadas al resto del medio ya esterilizado.

Los antibióticos se prepararon en agua bidestilada (excepto la espectinomina, que se preparó en metanol) a una concentración 1000x y se esterilizaron por filtración por membrana (filtros Millipore de 0,22  $\mu\text{m}$ ).

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se hizo por congelación rápida de cultivos crecidos en YEM o Götz hasta la fase logarítmica tardía. Para su conservación se agregó glicerol estéril hasta una concentración final del 30% (V/V) y se almacenaron a una temperatura de -20°C. Para uso rutinario, alícuotas de estas reservas se hicieron crecer en YEM sólido con los antibióticos correspondientes y se mantuvieron a 4°C por períodos que no excedieron de 60 días.

**II-1.2.2. Soluciones para cultivo hidropónico de plantas.** Se utilizó la solución de Fåhraeus modificada (Lodeiro *et al.*, 2000):  $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,11  $\text{g.l}^{-1}$   $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,12  $\text{g.l}^{-1}$ ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,20  $\text{g.l}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,17  $\text{g.l}^{-1}$ ,  $\text{NaCl}$  0,06  $\text{g.l}^{-1}$ , citrato férrico 0,005  $\text{g.l}^{-1}$ , y los siguientes micronutrientes:  $\text{KCl}$  3,73  $\text{mg.l}^{-1}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  1,55  $\text{mg.l}^{-1}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,85  $\text{mg.l}^{-1}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,13  $\text{mg.l}^{-1}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,58  $\text{mg.l}^{-1}$ ,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$  0,018  $\text{mg.l}^{-1}$ ,  $\text{pH}=7,0$ . Esta solución se preparó en agua bidestilada. La preparación de fosfatos, cloruro de sodio, citrato férrico y micronutrientes se esterilizó por calor húmedo en autoclave a 121°C durante 20 min, y luego de permitir su enfriamiento hasta temperatura ambiente, se le agregó las sales de calcio y magnesio de preparaciones 1000x esterilizadas por separado. Para preparar la solución de Fåhraeus agarizada, se añadió agar 0,8% (p/v) antes de su esterilización.

### **II.1.3. Cultivos bacterianos y preparación de los inóculos**

Para realizar los diferentes ensayos los cultivos se iniciaron a partir de las reservas en medio sólido mantenidas a 4°C y se hicieron crecer en el medio de Götz a 28°C con agitación rotatoria a 180 rpm hasta saturación. Luego se diluyeron 1:100 en medio de cultivo fresco y su cultivo se

continuó por otros tres días más, con el fin de que todas las células alcanzaran la fase de crecimiento exponencial. A partir de este cultivo iniciador se realizaron diluciones 1:50 en los medios a ser estudiados y se continuó su cultivo en las mismas condiciones hasta la fase de crecimiento deseada.

Para las curvas de crecimiento, los ensayos enzimáticos y los aislamientos de polisacáridos extracelulares y polihidroxibutirato se cultivaron 300 ml de caldo en erlenmeyers de 1 litro. Para todos los demás experimentos se utilizaron cultivos de 10 ml en frascos de 50 ml.

#### **II-1.4. Esterilización superficial y germinación de las semillas**

Las semillas de soja se sumergieron unos segundos en alcohol y luego diez minutos en solución de lavandina comercial diluida al 20% v/v con agitación a 28°C. Seguidamente, se lavaron al menos seis veces con agua destilada estéril. Las semillas esterilizadas de esta manera se germinaron sobre una superficie de agar-agua al 1,5% durante dos a cuatro días en la oscuridad a 28°C. Las semillas así esterilizadas y germinadas se utilizaron para los distintos ensayos.

#### **II-1.5. Métodos para el recuento de rizobios**

La biomasa se estimó por lecturas de densidad óptica a 500 nm (DO<sub>500</sub>). El número de células viables se estimó por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC.ml<sup>-1</sup>) sobre el medio YEM. Los recuentos se realizaron por triplicado. Previamente se había determinado que el recuento de las UFC en el medio YEM sólido arrojaba los mismos resultados que en Götz sólido. Las placas se incubaron a 28°C y las colonias fueron visibles a partir de los 5 días.

El número de células totales se obtuvo por recuento al microscopio empleando una cámara de Neubauer.

Para la estimación del número de rizobios en muestras de suelo, se utilizó la técnica del número más probable (NMP). Para esta técnica se tomaron muestras de suelo de 100 g y se las resuspendió en 900 ml de agua destilada estéril. Se los dejó agitando por 4 horas y de ahí se practicaron diluciones seriadas. Con cada dilución se inocularon plantas que estaban colocadas en tubos de ensayo de 23 cm de largo por 2,4 cm de diámetro, los cuales contenían solución de Fåhraeus agarizada al 0,8%

en forma de pico de flauta. Se colocó en cada tubo una planta de tres días de edad en forma axénica, y luego se inoculó cada una de ellas con 1 ml de la dilución correspondiente. Para cada dilución seriada se prepararon cuatro tubos. Se dejaron los tubos en el invernáculo, y al cabo de 20 días se observaron cuáles eran los tubos que poseían nódulos. A partir del porcentaje de plantas noduladas para cada dilución se calculó el NMP de rizobios noduladores de soja presentes en la muestra de suelo mediante el empleo de tablas (Vincent, 1970).

## **II-2. Ensayos Bioquímicos**

### **II-2.1. Medida de la actividad de glutamino sintetasa (GS)**

Los cultivos bacterianos fueron permeabilizados durante 5 minutos a 28°C y 180 rpm con bromuro de hexadecil-trimetilamonio (CTAB) 0,1 mg. $\text{ml}^{-1}$  y posteriormente las células se recuperaron por filtración. Las bacterias se resuspendieron en una solución de KCl al 1% previo a la realización del ensayo. La actividad se midió mediante la reacción  $\gamma$  glutamil-transferasa (Bender *et al*, 1977). La mezcla de reacción contenía: glutamina 20 mM, imidazol-HCl 135 mM (pH=7,15), hidroxilamina-HCl 18 mM,  $\text{MnCl}_2$  0,27 mM,  $\text{K}_3\text{AsO}_4$  25 mM (pH=7,15), ADP 0,36 mM y CTAB 0,1 mg. $\text{ml}^{-1}$ . La mezcla de reacción se ajustó a pH=7,55 con KOH. Se incubó a 37°C y la reacción se detuvo mediante el agregado de una solución que contenía  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  55 g. $\text{l}^{-1}$ , ácido tricloro acético 20 g. $\text{l}^{-1}$  y HCl 8 g. $\text{l}^{-1}$ . Luego se midió la absorbancia a 540 nm y se calculó la cantidad de glutamil hidroxamato presente sabiendo que 1  $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato da 0,532 unidades de absorbancia. La unidad de actividad GS se definió como la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de glutamil hidroxamato por minuto.

La actividad de GSI se estimó por calentamiento de la muestra una hora a 50°C, y se calculó su estado de adenilación midiendo la actividad enzimática en presencia y en ausencia de una solución de  $\text{MgCl}_2$  60 mM a pH=7,15 (Shapiro y Stadman, 1970). La actividad de la forma II se calculó por diferencia de la actividad total y la actividad de la forma I (Darrow y Knotts, 1977).

### **II-2.2. Determinación de polisacáridos extracelulares**

Los cultivos fueron centrifugados a 16.000 x g durante 50 minutos y los sobrenadantes fueron precipitados con tres volúmenes de etanol para obtener exopolisacáridos (EPS). Los pellets fueron resuspendidos en NaCl 0,5 M y agitados en un omnimixer Sorval 17106 durante 60 segundos a potencia media (9000 rpm) y luego centrifugados 15 minutos a 14.000 rpm. Los sobrenadantes se utilizaron para cuantificar el polisacárido capsular (CPS), el cual también fue precipitado con tres volúmenes de etanol. Tanto el EPS como el CPS se midieron con el reactivo de antrona (0,2 % en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) por absorbancia a 620 nm (Trevelyan *et al.*, 1952). Las concentraciones de azúcares reductores resultantes se calcularon por referencia a una curva de calibración construida con glucosa como estándar.

### **II-2.3. Determinación de poli β-hidroxitirato (PHB)**

Este polihidroxicanoato se obtuvo según la técnica de Law y Slepecky (1961). Los pellets resultantes de la extracción de CPS se resuspendieron en NaCl 0,5 M y se dividieron en dos partes: una de ellas se reservó para cuantificar proteínas (véase más abajo) y la otra para medir PHB. Esta fracción se centrifugó y el pellet se digirió con lavandina comercial durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugó la mezcla y se solubilizó el pellet en cloroformo a 60°C. Luego una alícuota del material solubilizado se dejó evaporar, se le agregó 10 ml de ácido sulfúrico concentrado y se hirvió por 10 minutos. El dosaje se realizó por la determinación del ácido crotónico resultante medido por la absorbancia a 235 nm.

### **II-2.4. Cuantificación de proteínas**

A la segunda fracción del pellet de células (véase II-2.3) se la centrifugó y se la resuspendió en un buffer que contenía Tris 50 mM-EDTA 10 mM y sacarosa 10%, pH=7,4. Posteriormente las células se rompieron con un sonicador de punta Sanyo-Soniprep 150 con tres pulsos de potencia media de 10 segundos cada uno en hielo. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford (1976) utilizando una curva de calibración construida con IgG como estándar.

### **II-2.5. Espectroscopia infrarroja con transformada de Fourier (FTIR)**

Para este estudio 200  $\mu$ l de cada cultivo de rizobios se aplicaron sobre una placa de Si y se secaron a 50°C 1 hora. Los espectros de transmisión infrarroja se obtuvieron entre 4.000 y 500  $\text{cm}^{-1}$ . Para mejorar la relación señal/ruido, se realizaron 500 escaneos y se promediaron para cada muestra. Se realizaron tres réplicas por muestra y los datos se procesaron con el software Perkin Elmer Spectrum.

### **II-2.6. Inducción de la expresión del gen *nodC* por genisteína**

Para estudiar la expresión de los genes *nod*, se empleó la cepa *B. japonicum* Bj 110-573 y se cuantificó el nivel de inducción de la expresión de su fusión *nodC::lacZ* por genisteína (Wang y Stacey, 1990). Para ello, incubamos los cultivos en presencia o ausencia de genisteína 2  $\mu$ M durante 12-14 horas a 28°C con agitación, luego los permeabilizamos con cloroformo y SDS y cuantificamos la actividad  $\beta$ -galactosidasa, utilizando como sustrato rojo de clorofenol-galactopiranosido (CPRG) y midiendo la absorbancia a 574 nm. La actividad se expresó en unidades Miller (Miller, 1972).

### **II-2.7. Purificación de lectina de soja (SBL)**

La SBL se obtuvo en una cromatografía de afinidad a partir de harina de soja (Lotan *et al.*, 1974). Para obtener la harina, las semillas de soja Federada INTA se molieron en seco y el polvo resultante se suspendió en N-hexano a -20°C durante una hora para deslipidizarlo. Se filtró por papel Whatman y el material retenido se dejó secar. Luego la harina así preparada, se suspendió en 500 ml de buffer fosfato 50 mM pH= 7,0 y se dejó agitando durante toda la noche a 4°C. Se centrifugó 20 min a 10.000 x g, y el sobrenadante se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  entre 30 y 70% de saturación. El precipitado se resuspendió en un volumen final de 30 ml de buffer fosfato y se desalinizó por diálisis con buffer fosfato. Posteriormente, la muestra se cargó en una columna de afinidad de  $\epsilon$ -aminocaproil- $\beta$ -D-galactosamina-agarosa (Sigma Chemical Co., EEUU) de 1 ml, a una velocidad de flujo de 5 ml por hora. La columna se lavó extensamente con buffer fosfato (hasta que el valor de absorbancia a 280 nm en el líquido de salida se hizo despreciable) y se eluyó con una

solución de galactosa 0,1 M en buffer fosfato. El eluido se recogió en fracciones de 1 ml, a cada una de las cuales se leyó su absorbancia a 280 nm. Se fueron recogiendo los picos con alta absorbancia y todas las fracciones con lectura positiva se reunieron, se dializaron para eliminar la galactosa contra agua bidestilada, se liofilizaron y se resuspendieron en solución de Fåhraeus. Dicho resuspendido se conservó a -20°C. La pureza de la muestra se evaluó en geles de poliacrilamida, su actividad se estimó por la hemaglutinación de eritrocitos tipo A<sup>+</sup> (Nowotny, 1979), y se calculó la cantidad de proteína por el método de Bradford.

#### **II-2.8. Análisis de proteínas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las electroforesis en geles de poliacrilamida, con SDS y  $\beta$ -mercaptoetanol, se llevaron a cabo según el procedimiento descrito por Laemmli (1970). Los geles de apilamiento se prepararon con 5% de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 6,8, mientras que los geles de separación se prepararon con 12,5 a 15 % de poliacrilamida en Tris-HCl a pH 8,8. Las corridas se llevaron a cabo durante 30 a 60 min en equipos Miniprotean (BioRad) a 150-200 volts. Los geles se fijaron en metanol:acético:agua (50:10:40) y se tiñeron con plata (Blume *et al*, 1987).

#### **II-2.9. Marcación de SBL**

La lectina obtenida como se indicó en la sección anterior, se marcó con isotiocianato de fluoresceína (FITC Isomer I Sigma F-7250). Para ello, se incubó 1 ml de la solución de lectina con 100  $\mu$ l de FITC 1mg/ml en buffer (Na)<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M pH= 9,6 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Luego se dializó 1 hora contra agua bidestilada a 4°C y finalmente se dializó contra Fåhraeus.

#### **II-2.10. Unión de SBL a células de *B. japonicum***

Para cuantificar la unión de lectina de soja a los rizobios, se registró el porcentaje de células fluorescentes al microscopio en presencia de FITC-SBL (60  $\mu$ g.ml<sup>-1</sup>) (Bhuvanewari *et al.*, 1977). La incubación se realizó durante 30 minutos a 28°C sin agitación.



### **II-3. Estudios Biológicos**

#### **II-3.1. Ensayos de adsorción**

Para observar el efecto de SBL sobre la adsorción, se incubaron los cultivos bacterianos con o sin SBL  $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$  en solución de Fåhraeus durante 12 horas a  $28^{\circ}\text{C}$  en reposo, y luego se midió su adsorción a raíces de soja (Lodeiro *et al.*, 2000). Se siguió el procedimiento puesto a punto en nuestro laboratorio por Caetano-Anollés y Favelukes (1986a). Luego, 10 plantas de soja de cuatro días, fueron puestas en contacto con una suspensión de *B. japonicum* LP 3001 en una concentración aproximada de  $10^4$  bacterias  $\cdot\text{ml}^{-1}$ , en 50 ml de solución mineral de Fåhraeus. La incubación planta - bacteria se llevó a cabo durante 1 hora a  $28^{\circ}\text{C}$  con agitación rotatoria de 50 rpm. Al cabo de ese período las raíces –con las bacterias adsorbidas– se lavaron cuatro veces con 50 ml de medio mineral fresco durante un minuto a 120 rpm cada vez. Posteriormente, las raíces se transfirieron a cajas de Petri, donde se recubrieron con medio YEM agarizado (agar al 1,5%) fundido a  $45^{\circ}\text{C}$ , suplementado con rojo congo, Sp y cicloheximida ( $50 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Se dejó solidificar y se incubó a  $28^{\circ}\text{C}$  durante seis días en los cuales, a partir de las bacterias adsorbidas, se desarrollaron microcolonias sobre las raíces. Las microcolonias visibles fueron contadas con una lupa binocular.

El número de microcolonias contadas sobre las raíces en cada tratamiento se dividió por el número de bacterias presentes en el medio inicial de incubación (obtenido por plaqueo sobre medio YEM con antibióticos), con lo cual se calculó el índice de adsorción (A%). Este valor representa el número de microcolonias contadas sobre las raíces expresado como porcentaje de las bacterias presentes en la suspensión. La estimulación de la adsorción (E%) se calculó según la siguiente expresión:

$$E\% = \frac{A_p\% - A_0\%}{A_0\%} 100$$

donde  $A_p\%$  es el índice de adsorción de los rizobios tratados con SBL, y  $A_0\%$  es el índice de adsorción de los rizobios tratados sin SBL.

### II-3.2. Ensayos de infectividad

Se realizaron siguiendo la metodología de Bhuvanewari *et al.* (1980). Las semillas esterilizadas superficialmente y germinadas como se indicó anteriormente se transfirieron en forma aséptica a bolsas plásticas de crecimiento en un número de tres plántulas por bolsa. Las bolsas habían sido previamente humedecidas con 10 ml de solución de Fåhraeus. Se llevaron al invernáculo, con una temperatura diurna de 26°C y nocturna de 18°C y 14 hs. de fotoperíodo. Al día siguiente se marcaron las posiciones de la punta de la raíz (PR) y de los pelos radiculares emergentes más pequeños (PEMP) trazando sendas líneas sobre la bolsa plástica con la ayuda de una lupa binocular (Figura 1.7). Esta región comprende la zona infectable. Cada raíz se inoculó con 0,5 ml de la suspensión bacteriana correspondiente. La concentración de bacterias en estos inóculos fue aproximadamente de  $2 \cdot 10^4$  bacterias.ml<sup>-1</sup> (salvo en los casos donde se indique lo contrario). Además se incluyeron controles de plantas sin inocular. Las plantas y los controles se mantuvieron en el invernáculo en las condiciones antes descriptas y se regaron periódicamente con agua destilada estéril hasta el momento de la observación de los resultados. A los 20 días desde la inoculación se realizaron mapas de la frecuencia de aparición de nódulos respecto de la ubicación de la región infectable al momento de la inoculación en la raíz principal (Bhuvanewari *et al.*, 1980). Luego se graficó la distribución de cada uno de los nódulos sobre la raíz principal en unidades relativas de distancia respecto de la marca de PR, esto es,

$$D_U = \frac{D_L}{UDR}$$

donde  $D_U$  es la distancia (en UDR) del nódulo hasta PR,  $D_L$  es la distancia (en mm) del nódulo hasta PR y  $UDR$  es la longitud (en mm) entre las marcas de PR y PEMP.

Este último procedimiento permitió normalizar los resultados compensando las diferencias entre plantas con raíces de distinta longitud y distinta velocidad de crecimiento (para más detalles, véase Bhuvanewari *et al.*, 1980).

### II-3.3. Establecimiento de poblaciones y ensayos de persistencia de los rizobios en vermiculita

Se establecieron cultivos de la cepa *B. japonicum* LP 3004 en macetas conteniendo vermiculita estéril. Para ello,  $1,0 \cdot 10^5$  rizobios. $\text{ml}^{-1}$  se suspendieron en 700 ml de solución de Fåhraeus los cuales se vertieron en cada maceta, con lo que las macetas quedaron a capacidad de campo. Las macetas se cubrieron con un film adherente y se llevaron al invernáculo en las condiciones ya descritas. A lo largo de la incubación se compensó la evaporación mediante agregados periódicos de agua estéril hasta constancia de peso de cada maceta. Se tomaron muestras de 4 a 8 g de vermiculita húmeda a distintos tiempos con las que se realizaron los recuentos de viables como se explica a continuación. A cada muestra de vermiculita se le determinó el peso fresco (pf). Enseguida se saturó la muestra con el agregado de un volumen V igual a 3 ml de solución de Fåhraeus, se pasó por vortex y se sometió a un sonicado suave con un baño sonicador Cole Palmer 8891 durante 10 minutos, tratamiento que no afecta la viabilidad de los rizobios (Lodeiro, 1994). Luego del sonicado, se volvió a pasar por vortex, se dejó decantar la vermiculita, se extrajo la fase líquida, se la diluyó y se sembró en placas con medio YEM agarizado para el recuento de viables. La vermiculita remanente se llevó a sequedad a  $80^\circ\text{C}$  hasta constancia de peso y se registró el peso seco (ps). Se obtuvo el volumen de solución retenido en la vermiculita a partir de la diferencia entre el pf y el ps de la muestra, considerando la densidad de la solución de Fåhraeus ( $\delta$ ) aproximadamente igual a  $1 \text{ g} \cdot \text{ml}^{-1}$ . Con el dato de las UFC obtenido en placa ( $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}_{(c)}$ ) se calculó el número de UFC totales contenidas en la muestra y éste dividido por el volumen de solución calculado previamente ( $\text{pf} - \text{ps}$ ) nos dio el número de células viables por unidad de volumen de solución de Fåhraeus retenida en la vermiculita ( $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}_{(v)}$ ):

$$\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}_{(v)} = \left( \frac{V \delta}{\text{pf} - \text{ps}} + 1 \right) \cdot \text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}_{(c)}$$

### II-3.4. Ensayos de competición para la nodulación

Estos ensayos se realizaron con cepas llevando diferentes resistencias a antibióticos para permitir su identificación. Se trabajó con macetas

plásticas de aproximadamente 300 cm<sup>3</sup> conteniendo vermiculita estéril, o bien a campo. La descripción pormenorizada del ensayo a campo se realiza en el Capítulo VII.

Las macetas fueron esterilizadas mediante lavados con alcohol seguidos de una exposición de al menos dos horas a la luz ultravioleta en una cámara cerrada, mientras que la vermiculita se esterilizó en autoclave, una hora a 121°C. Cada maceta con vermiculita estéril se regó con 700 ml de solución de Fåhraeus libre de bacterias o conteniendo entre 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> rizobios .ml<sup>-1</sup>. La siembra de soja se realizó o bien inmediatamente, o bien se incubó las macetas durante un mes antes de sembrar con el fin de establecer una población, como se explicó en II-3.3. Se sembraron en cada maceta tres plantines de soja germinados como se explicó en la sección II.1.4. Estos plantines fueron inoculados de dos maneras: a. 1 ml de cultivo de rizobios se dispensó sobre la semilla de cada plantín (IS); b. los plantines recibieron como inóculo a los rizobios que se encontraban en la vermiculita (IV). Cada condición se ensayó por triplicado. Como controles siempre se incluyeron macetas sin inocular, y también macetas inoculadas con cada cepa en forma separada. Las macetas se llevaron al invernáculo y se mantuvo la humedad mediante riegos con agua destilada estéril hasta la determinación de los porcentajes de ocupación de los nódulos.

### **II.3.5. Extracción de nódulos y evaluación de experimentos de competición para la nodulación**

Los nódulos de cada tratamiento fueron extraídos y cada uno colocado en fosas de placas multipocillo estériles. Luego se los esterilizó superficialmente mediante el agregado de una solución de lavandina comercial al 20% v/v durante cinco minutos seguidos de al menos seis lavados con agua destilada estéril. Así, cada nódulo pudo ser procesado en su fosa y no se corrió el riesgo de que se produjeran contaminaciones cruzadas entre materiales provenientes de distintos nódulos cuando se liberó su contenido bacteriano. Los nódulos fueron macerados con palillos estériles, con los que luego se depositó el material recién extraído en cajas de Petri réplicas conteniendo antibióticos selectivos, lo que permitió identificar en el crecimiento posterior al material extraído de cada nódulo y al mismo tiempo, comprobar a qué cepa pertenecía.

Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza de la transformación angular de los porcentajes de ocupación (Lison, 1976).

## **CAPÍTULO III**

### **ESTABLECIMIENTO DE UNA LIMITACIÓN PARA LA ASIMILACIÓN DE N**

## **Introducción**

*B. japonicum*, al igual que otros rizobios y microorganismos del suelo, posee varias adaptaciones a la vida en ambientes pobres, tales como sistemas de alta afinidad para captar del medio bajas cantidades de nitrógeno (Tate *et al.*, 1998), fosfatos y fuentes de carbono (Humbeck *et al.*, 1985). Además, es remarcable su capacidad de crecer y sobrevivir en agua destilada durante más de un año a temperatura ambiente, manteniendo una población viable e infectiva de  $10^6$ - $10^7$  bacterias  $\text{ml}^{-1}$  (Crist *et al.*, 1984), desconociéndose aún cuáles son las fuentes nutritivas que utiliza en estas condiciones.

Aunque la condición de escasez de nutrientes es probablemente más parecida al hábitat natural de los rizobios en el suelo, la mayor parte de nuestro conocimiento sobre su fisiología proviene de estudios realizados en condiciones controladas en el laboratorio y mediante el uso de medios de cultivo ricos, que permiten el crecimiento sostenido y continuo de los microorganismos. Además, los inoculantes comerciales se elaboran con rizobios cultivados también en medios ricos, con lo cual sus condiciones metabólicas y fisiológicas deben ser diferentes a las de los rizobios naturalizados en el suelo. Algunas observaciones indican que los rizobios incubados en medios muy pobres por ciertos períodos tienen una mayor actividad en su interacción temprana con raíces de leguminosas (Caetano Anollés, 1985; Kijne *et al.*, 1988; Lodeiro, 1994; Brelles Mariño y Boiardi, 1996). Así, esta diferencia fisiológica podría guardar relación con el problema de la escasa competitividad de estos inoculantes frente a las cepas naturalizadas en suelos con historia previa de cultivo de soja, explicada en la Sección I.2 del Capítulo I.

De acuerdo a estas premisas, creemos que es importante avanzar en el conocimiento de la fisiología y el metabolismo de los rizobios bajo limitaciones nutricionales lo cual, además, podría permitir el desarrollo de formulaciones de inoculantes más eficaces.

Entre los macronutrientes utilizados por *B. japonicum*, el N es de primordial importancia no sólo por su rol metabólico como constituyente de las macromoléculas fundamentales, sino porque como se mencionó en el Capítulo I, la fijación biológica de  $\text{N}_2$  atmosférico por parte de los rizobios sólo se lleva a cabo en ambientes pobres en dicho elemento.

Se sabe que la presencia de N combinado como  $\text{NO}_3^-$  o  $\text{NH}_4^+$  condiciona a la planta para que ésta inhiba la nodulación, o la fijación de  $\text{N}_2$  aún cuando los nódulos hayan podido formarse (véase sección I.5.4).

Algunas evidencias señalan también que la abundancia de N combinado afectaría igualmente a los rizobios para la expresión de sus actividades de preinfección e infección (Wang y Stacey, 1990; Dusha y Kondorosi, 1993; Zahran, 1999), todo lo cual indica que el N combinado, además de nutriente, es un condicionante ambiental importante para regular todo el proceso simbiótico. Sin embargo, no se han estudiado los efectos que produce la escasez de N en los rizobios, aunque podría esperarse que los cambios metabólicos y fisiológicos que ocasiona favorezcan de alguna manera la eficacia de su asociación temprana con las raíces de leguminosas. Por lo tanto, es de interés evaluar los sistemas específicos que se activan para adaptarse a la escasez de este nutriente en *B. japonicum*.

Los pocos estudios realizados sobre las consecuencias simbióticas que traería la escasez de fuentes de N para los rizobios en general han arrojado resultados nulos o contradictorios y nosotros creemos que ello se debe en parte al poco cuidado que se ha puesto en demostrar que la condición de escasez de N elegida realmente impusiera una limitación metabólica capaz de modificar el comportamiento bacteriano. Como los rizobios poseen sistemas muy eficientes para captar nutrientes escasos, podría esperarse que la simple disminución de la concentración de la fuente de N en unos pocos órdenes de magnitud no traiga consecuencias metabólicas, y ello explique la falta de resultados en algunos de los experimentos realizados.

Nuestro interés radica en comprender los efectos metabólicos y fisiológicos causados por la escasez de fuentes de N en los rizobios, e intentar determinar si dicha escasez tiene consecuencias favorables para el establecimiento de la simbiosis, lo cual podría resultar beneficioso en el desarrollo de inoculantes mejorados. Por lo tanto, en este Capítulo mostraremos las condiciones en las cuales puede obtenerse un grado severo y otro intermedio de limitación metabólica de N, evaluados a través de medidas del crecimiento bacteriano y del análisis de la regulación de la actividad GS.

## **Resultados y Discusión**

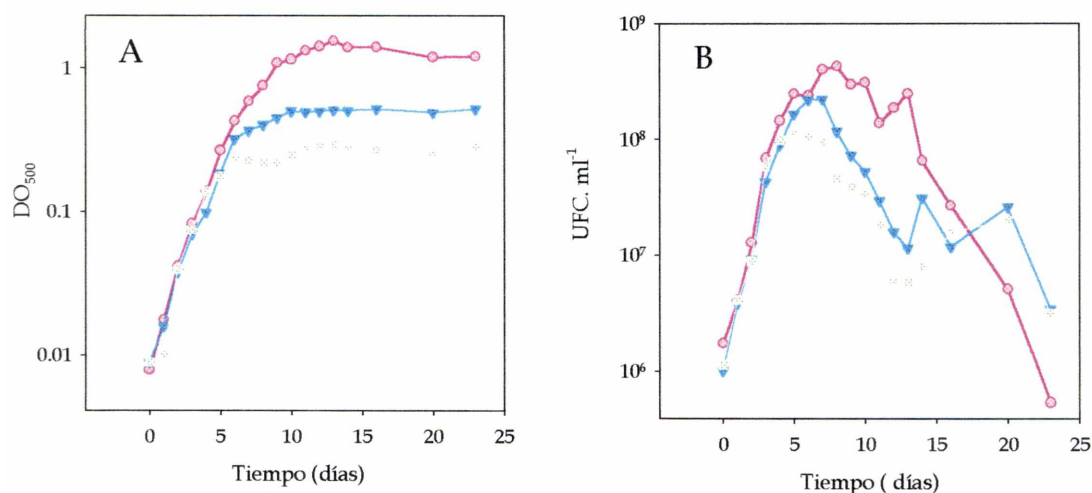
### **III.1. Crecimiento bacteriano en medios limitados en la fuente de nitrógeno**

Con el objetivo de caracterizar el crecimiento de *B. japonicum* en medios con escasez en la fuente de nitrógeno, se cultivó la cepa LP 3001 en el medio de Götzt *et al.* (1982), de composición definida, y cuya fuente de nitrógeno es el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ . Se eligieron tres concentraciones de la fuente de nitrógeno: un medio se preparó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1mM (GN 1), que es la concentración del medio original, otro con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,1 mM (GN 0,1) y un tercero desprovisto de él (GN 0). Todos estos cultivos se iniciaron a partir de rizobios que estaban en el estadio exponencial de crecimiento (véase Sección II.1.3.). Durante 23 días se tomó muestras de los cultivos diariamente, y a cada muestra se le estimó la biomasa total por medida de la densidad óptica a 500 nm ( $\text{DO}_{500}$ ) y el número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias (UFC). Se realizaron tres experimentos independientes los cuales mostraron resultados similares; a continuación expondremos los resultados obtenidos en uno de ellos.

En la Figura 3.1 se muestran las curvas de crecimiento provenientes de cada medio de cultivo, y puede observarse que para los tres niveles de la fuente de N se distinguen claramente una fase logarítmica (de crecimiento exponencial) y una fase estacionaria (donde la biomasa total se mantiene constante). Además se puede observar que en los tres medios los rizobios poseen la misma velocidad de crecimiento en la fase logarítmica independientemente del nivel de la fuente de N. Es interesante destacar que aún en GN 0 los rizobios crecieron durante por lo menos seis generaciones a una velocidad comparable a la del medio bien provisto de N ( $1,2 \text{ día}^{-1}$ ). A continuación de la fase logarítmica comienza a observarse la limitación que el nivel de la fuente de N provoca en el crecimiento a medida que los cultivos entran en fase estacionaria: para las bacterias cultivadas en el medio GN 1 la entrada en fase estacionaria se produjo entre los 12 y 14 días de crecimiento y 1,40 de  $\text{DO}_{500}$ , para GN 0,1 a los 10 días y con una  $\text{DO}_{500}$  de 0,50 y para GN 0 a los 7 días y con 0,25 de  $\text{DO}_{500}$  (Fig. 3.1.A).

En la Figura 3.1.B se puede observar que el número de  $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1}$  comenzó a disminuir cuando los cultivos entraron en fase estacionaria mientras que la biomasa (Fig. 3.1.A) se mantuvo constante.



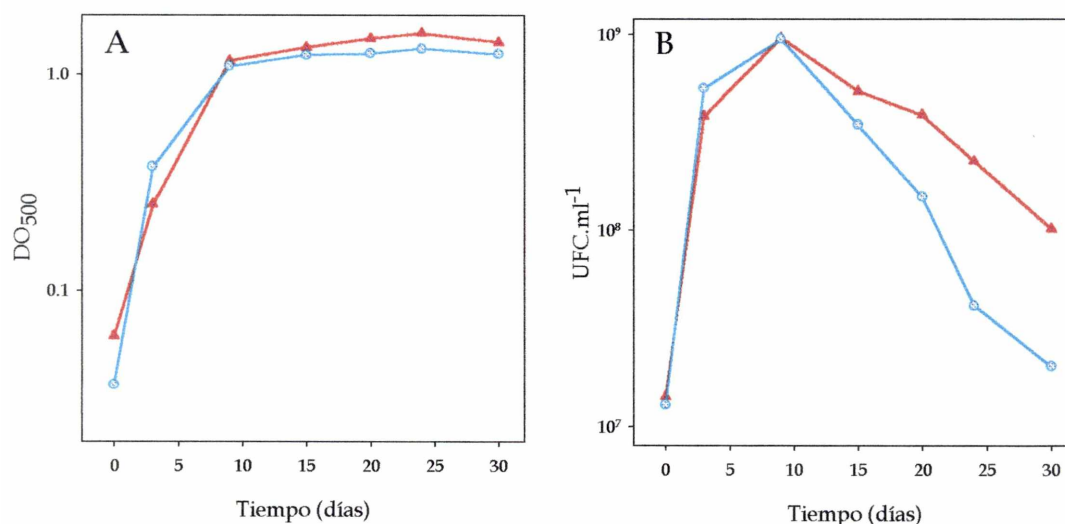


**Figura 3.1.:** Crecimiento de *B. japonicum* LP 3001 en GN 0 (cuadrados), GN 0,1 (triángulos) y GN 1 (círculos) durante 23 días a 28°C con agitación a 180 rpm. **A.** Biomasa estimada por la densidad óptica a 500 nm (DO<sub>500</sub>). **B.** Estimación del número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC.ml<sup>-1</sup>). Los datos pertenecen a un experimento representativo de tres experimentos independientes, cuyos resultados fueron coincidentes.

Esta caída en la estimación del número de células viables no puede atribuirse a la formación de agregados de células, ya que mediante la observación por microscopía de los cultivos durante el crecimiento se pudo verificar que las agrupaciones de más de tres células constituían menos del 2% del total de unidades observadas. Esto indicaría que desde el comienzo de la fase estacionaria la velocidad de muerte bacteriana es mayor que la de duplicación. También puede observarse que el descenso de las UFC.ml<sup>-1</sup> es más pronunciado y continuo en las bacterias que crecieron en GN 1, mientras que en los cultivos de GN 0,1 y GN 0 se observó una declinación entre los 10 y 14 días, seguida de una tendencia a la estabilización. Así, mientras que a la entrada en la fase estacionaria los rizobios cultivados en GN 1 tenían una mayor concentración de células viables, a los 15 días esta tendencia se revirtió, indicando que los rizobios cultivados en medios limitados en la fuente de nitrógeno mantienen una mayor viabilidad en tiempos prolongados. Una posible explicación a la pérdida de viabilidad en GN 1 podría atribuirse a una disminución del pH del medio como consecuencia del metabolismo presentado por un alto número de células en estos cultivos. Para averiguar si éste es el caso,

medimos el pH del medio en los tres cultivos y pudimos constatar una disminución a 5,5 en GN 1 a partir de los 10 días hasta el día 23, mientras que para los cultivos en GN 0,1 y GN 0 el pH permaneció relativamente constante en 6,5. Sin embargo, esta disminución en el pH no puede explicar la caída de células viables en GN 1 ya que esta cepa es capaz de sobrevivir en esos rangos de pH. (Jordan, 1984).

Por otro lado, la disminución de las células viables en los tres medios pudo deberse al hecho de que los rizobios se cultivaron en medios con antibiótico. Para evaluar esta hipótesis, estudiamos el crecimiento de LP 3001 en GN 1 con y sin Sp (Figura 3.2). En ambos casos pudimos observar una disminución en el número de células viables, pero en los rizobios cultivados en el medio con antibiótico la cinética de muerte fue mayor. Podríamos pensar entonces, que la pérdida de viabilidad observada en la Figura 3.1 se deba a un efecto provocado por el antibiótico.



**Figura 3.2.** : Crecimiento de *B. japonicum* LP 3001 en GN 1 con Sp (círculos) y sin antibiótico (triángulos) durante 30 días a 28°C con agitación a 180 rpm. **A.** Biomasa estimada por la densidad óptica a 500 nm (DO<sub>500</sub>). **B.** Estimación del número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC.ml<sup>-1</sup>).

Para observar si la biomasa obtenida en GN1 podrían estar también limitada por el nivel de N, cultivamos a las bacterias en el medio GN 1 con distintas modificaciones: tres de ellas consistían en el medio de Götz con cada uno de los siguientes nutrientes 10 veces más concentrados: 1)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM (GN 10); 2) MgSO<sub>4</sub> 10 mM (GMg 10); 3) CaCl<sub>2</sub> 1 mM (GCa 1), y una cuarta condición consistió en duplicar la concentración de la fuente de carbono (manitol 1% p/v) (GM 1). En todos los casos se mantuvieron constantes todos los otros componentes (Guirard y Snell, 1981).

El aumento en el nivel de N en el medio GN 10 no condujo a un aumento de biomasa, como así tampoco los otros nutrientes en los medios GMg 10 y GM 1. Sin embargo, para el cultivo en GCa 1 las lecturas de DO<sub>500</sub> fueron el doble que las del control en GN 1 en fase logarítmica tardía (8 días de crecimiento) y una vez y media el valor del control en fase estacionaria (14 días de crecimiento). Estos resultados sugirieron que en estas condiciones el nivel de N en GN 1 es suficiente para el crecimiento de LP 3001.

### **III.2. Asimilación de N en *B. japonicum***

Teniendo en cuenta los datos obtenidos para el crecimiento de *B. japonicum* LP 3001 en las distintas condiciones nutricionales anteriormente expuestas, se eligieron dos estadios de crecimiento para analizar la actividad asimilatoria de N en dichas condiciones, uno a los 5 y otro a los 14 días. A los 5 días los rizobios en GN 0 se encuentran en una fase exponencial tardía y transcurrieron suficientes generaciones desde la dilución del cultivo iniciador en GN 1 como para que el estado de limitación en nitrógeno se haya manifestado plenamente, mientras que los de GN 0,1 y GN 1 están en plena fase exponencial y por lo tanto, no están limitados en su crecimiento por nutriente alguno. De este modo, podremos comparar el sostenimiento del crecimiento en una situación de severa escasez de N con situaciones en donde la escasez de N aún no se ha manifestado. A los 14 días los tres cultivos se encuentran en fase estacionaria limitados por N o por algún otro nutriente y es allí donde podremos comparar los efectos acumulados de una limitación severa de N, otra intermedia, y la suficiencia de este nutriente.

Como se mencionó en el Capítulo I la asimilación de N en los rizobios se lleva a cabo mediante el ciclo GS - GOGAT (Figura 1.11). De las dos enzimas mencionadas, sólo la GS está sometida a múltiples sistemas de regulación. *B. japonicum* tiene dos formas de esta enzima, llamadas GS I y GS II (Carlson *et al.*, 1987). La regulación de la actividad GS I ocurre por modificación covalente, y se conoce al menos una docena de efectores de dicha modificación (Fell, 1997). Esta enzima tiene doce subunidades

idénticas y cada una de ellas puede encontrarse en un estado activo o inactivo según se encuentre deadenilada o adenilada, respectivamente (para más detalles, véase sección I.6.2 del Capítulo I). Por su parte, la actividad de GS II se regula al nivel de la expresión génica, mediada por el sistema de dos componentes NtrBC. La existencia de tantos sistemas de regulación yuxtapuestos sobre GS indica que esta enzima ejerce un alto grado de control sobre el flujo metabólico de la asimilación de N (Fell, 1996). Así, la determinación de su actividad es un buen indicador del flujo de asimilación de N, y en consecuencia, del estado de limitación metabólica en este nutriente.

La actividad GS fue medida por la reacción  $\gamma$  glutamil-transferasa (Bender *et al*, 1976), en células de la cepa LP 3001 previamente cultivadas durante 5 ó 14 días en GN 1, GN 0,1 ó GN 0. La actividad de la forma I (termoestable) se estimó por calentamiento de la muestra una hora a 50°C, y se calculó su estado de adenilación midiendo la actividad enzimática en presencia y en ausencia de una solución de MgCl<sub>2</sub> 60 mM, que inhibe la catálisis de la reacción  $\gamma$  glutamil-transferasa por parte de la forma adenilada (Shapiro y Stadman, 1970). La actividad de la forma II (termosensible) se calculó por diferencia de la actividad total –antes del tratamiento con calor– y la actividad de la forma I (Darrow y Knotts, 1977).

En los cultivos de 5 días se observó que las bacterias cultivadas en GN 0 presentaron una actividad total de GS mayor que los otros, siendo más de la mitad debida a la GS II (Tabla 3.1), lo cual sugiere que el crecimiento del cultivo en GN0 en fase logarítmica hasta los 5 días estuvo sostenido por un lado por la alta capacidad de asimilación del muy escaso N presente en el medio (proveniente de la dilución del caldo iniciador) por parte de ambos sistemas, GS I y GS II actuando coordinadamente, y por el otro, por la alta captación del NH<sub>4</sub><sup>+</sup> proveniente del reciclado proteico. En el caso de las bacterias cultivadas en GN 0,1 no se pudo observar diferencias ni en el estado de adenilación de la GS I ni en la actividad de la GS II con respecto a las bacterias cultivadas en GN 1, lo cual era esperable dado que, como se mencionó, ambos cultivos aún se encuentran en fase exponencial.

**Tabla 3.1:** Actividad Glutamino Sintetasa I (GS I) y Glutamino Sintetasa II (GS II) de *B. japonicum* LP 3001 cultivada en GN 0, GN 0,1, o GN 1 durante 5 o 14 días, a 28°C y 180 rpm.

Edad (días)	Medio de cultivo	Actividad específica de GS				Nº de subunidades adeniladas de GS I
		nanomoles de $\gamma$ -glutamil hidroxamato $\text{min}^{-1}$ $\text{mg proteína}^{-1}$		Porcentaje del total		
		GS I	GS II	GS I	GS II	
5	GN 0	646,62 $\pm$ 33,76	1.161,66 $\pm$ 60,64	35,7	64,3	1,9
5	GN 0,1	275,69 $\pm$ 6,73	78,00 $\pm$ 1,90	77,9	22,1	1,0
5	GN 1	254,60 $\pm$ 12,32	54,68 $\pm$ 2,65	82,5	17,5	1,3
14	GN 0	1.172,93 $\pm$ 89,31	278,20 $\pm$ 21,2	80,8	19,2	2,3
14	GN 0,1	2.153,82 $\pm$ 124,97	140,98 $\pm$ 8,18	93,8	6,2	3,3
14	GN 1	785,76 $\pm$ 64,57	77,04 $\pm$ 6,33	91,1	8,9	6,7

La actividad GS fue medida por la reacción  $\gamma$ -glutamil transferasa, expresada como actividad específica (media  $\pm$  SD). El promedio de subunidades adeniladas de GS I fue calculado por incubaciones en presencia o ausencia de  $\text{MgCl}_2$  60 mM. Todas las determinaciones fueron realizadas por cuadruplicado.

La inducción de una mayor actividad total de GS durante la fase estacionaria en los medios escasos en N indica el efecto de una creciente limitación de N intracelular. Se observa una disminución en el estado de adenilación de la GS I a medida que disminuye la fuente de N, presentando un promedio de 2,3 subunidades adeniladas en la limitación severa (GN 0) y de 3,3 en la limitación moderada (GN 0,1), mientras que en GN 1 el promedio fue de 6,7. Además también se observa una mayor actividad específica de GS II en ambos cultivos limitados en N. La actividad específica total de GS es mayor en GN 0,1 lo cual indicaría que aquí se acumuló una mayor cantidad tanto de GS I como de GS II. Aún así, la mayor proporción de la actividad GS total debida a GS II indica que en GN 0 la limitación metabólica en N fue más severa a lo largo de los 14 días en comparación con GN 0,1.

Tomados en conjunto, estos resultados corroboran que la restricción de la producción de biomasa en GN 0 y GN 0,1 se debió a una limitación intracelular de precursores nitrogenados.

Los resultados hasta aquí presentados muestran que *B. japonicum* es capaz de crecer durante por lo menos seis generaciones con muy bajas cantidades de la fuente de N (menos de 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4^+$ ) a una velocidad comparable al medio con suficiencia de N. El grado de limitación metabólica por la fuente de N fue corroborado por el estado de activación de GS I y por el nivel de expresión de GS II, enzimas claves en la asimilación de este importante nutriente en los rizobios de vida libre.

## **CAPÍTULO IV**

**DESTINOS DEL C DURANTE EL  
CRECIMIENTO LIMITADO EN N**

## **Introducción**

Al cabo de algunas generaciones de crecimiento en medios con escasez de la fuente de N, el metabolismo celular debe modificarse para continuar pese a ir experimentando una limitación creciente en este elemento. Dicha limitación se puede observar a través de un aumento en la actividad específica total de GS, que está regulada por los niveles relativos de  $\alpha$ -cetoglutarato y glutamina, los que a su vez reflejan la relación C/N intracelular. Así, una alta actividad GS como la observada en los experimentos descritos en el Cap. III en condiciones de escasez severa (GN 0) o moderada (GN 0,1) de la fuente de N en el medio de cultivo (extracelular) es indicadora de una alta relación C/N intracelular. En estos medios puede producirse un aumento en la carga energética celular y como consecuencia de ello y del alto contenido de C en la célula, favorecerse la síntesis de polímeros con muy bajo contenido de N como por ejemplo polisacáridos y/o poli  $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) (Zevenhuizen *et al.*, 1981). Los polisacáridos superficiales de los rizobios juegan un papel decisivo en la infección y nodulación de las leguminosas (Fraysse *et al.*, 2003), y en el caso particular de la interacción *B. japonicum*-soja, el LPS es requerido para que la nodulación tenga lugar (Kannenbergh *et al.*, 1998; Fraysse *et al.*, 2003) mientras que el CPS y el EPS determinan la eficiencia de la infección y nodulación (Parniske *et al.*, 1993). Dado que el LPS es un constituyente de la membrana externa bacteriana podría esperarse sólo una pequeña variación en la cantidad que cada célula pueda acumular de este polisacárido en respuesta a un incremento en la relación C/N intracelular. En cambio, para el caso del CPS y el EPS un hipotético incremento en su biosíntesis y exportación por unidad celular no tendría mayores limitaciones, y de hecho, hemos observado durante los experimentos descritos en el Capítulo anterior, que los cultivos en los medios GN 0 y GN 0,1 eran considerablemente más viscosos y mucosos que en GN 1, lo cual sugiere que la mencionada acumulación de CPS y EPS efectivamente estaría ocurriendo. De ser así, esto podría tener consecuencias sobre la simbiosis y es por ello que en este Capítulo analizaremos los posibles destinos del carbono en los tres medios de crecimiento.



## **Resultados y Discusión**

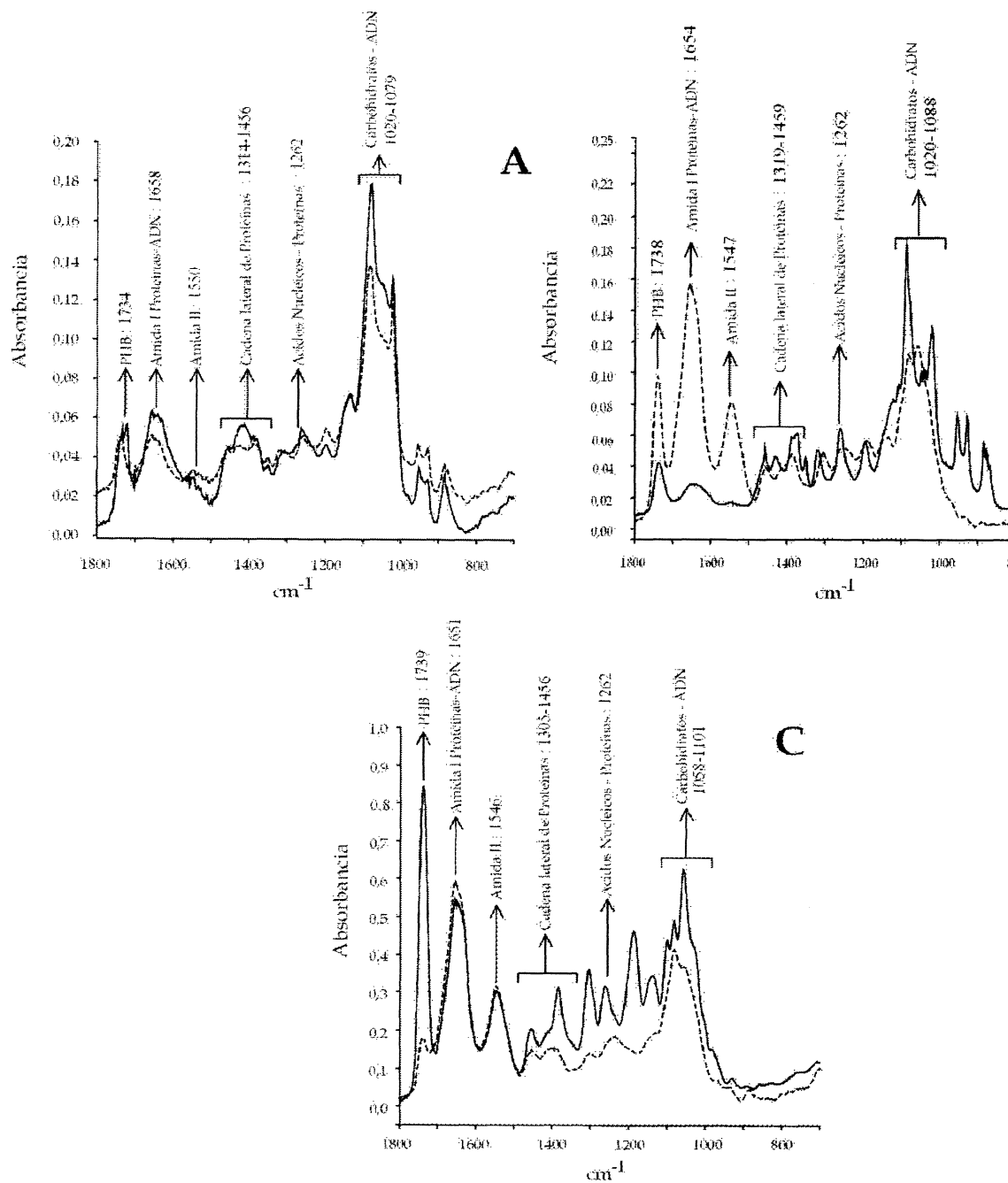
### **IV.1. Acumulación de compuestos de C durante el cultivo de *B. japonicum***

Con el fin de estudiar la acumulación de alguno de estos polímeros en *B. japonicum* LP 3001, se realizó un análisis de la composición de los rizobios cultivados en GN 0, GN 0,1 o GN 1 durante 5 ó 14 días por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR). Debe recordarse que los cultivos de 5 días en GN 0 se encuentran en fase exponencial tardía (Fig. 3.1) y muestran el máximo nivel de inducción de GS II (Tabla 3.1). Ello permite inferir que, si bien estas células continúan dividiéndose, la limitación metabólica de N se ha expresado. Estas últimas divisiones celulares previas a la entrada en fase estacionaria se realizan gracias a la captación y asimilación del muy escaso N presente en el medio de cultivo como así también al reciclado de N intracelular. Por su parte, los cultivos en GN 0,1 y GN 1 se encuentran en plena fase exponencial a los 5 días de crecimiento (Figura 3.1) con lo cual no debería esperarse que estén sufriendo alguna limitación por N, como se puede inferir de sus actividades GS I y GS II (Tabla 3.1). A los 14 días los tres cultivos se encuentran en fase estacionaria, pero sólo los cultivos en GN 0 y GN 0,1 llegaron a dicha fase por la limitación de N en el medio de crecimiento (Figura 3.1 y Tabla 3.1).

La metodología de FTIR fue elegida debido a que con ella se puede analizar el contenido celular total *in vivo*. Esta técnica se basa en que la radiación IR incide sobre las uniones de los átomos de las diferentes moléculas y cada una de estas uniones absorben y vibran a una frecuencia característica. Entonces cada pico que aparece en el espectro IR a una determinada frecuencia se corresponde con determinadas moléculas. Gracias al grado de penetración de la radiación IR y a su ángulo de incidencia, este análisis puede realizarse sobre la célula intacta.

En la Figura 4.1 se muestran los perfiles de FTIR obtenidos y se puede observar que los cultivos con limitación severa de N (GN 0) produjeron una alta cantidad de carbohidratos pero baja de PHB, en relación con la proteína celular, tanto a los 5 días de edad como a los 14 días. Los cultivos con limitación moderada de N (GN 0,1) acumularon carbohidratos pero no PHB cuando pasaron de la fase exponencial (cuando aún no se había manifestado la limitación intracelular de N) a la estacionaria. Mientras tanto, los cultivos con suficiencia de la fuente de N (GN 1)

acumularon PHB pero redujeron su producción de carbohidratos a medida que envejecieron.



**Figura 4.1.** Espectro de FTIR obtenido de los cultivos de *B. japonicum* LP 3001 de 5 y 14 días de crecimiento en los medios GN 0, GN 0,1 y GN 1. Se analizó el contenido celular total.

Curiosamente, podemos observar en los perfiles de FTIR que en todos los cultivos limitados en N, es decir, los cultivos de GN 0 de 5 y 14 días y el cultivo de GN 0,1 de 14 días (véase tabla 3.1), que después de la banda de carbohidratos aparecen tres picos bastante definidos, indistinguibles en los otros cultivos. Si bien su naturaleza es desconocida, la presencia en estos cultivos de estos tres picos parece ligarlos a una propiedad que se manifiesta bajo la limitación de N, con lo cual su futuro estudio podría arrojar nuevas claves con respecto a la fisiología y metabolismo bacterianos en esta condición.

Los resultados obtenidos del perfil bacteriano por FTIR nos condujo a corroborar por medidas químicas *in vitro* la acumulación de polisacáridos y de PHB. Entre los diferentes polisacáridos que los rizobios pueden sintetizar se decidió cuantificar los polisacáridos extracelulares EPS y CPS, debido a que tienen un rol importante en las etapas tempranas de infección radicular (Parniske *et al.*, 1993). Además, al no estar restringidos a un dado compartimento celular, su acumulación no estaría limitada por la cantidad o el tamaño de las células y entonces podría esperarse que representen una fracción considerable de todos los polisacáridos producidos (Zevenhuizen *et al.*, 1981).

Como se muestra en la Tabla 4.1, los cultivos de 5 días en GN 0 y los de 14 días en GN 0 y en GN 0,1 poseyeron un mayor contenido de EPS y de CPS en relación con las proteínas celulares totales, correlacionando con los resultados de FTIR (Figura 4.1) y con su limitación metabólica en N (Tabla 3.1.).

A los 14 días de crecimiento la suma de ambos polisacáridos fue 10 a 20 veces mayor en los cultivos de GN 0 o GN 0,1 que en el de GN 1. Además, este último produjo más cantidad de EPS y CPS en fase exponencial que en estacionaria en concordancia con estudios previos (Law *et al.*, 1982; Mort y Bauer, 1980), pero contrariamente, los cultivos limitados en N tendieron a acumular los dos polisacáridos en fase estacionaria.

El perfil de bandas observado en los geles de poliacrilamida de EPS y CPS resultó indistinguible para las tres cantidades de N y las 2 fases de crecimiento analizadas. El bandeo obtenido para estos polisacáridos fue similar al informado por Díaz-Marrero *et al.* (1998).

A diferencia de los polisacáridos extracelulares, el PHB no tendió a acumularse con la edad del cultivo en el medio GN 0; en cambio, cuando el cultivo entró en fase estacionaria en el medio GN 1, el exceso de este último se canalizó hacia la formación de PHB. (Tabla 4.1).

**Tabla 4.1.** Contenido de polisacáridos extracelulares y PHB en *B. japonicum* LP 3001 expresados por mg de proteína celular ( $\pm$  D.S.) en cultivos de 5 y 14 días, en medios con diferentes contenidos de la fuente de N.

Edad (días)	Medio de cultivo	Polisacáridos extracelulares (mg/mg proteína celular) (PSE)			PHB (mg/mg proteína celular)	PSE/PHB (mg/mg)
		EPS	CPS	Total		
5	GN 0	4,51 $\pm$ 0,55	1,78 $\pm$ 0,04	6,29	0,20 $\pm$ 0,06	31,45
5	GN 0,1	3,13 $\pm$ 0,13	0,39 $\pm$ 0,05	3,52	0,10 $\pm$ 0,02	35,20
5	GN 1	1,06 $\pm$ 0,17	0,62 $\pm$ 0,02	1,68	0,05 $\pm$ 0,01	33,60
14	GN 0	10,88 $\pm$ 0,86	4,55 $\pm$ 0,26	15,43	0,10 $\pm$ 0,02	154,30
14	GN 0,1	2,96 $\pm$ 0,06	3,12 $\pm$ 0,48	6,08	0,30 $\pm$ 0,04	20,27
14	GN 1	0,57 $\pm$ 0,02	0,07 $\pm$ 0,01	0,64	0,36 $\pm$ 0,03	1,78

Estos resultados y los observados en el perfil de FTIR muestran que si bien en los tres medios se acumulan polímeros de C, al entrar el cultivo en fase estacionaria la naturaleza de los polímeros acumulados cambia: los cultivos limitados en N acumularon EPS y CPS mientras que en GN 1 acumularon PHB. En concordancia con esta tendencia, el cultivo con limitación moderada en N (GN 0,1) tuvo un comportamiento intermedio. Respecto de la fuente de C utilizada (manitol), el PHB está más reducido, mientras que los polisacáridos extracelulares tienen un estado de reducción menor debido a la presencia de residuos de ácido galacturónico en su cadena. Dado que para la biosíntesis de PHB se tiene que haber utilizado más poder reductor que para la de EPS y CPS, podría inferirse que el cultivo en GN 1 probablemente contuviera un exceso de poder reductor a diferencia de los limitados en N. Una posible causa para este exceso de poder reductor podría ser que en el cultivo de GN 1 la disponibilidad del O<sub>2</sub> disuelto sea escasa por la gran cantidad de células viables presentes. Si este es el caso, el ciclo de Krebs funcionaría a menor velocidad, lo cual conduciría a la acumulación acetyl CoA, citrato, isocitrato y  $\alpha$ -cetoglutarato (en relación con los otros intermediarios de dicho ciclo.) El posible exceso de poder reductor y de acetyl CoA se

canalizarían, consecuentemente, hacia la biosíntesis de PHB (Zevenhuizen, 1981; Madison y Huisman, 1999) (Figura 1.10).

En los cultivos limitados en N la relación de concentraciones de acetil CoA y los otros intermediarios del ciclo de Krebs no se vería afectada al pasar de fase exponencial a estacionaria dado que la baja biomasa no podría conducir a una escasez de O<sub>2</sub> disuelto. En este caso, la alta cantidad de  $\alpha$ -cetoglutarato en relación a glutamina induciría al ciclo GS-GOGAT a funcionar con una muy alta actividad de las enzimas GS I y GS II para captar más eficientemente el escaso N del medio e intracelular, lo que demandaría más  $\alpha$ -cetoglutarato evitando así su acumulación en relación con los otros intermediarios del ciclo de Krebs. En estas circunstancias no habría suficiente acumulación de acetil CoA como para inducir la formación de más PHB, ni tampoco hay un exceso de poder reductor. (Figura 1.9). Además si se dispone de una alta carga energética, el flujo de C se orientaría preferentemente hacia la síntesis de polisacáridos.

#### **IV.2. Crecimiento de un mutante de *B. japonicum* defectivo en la síntesis de EPS con diferentes limitaciones en su fuente de nitrógeno**

La explicación dada anteriormente para la acumulación diferencial de C en EPS y CPS o PHB según el grado de limitación de N con que cultivo ingrese a fase estacionaria, se basa únicamente en la posible acumulación de poder reductor en el cultivo en GN 1, pero podría haber otros condicionantes que canalicen el flujo de C hacia uno u otro destino. En particular, sería interesante observar si existe una competición por el C disponible entre ambas vías biosintéticas. Como una aproximación a esta cuestión hemos iniciado estudios con un mutante incapaz de realizar una de estas vías, esto es, la biosíntesis de EPS y CPS en comparación con la cepa salvaje, en ambas situaciones. Dado que para *B. japonicum* EPS y CPS poseen idéntica estructura (Mort y Bauer, 1982) de aquí en adelante serán referidos conjuntamente como polisacáridos extracelulares (PSE).

Hemos encarado estos estudios con la cepa *B. japonicum*  $\Delta$ P22, derivada de la cepa USDA 110, que posee una delección que abarca el gen *exoB*. Este gen codifica la UDP-glucosa-4-epimerasa (Parniske *et al.*, 1993), cuya actividad se requiere para la formación de UDP-galactosa, un precursor esencial del PSE en *B. japonicum* sin el cual no puede formarse un polímero normal (Parniske *et al.*, 1993; Becker *et al.*, 1998a; Becker y

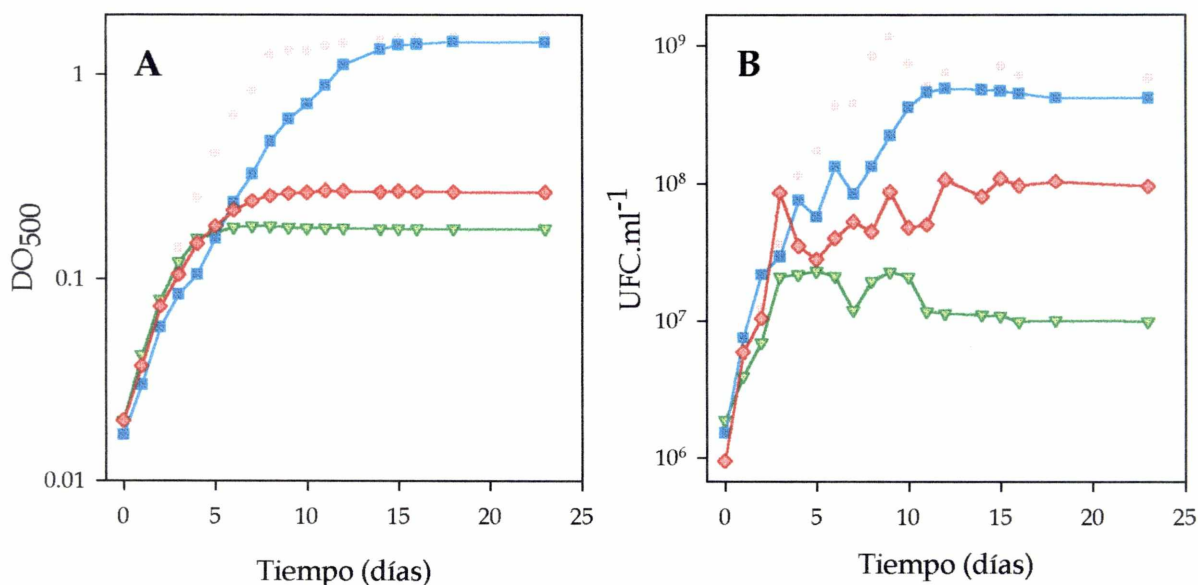
Pühler, 1998). Por lo tanto esta cepa produce PSE defectuosos y en baja cantidad; las colonias que forma no son mucosas y además su infectividad y competitividad son escasas (Parniske *et al.*, 1993). Sin embargo, esta cepa no tiene afectada la producción ni la composición del LPS, ya que a pesar de las similitudes en la síntesis de los precursores de los PSE con el LPS, en *B. japonicum* este último polisacárido no contiene galactosa en su constitución. Este hecho es importante debido a que los efectos observados en este mutante serán exclusivos del PSE defectuoso formado.

Como primer paso en nuestros estudios hemos caracterizado el crecimiento de las cepas  $\Delta P22$  y USDA 110 en los medios y condiciones de cultivo de los estudios previos, con el fin de determinar estadios de crecimiento equivalentes a las utilizadas con la cepa LP 3001 en los ensayos anteriores. Para ello se cultivó la cepa *B. japonicum*  $\Delta P22$  en GN 1 y GN 0, en comparación con la cepa parental USDA 110 cultivada en las mismas condiciones (dado que los cultivos en GN 0,1 arrojaron resultados intermedios, decidimos eliminar esta condición con el objetivo de reducir el tamaño y número de variables experimentales a ensayar simultáneamente). Estos cultivos se mantuvieron a 28°C y a 180 rpm y diariamente se determinó su biomasa total por DO<sub>500</sub> y el número de células viables por recuento en placa de las UFC.ml<sup>-1</sup> tal como se hizo en los estudios anteriores. Este ensayo se repitió en dos experimentos independientes con los mismos resultados. En la Figura 4.2, representativa de uno de estos experimentos, puede observarse que tanto la cepa salvaje como la mutante cultivadas en GN 1 llegaron al mismo número de UFC.ml<sup>-1</sup>, pero la cepa mutante lo hizo con una velocidad de crecimiento más lenta.

Es llamativo que con la cepa mutante en GN 0 se obtuvo tanto una mayor biomasa como un mayor número de células viables con respecto a la cepa salvaje en el mismo medio (Figura 4.2). Esto podría deberse a que la cepa mutante podría tener una mayor disponibilidad energética al sintetizar menor cantidad de PSE que la salvaje, y por lo tanto conducir el C excedente hacia la formación de más biomasa. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la formación de biomasa requiere además la utilización de otros nutrientes, por ejemplo N, y en este medio hay una escasez del mismo. Todo esto podría indicar que la mayor disponibilidad energética para la producción de biomasa permitió asimismo un mayor aprovechamiento del nutriente limitante.

Otro dato que podemos concluir observando la curva de la Figura 4.3 es que los días 5 y 14 de crecimiento para las dos cepas son similares que

para la cepa LP 3001; por lo tanto también realizamos los análisis de PSE y PHB a esos mismos tiempos.



**Figura 4.2.** Crecimiento de las cepas *B. japonicum* USDA 110 (círculo y triángulo) y  $\Delta$ P22 (cuadrado y rombo), en GN 1 y GN 0 respectivamente, durante 23 días a 28°C y a 180 rpm. **A.** Biomasa estimada por la DO 500nm. **B.** Estimación del número de células viables por recuento en placa de las unidades formadoras de colonias por ml de cultivo (UFC.ml<sup>-1</sup>).

### **IV.3. Acumulación de PSE y PHB en la cepa *exoB*<sup>-</sup> en comparación con la cepa salvaje**

Como dijimos anteriormente la cepa  $\Delta$ P22 produce PSE alterados y en menor cantidad. Si las rutas de producción de PSE y PHB están de alguna manera compitiendo por el C disponible, la cepa mutante debería producir más PHB en el medio GN 0 al pasar de fase logarítmica a estacionaria, como consecuencia del aumento de C disponible debido a su incapacidad de producción de PSE. Para ver si se produce esta transición de la síntesis de PSE a PHB, determinamos el contenido de ambos en las cepas  $\Delta$ P22 y USDA 110.

**TABLA 4.2.** Contenido de PSE y PHB en *B japonicum* USDA 110 y  $\Delta$ P22 expresados por miligramo de proteína celular cultivados en medios GN 0 y GN 1 en fase logarítmica y estacionaria.

Cepa	Medio de cultivo	Edad (días)	Polisacáridos extracelulares (mg/mg de proteína celular)		PHB (mg/mg de proteína celular)	Relación PSE/PHB (mg/mg)
			EPS	CPS		
USDA 110	GN 0	5	3,16 ± 0,32	1,59 ± 0,46	0,23 ± 0,01	15,13
		14	11,10 ± 0,43	1,82 ± 0,50	0,22 ± 0,01	58,73
	GN 1	5	0,70 ± 0,24	0,38 ± 0,22	0,01 ± 0,002	83,08
		14	0,27 ± 0,16	0,12 ± 0,09	0,38 ± 0,02	1,03
$\Delta$ P22	GN 0	5	1,57 ± 0,64	0,21 ± 0,12	0,18 ± 0,01	9,89
		14	3,21 ± 0,11	0,28 ± 0,14	0,18 ± 0,01	19,39
	GN 1	5	0,06 ± 0,03	0,04 ± 0,02	0,17 ± 0,02	0,59
		14	0,09 ± 0,03	0,04 ± 0,01	0,67 ± 0,14	0,19

Los cultivos limitados en N derivaron el C acumulado en fase estacionaria hacia la síntesis de PSE, tanto en la cepa USDA 110 como en la  $\Delta$ P22 (Tabla 4.2). Por otra parte, en ninguna de las dos cepas se observaron cambios en el contenido de PHB en esta condición de cultivo. Para la cepa salvaje este resultado corrobora el obtenido con la cepa LP 3001.

El hecho de que la cepa  $\Delta$ P22, a pesar de su mutación, aún haya canalizado el C hacia la síntesis de PSE (o sus precursores) cuando los cultivos envejecieron limitados en N, sugiere que en estas condiciones no pudo acumularse acetil CoA en una magnitud tal que sirva como precursor de la síntesis de PHB. Según nuestra hipótesis, esto puede haberse debido a la combinación de una alta carga energética y un muy escaso incremento de poder reductor. Además, la alta carga energética contribuiría a favorecer el flujo de C desde el manitol hacia las etapas tempranas de síntesis de polisacáridos que contribuirían con precursores de PSE pero no hacia el piruvato (ver Figura 1.10). Además, no debe descartarse que parte de los



azúcares reductores medidos por nosotros haya tenido su origen en otros polisacáridos.

Cuando ambas cepas se cultivaron en GN 1,  $\Delta P22$  produjo una muy baja cantidad de PSE en comparación con USDA 110, en concordancia a lo ya descrito por Parniske *et al.* (1993) en medios de composición semejante. En ambas cepas el C fue preferentemente canalizado hacia la síntesis de PHB, pero  $\Delta P22$  produjo significativamente más cantidad de PHB que USDA 110 (Tabla 4.2). Esto indica que tal como se sugirió anteriormente las vías metabólicas de biosíntesis de PSE y PHB pueden competir por el C excedente pero sólo en aquellas condiciones en las que es posible la acumulación de acetyl CoA.

## **CAPÍTULO V**

### **LA ALTA RELACIÓN C/N MEJORA LA EFICIENCIA DE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE PREINFECCIÓN E INFECCIÓN**

## **Introducción**

En los capítulos anteriores mostramos que en nuestra condición de cultivo de *B. japonicum* en GN 0 los rizobios se encuentran limitados intracelularmente en N. Esta condición se reconoce por la falta de represión de GS I, y la inducción de la actividad de GS II, en respuesta al aumento en la relación C/N intracelular. Dicha relación C/N es captada por el sistema de dos componentes NtrBC, que modifica la expresión de varios genes además de los involucrados en la actividad GS (Martin *et al.*, 1988; Reitzer, 1996b). De esta manera, el metabolismo celular sufre varias modificaciones en su adaptación a la situación de limitación de N, y en el caso presente de una bacteria que realiza una simbiosis fijadora de N<sub>2</sub> con una leguminosa, podría esperarse que parte de las mismas se reflejen en las etapas tempranas de la interacción, también referidas como preinfección e infección.

Dos clases de moléculas constituidas por carbohidratos juegan papeles importantes en estas etapas tempranas: el factor Nod, que está implicado en la organogénesis del nódulo (I.5.5), y los polisacáridos de superficie: LPS y PSE, que participan en la adsorción de los rizobios a la superficie radical y su posterior invasión a través de los hilos de infección (sección I.5.3). En los experimentos descritos en el Capítulo IV hemos observado que la limitación de N conduce a importantes cambios en la acumulación de carbohidratos totales. En particular, hemos observado que en esas condiciones los rizobios acumularon mayor cantidad de PSE que los rizobios con suficiencia de N. Si bien los posibles cambios en la producción de factor Nod deberían ser indistinguibles con la metodología empleada por nosotros debido a la baja concentración de esta molécula señal, ciertas evidencias permiten suponer que también deberían observarse cambios en su biosíntesis y exportación (Wang y Stacey, 1990)

Tanto el desarrollo del nódulo como la adsorción e infección son aspectos clave en la interacción temprana que conduce a la simbiosis fijadora de N<sub>2</sub>. Es en estas etapas donde se producen las diferencias cuantitativas que dan por resultado una mayor o menor infectividad y competitividad. Por lo tanto, es posible, en principio, que una condición fisiológica como la limitación de N, que conduce a una mayor producción de carbohidratos totales, se refleje también en aumentos cuantitativos en estas etapas. En este capítulo hemos evaluado estas etapas de la preinfección y en particular hemos analizado cómo la limitación de N afecta la infectividad de *B. japonicum*.

## **Resultados y Discusión**

### **V.1. Evaluación de etapas clave de preinfección en cultivos de rizobios limitados en N**

Los eventos preliminares a la formación del nódulo comienzan cuando la planta libera flavonoides específicos en sus exudados radiculares, que son reconocidos por el rizobio e inducen en éste la expresión de los genes *nod*. El primero que se induce de estos genes es *nodD1*. En *B. japonicum* este gen es inducible y autorregulable, a diferencia del resto de los rizobios en los cuales se expresa constitutivamente. La proteína codificada por el gen *nodD1* es un regulador positivo y junto con el isoflavonoide específico de soja (genisteína) inducen la transcripción de los otros genes *nod*, como por ejemplo el operón *nodYABC*. Una pregunta que surge del estudio de la inducción de los genes *nod* es ¿cómo se afecta esta expresión por el N?. Dusha *et al.* (1989) reportaron que la expresión de los genes de nodulación *nodABC* y *nodD3* en *S. meliloti* es reprimida por altas cantidades de  $\text{NH}_4^+$ , a través de un sistema que involucra los genes *ntrA* y *ntrC*. En *B. japonicum* también se sabe que altas concentraciones de  $\text{NH}_4^+$  en el medio de cultivo inhiben la inducción de *nodD* y consecuentemente, *nodY* (Wang and Stacey, 1990), pero por un sistema independiente de la regulación por parte de las proteínas NtrC y NifA. Inmediatamente surge la siguiente pregunta ¿Qué ocurre con la inducción de los genes *nod* cuando los rizobios están limitados en N? Con este fin hemos estudiado el nivel de expresión de una fusión cromosomal *nodC::lacZ* en *B. japonicum* en cultivos de 5 y 14 días en GN 0, GN 0,1 y GN 1. La expresión del gen *nodC* fue inducida mediante la incubación de los cultivos con genisteína 2  $\mu\text{M}$  de durante 12-14 horas.

En la Tabla 5.1 se muestran los resultados obtenidos y podemos observar que si bien todos los cultivos fueron inducidos, el nivel de inducción resultó mucho más alto en el cultivo de 5 días en GN 0 y muy pequeño en el cultivo de 14 días en GN 1. Dentro de los cultivos jóvenes (5 días) se observó una mayor inducción en el de GN 0 y una inducción semejante entre los de GN 0,1 y GN 1, en paralelo con las diferencias observadas para el nivel de limitación de N expresado a través de la actividad GS (Tabla 3.1). Dentro de los cultivos viejos (14 días) también podemos destacar que el nivel de inducción de *nodC* correlacionó con el nivel de limitación de N (Tabla 3.1) dado que en GN 0 y GN 0,1 la inducción de los genes *nod* fue similar y mayor que en GN 1. Estos

resultados sugieren la existencia de una relación entre la capacidad de expresión de los genes *nod* y la relación C/N intracelular. Sería de interés establecer si dicha relación está mediada por el sistema NtrBC, como fue informado en *S. meliloti* (Wang y Stacey, 1990; Dusha *et al.*, 1993).

**Tabla 5.1.** Inducción de una fusión cromosomal *nodC::lacZ* en *B. japonicum* Bjl 10-573 con genisteína, expresada en unidades Miller (media  $\pm$  D.S.).

Edad (días)	Medio de cultivo	Actividad $\beta$ -galactosidasa (unidades Miller)	
		sin genisteína	con genisteína
5	GN0	110,3 $\pm$ 18,4	1.673,6 $\pm$ 18,4
5	GN0,1	105,6 $\pm$ 22,2	605,5 $\pm$ 27,8
5	GN1	75,2 $\pm$ 6,8	629,0 $\pm$ 61,5
14	GN0	83,3 $\pm$ 5,5	594,4 $\pm$ 150,0
14	GN0,1	66,7 $\pm$ 6,7	682,2 $\pm$ 103,3
14	GN1	77,8 $\pm$ 10,0	121,1 $\pm$ 13,3

Los rizobios se cultivaron hasta dos edades con diferentes contenidos de fuente de N y se incubaron con genisteína 2  $\mu$ M durante 12-14 horas, luego fueron permeabilizados con cloroformo y SDS, y la actividad  $\beta$ -galactosidasa fue cuantificada midiendo la absorbancia a 574 nm, utilizando rojo de clorofenol-galactopiranosido (CPRG) como sustrato. La actividad específica se expresó en Unidades Miller.

Una explicación alternativa para la escasa inducción en el cultivo de 14 días en GN 1 sería que la mayor biomasa presente provocó una represión de *nodC* a través de la actividad de la bradióxetina sobre *nolA* (Figura 1.4). Sin embargo, la concentración celular en dicho cultivo aún está por debajo de la requerida para que se dispare este sistema de percepción del quórum (Loh *et al.*, 2002).

El otro evento temprano importante en el establecimiento de la simbiosis es la adsorción de los rizobios a las raíces y su posterior infección (para más detalles ver secciones I.5.3 y I.5.4). Se sabe que la lectina de la semilla de soja (SBL) estimula específicamente la adsorción

bacteriana a las raíces, además de la infectividad y competitividad (Lodeiro *et al.*, 2000). Dado que el sitio de unión de SBL a la superficie bacteriana se encuentra en el CPS (Bhuvanewari *et al.*, 1977), podríamos suponer que una aumentada producción de CPS resulte en un mayor efecto estimulador de la adsorción de los rizobios a la raíz mediado por SBL.

Para observar si hay un aumento en la unión de SBL a las superficies de los rizobios limitados en N y si esta aumentada unión conduce a una mayor estimulación de la adsorción cultivamos rizobios en GN 0; GN 0,1 o GN 1 durante 5 y 14 días, con los que posteriormente observamos la unión de SBL y el efecto de esta lectina sobre la adsorción. Para determinar la unión de SBL a los rizobios, los incubamos durante 30 minutos en solución de Fåhraeus con SBL marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y determinamos el porcentaje de células fluorescentes por recuento en una cámara de Neubauer (Bhuvanewari *et al.*, 1977). Con el fin de observar el efecto de SBL sobre la adsorción de los distintos cultivos de rizobios incubamos en paralelo las células provenientes de cada cultivo durante 12 horas con SBL no marcada y calculamos el índice de adsorción.

Por un lado, se observó un alto nivel de unión de SBL a las células del cultivo joven limitado en N (Tabla 5.2), mientras que por el otro, los cultivos de 14 días en GN 0 y GN 0,1 mostraron un nivel de unión intermedio. Este orden se correlacionó bien con los niveles de CPS medidos en esas condiciones (Tabla 4.1) excepto que los cultivos jóvenes en GN 0 tenían menos CPS que los de 14 días en GN 0 y GN 0,1. De acuerdo a Bhuvanewari *et al.* (1977), la composición del CPS se modifica al pasar de fase exponencial a estacionaria, disminuyendo la proporción de O-acetil-galactosa y aumentando la de O-metil-galactosa. Dado que el primer componente es reconocido con más afinidad por SBL, su unión a CPS de bacterias en fase exponencial es mayor (Bhuvanewari *et al.*, 1977). Así, el mayor contenido de CPS total en el caso de los cultivos de GN 0 y GN 0,1 de 14 días en relación al cultivo joven podría haber sido compensado por su menor riqueza en O-acetil-galactosa.

En cuanto a la adsorción a las raíces de soja, sólo los rizobios de cultivos jóvenes en GN 0 y GN 0,1 pudieron ser estimulados. Los cultivos de 5 días en GN 0 presentaron un incremento del 276% del índice de adsorción por la preincubación con SBL, mientras que los de GN 0,1 mostraron un incremento del 58,3%. Por su parte, en los cultivos de 14 días en GN 0 y GN 0,1 se observó una disminución del índice de adsorción a casi la mitad cuando fueron preincubados con lectina. Con

los cultivos en GN 1 tanto de 5 o 14 días no se observaron diferencias en la adsorción. La falta de estimulación en los cultivos viejos no parece guardar relación con la unión de SBL.

**Tabla 5.2.** Unión de la lectina de soja a *B. japonicum* LP 3001 y estimulación de éste para la adsorción a raíces de soja, con cultivos de dos edades en medios con diferentes concentraciones de fuente de N<sup>a</sup>.

Edad (días)	Medio de cultivo	Células fluorescentes (%) <sup>a</sup>	Índice de adsorción (%A) ± SD <sup>b</sup>		Estimulación (%E)
			sin lectina	con lectina	
5	GN0	27,0 (262)	0,25 ± 0,04	0,94 ± 0,12	276,0
5	GN0,1	1,5 (303)	0,24 ± 0,04	0,38 ± 0,06	58,3
5	GN1	1,5 (305)	0,33 ± 0,06	0,27 ± 0,03	—
14	GN0	6,5 (395)	0,61 ± 0,19	0,30 ± 0,08	—
14	GN0,1	8,5 (483)	0,48 ± 0,08	0,26 ± 0,04	—
14	GN1	0,7 (706)	0,11 ± 0,03	0,12 ± 0,03	—

<sup>a</sup>Para la unión de lectina, los rizobios se incubaron con 60 µg de lectina marcada con FITC ml<sup>-1</sup> por lo menos 30 min. El total de las células contadas se da entre paréntesis.

<sup>b</sup>Para la estimulación de la adsorción, los rizobios se incubaron en solución de Fåhraeus con o sin 10 µg de lectina ml<sup>-1</sup> durante 12 horas.

Tomados en conjunto, estos resultados señalan que la escasez de N en el medio de cultivo condiciona a los rizobios para una manifestación incrementada en etapas claves de preinfección siempre y cuando se trate de rizobios de cultivos jóvenes. En todos los casos los cultivos de fase estacionaria en GN 1 fueron los menos reactivos tanto al flavonoide inductor de los genes *nod* como a la SBL. Este mismo comportamiento podría ocurrir en inoculantes preparados con medios ricos y almacenados por más de 15 días, en los cuales el estado fisiológico de los rizobios se asemejaría al de la fase estacionaria y donde además la represión de la expresión de los genes *nod* por efectos de percepción del quórum podrían tener lugar.

## **V.2. Estudios de infectividad**

La infectividad se define como una capacidad intrínseca de los rizobios para penetrar las raíces y producir nódulos. De este modo, se excluye de esta noción a las infecciones abortivas. Por otra parte, aunque la definición alcanza sólo a los rizobios, no se excluyen las modificaciones que éstos experimentan como consecuencia de algún factor producido por la planta, como p. ej. lectinas o flavonoides.

La infectividad tiene pues como prerequisites a la adsorción de los rizobios a las raíces y la biosíntesis y liberación del factor Nod ya que sin ellos la formación de hilos de infección y nódulos no son posibles. Por lo tanto, puede decirse que si bien no la garantiza, una aumentada eficacia en estas actividades bacterianas es requerida para una mayor infectividad.

Según hemos observado, la escasez de N estimula estas etapas de preinfección, y por lo tanto puede esperarse que la infectividad de los cultivos también se vea incrementada por efecto de una alta relación C/N durante el crecimiento de los rizobios. Nuestro siguiente objetivo fue entonces evaluar qué ocurre en esta etapa de la simbiosis para lo cual utilizamos la metodología desarrollada por Bhuvanewari *et al.* (1980). Esta metodología se basa en la existencia de una única zona infectable al momento de la inoculación. Dicha zona es la comprendida entre la punta de la raíz (PR) y la zona de los pelos emergentes más pequeños (PEMP, véase Figura 1.7) de modo tal que no pueden producirse infecciones en la zona de los pelos radiculares maduros. Se cree que esta imposibilidad está relacionada con la incapacidad de deformación de dichos pelos. Dado que esta zona (también llamada “ventana de infección”) se va corriendo a medida que la raíz crece y se desarrolla, cuanto más tarde ocurren las infecciones, más lejos de la base de la raíz aparecerán los nódulos. Así, será más infectivo aquel cultivo de rizobios que dé origen a una mayor concentración de nódulos en las zonas “altas” de la raíz y ello puede observarse en diagramas de frecuencia del número de nódulos en función de su posición a lo largo de la raíz. Esta posición suele expresarse en unidades relativas de distancia (URD) para compensar las diferencias de longitud entre raíces individuales (para una discusión detallada de la metodología, véanse sección II. 3.2 y Bhuvanewari *et al.*, 1980).



### V.2.1. Infectividad en relación con la edad del cultivo y la disponibilidad de N

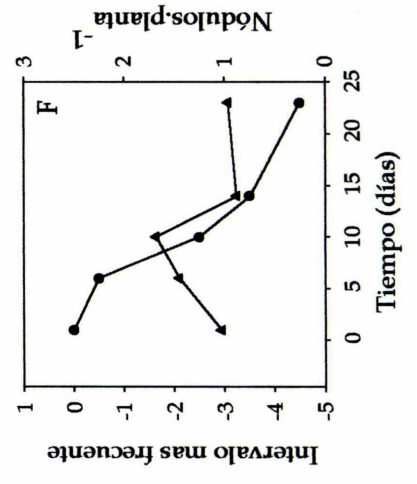
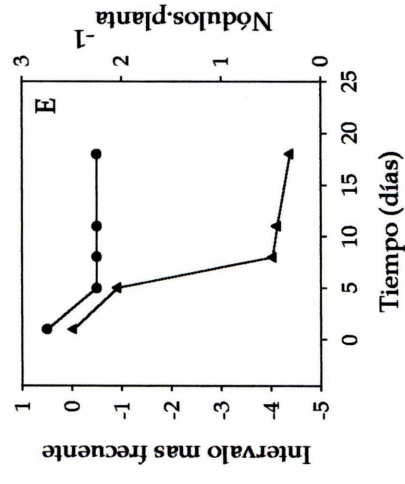
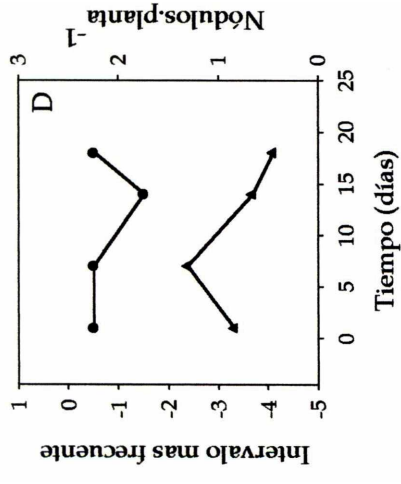
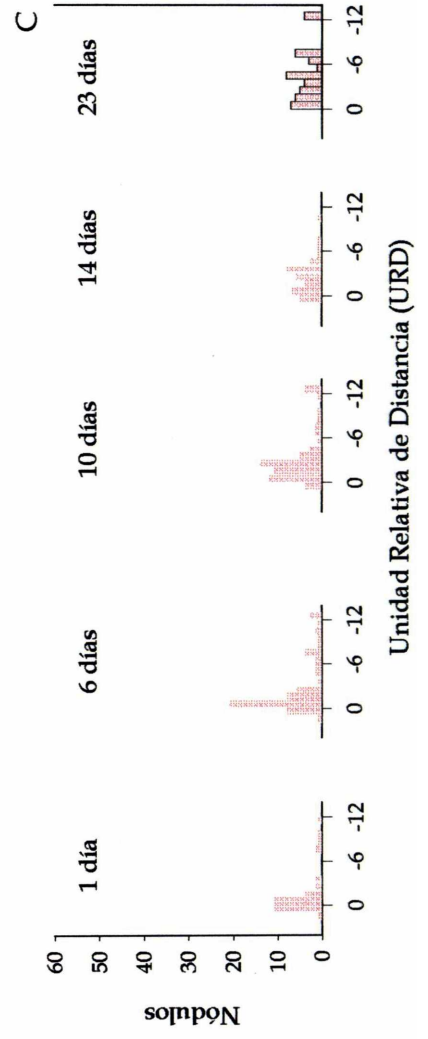
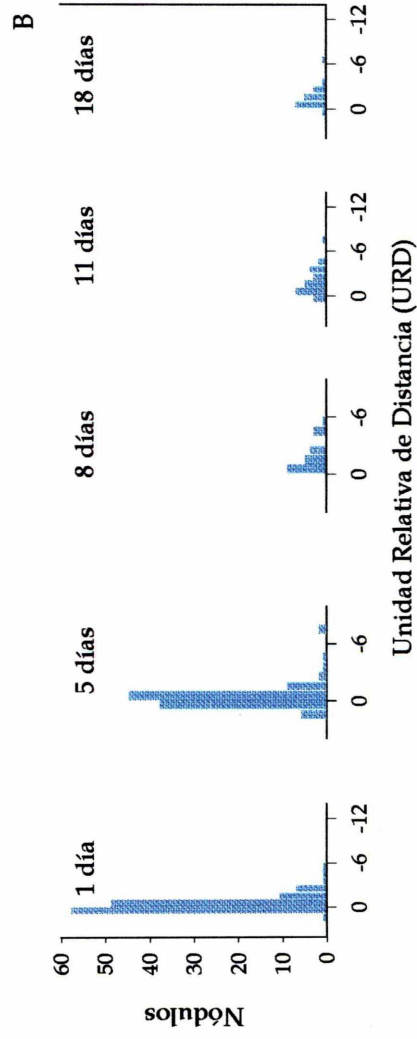
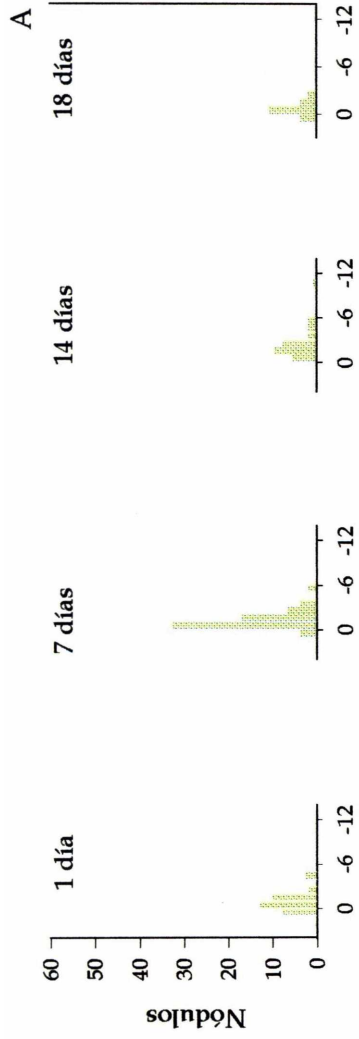
Estudios previos habían demostrado que la infectividad depende de la edad del cultivo, siendo los cultivos jóvenes en general los más infectivos (Bhuvanewari *et al.* 1983). Con el fin de observar la relación entre la edad, la limitación de N y la infectividad, se realizaron tres ensayos independientes, uno para cada nivel de la fuente de N (medios GN 0; GN 0,1 y GN 1). Para ello se eligieron cinco estadios de crecimiento distintos (Figura 3.1): uno de fase temprana (1 día de crecimiento) en el que los rizobios se encuentran en plena adaptación al cambio en la disponibilidad de N, otro de fase logarítmica en el que todos los cultivos están adaptados, y creciendo a la máxima velocidad, otro de fase logarítmica tardía, donde los rizobios ya comienzan a encontrarse limitados por la fuente de N, un cuarto estadio que representa la fase estacionaria temprana y por último un estadio característico de la fase estacionaria tardía, donde se verifican diferentes niveles de descenso en la viabilidad.

Para las tres condiciones se observó una mayor proporción de nódulos en la zona que se encontraba infectable al momento de la inoculación en las plantas que fueron inoculadas con los cultivos jóvenes, apareciendo más acentuada esta tendencia para los cultivos en medios escasos en la fuente de N. (Figura 5.1 A, B, C). También pudimos observar que los cultivos en GN 0 y en GN 0,1 a medida que envejecieron fueron formando menos nódulos pero con una frecuencia de distribución similar a lo largo de la raíz principal a la de los cultivos jóvenes (Figura 5.1 D, E). En cambio, los cultivos en GN 1 presentaron, a medida que envejecían, un comportamiento diferente al de los rizobios cultivados bajo escasez de la fuente de N. Por un lado, el número de nódulos no disminuyó tanto y por el otro, la frecuencia de distribución de estos nódulos a lo largo de la raíz principal se desplazó hacia zonas más jóvenes de la raíz a medida que los cultivos entraron en fase estacionaria (Figura 5.1 F).

---

Figura 5.1. (en página siguiente). Infectividad de *B. japonicum* 3001 cultivada en los medios GN 0 (A y D), GN 0,1 (B y E) y GN 1 (C y F) hasta distintos estadios de crecimiento. En A, B y C las posiciones de todos los nódulos de la raíz principal fueron medidos en relación a la posición de la punta raíz al momento de inocular, que es el valor 0. Los valores negativos representan regiones de la raíz inexistentes al momento de la inoculación. En D, E y F se muestra el intervalo de distancias donde aparecen los nódulos más frecuentemente (círculos) y el número de nódulos totales (triángulos) en relación con la edad del cultivo.

---



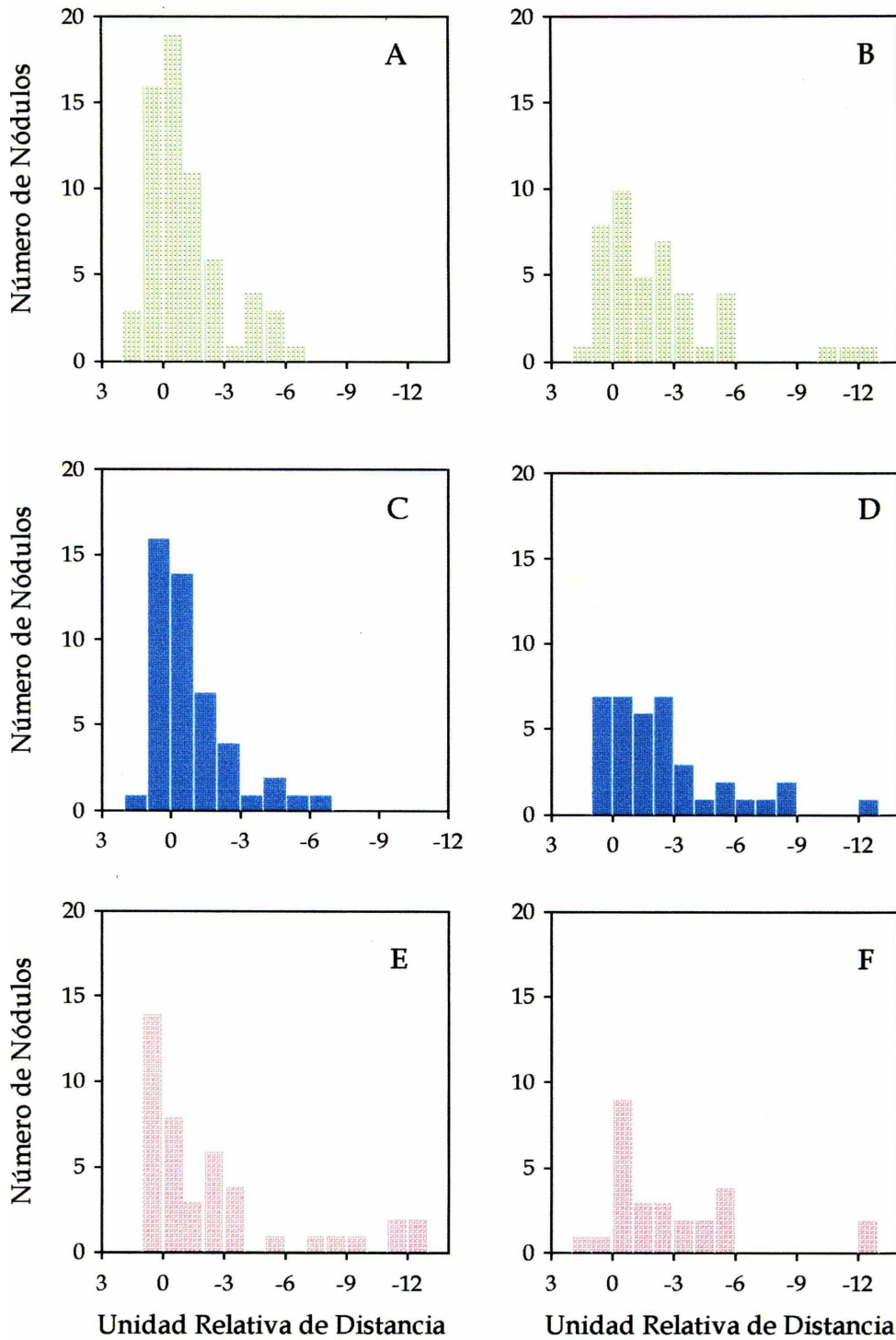
Estos resultados indican una diferencia de comportamiento entre los rizobios cultivados con escasez de N respecto de los cultivados con suficiencia en N. En el primer caso, la proporción de bacterias capaces de formar nódulos debe haberse ido reduciendo a medida que envejecían pero conservando esas pocas bacterias la misma infectividad que las jóvenes. En el segundo, los rizobios al envejecer debieron haber ido perdiendo infectividad requiriendo de un condicionamiento en la rizósfera para volver a adquirirla. Esto concuerda con el estado inducido de los genes *nod* y la capacidad de unir SBL de los cultivos de 14 días en GN 0 y GN 0,1 a diferencia de los de GN 1 que no se mostraron reactivos a estos factores (Tablas 5.1 y 5.2).

Teniendo en cuenta que los distintos niveles de las fuentes de N se ensayaron en experimentos independientes, se efectuó otro ensayo comparando cultivos de 5 y 14 días de edad para cada condición en forma simultánea. Se observó que los cultivos jóvenes en los medios GN 0 y GN 0,1 presentaron una mayor infectividad comparada con los cultivos en GN 1 para el mismo estadio. La misma tendencia mostraron los cultivos crecidos hasta fase estacionaria, siendo más infectivas aquellas provenientes de GN 0 y GN 0,1 (Figura 5. 2). En este experimento también se confirmó que, dentro del mismo medio, los cultivos jóvenes son más infectivos que los de fase estacionaria.

### **V.2.2. Infectividad en relación con la síntesis de PSE**

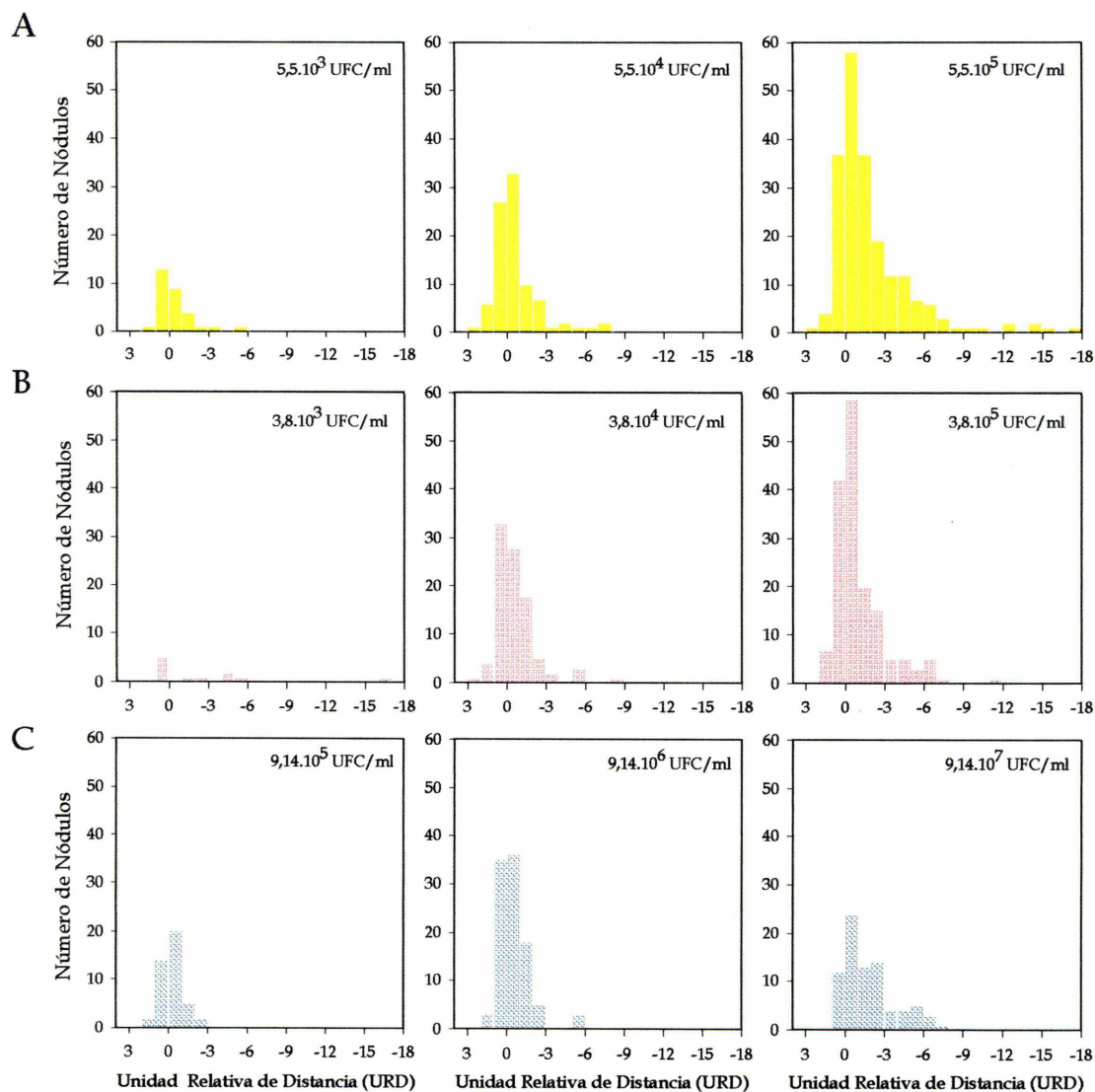
Los aumentos de infectividad observados en los experimentos precedentes podrían explicarse, entre otros fenómenos, a través de la mayor inducción de los genes *nod* (Tabla 5.1) o por efectos provocados por la mayor biosíntesis de PSE (Tabla 4.1) ya sea en forma directa o a través de la estimulación por SBL (Tabla 5.2). Para determinar el posible rol de los PSE estudiamos en nuestras condiciones la infectividad de la cepa  $\Delta P22$  (*exoB*<sup>-</sup>) que ha sido caracterizada como poco infectiva y competitiva debido al EPS anormal que forma (Parniske et al., 1993). El comportamiento de esta cepa se comparó con la parental USDA 110 en los medios GN 0 y GN 1 en cultivos jóvenes, dado que en esta fase de crecimiento presentan su máxima infectividad (Figuras 5.1 y 5.2).

En primer lugar se realizó una serie de experimentos con diferentes concentraciones de inóculos de las cepas *B. japonicum* LP 3001, USDA 110 y  $\Delta P22$  cultivadas en GN 1 hasta fase logarítmica (Figuras 5.3 A, B y C) con el fin de establecer rangos de concentraciones que nos permitieran



**Figura 5.2.** Infectividad de *B. japonicum* en fase logarítmica (A, C, E) o estacionaria (B, D, F) cultivadas en GN 0 (A, B), GN 0,1 (D, E) o GN 1 (E, F). La distribución de los nódulos a lo largo de la raíz principal fue medida en relación a la posición de la punta de la raíz al momento de inocular, que es el valor 0. Los valores negativos representan regiones de la raíz inexistentes al momento de la inoculación.

detectar cambios de infectividad con cada cepa. Observamos que para la cepa  $\Delta P22$  esta concentración es del orden de  $10^7$  UFC.ml<sup>-1</sup> y para la cepa USDA 110,  $1.10^4$  UFC.ml<sup>-1</sup>, corroborando la muy baja infectividad de la cepa mutante respecto de su parental .



**Figura 5. 3.** Infectividad de las cepas LP 3001 (A), USDA 110 (B) y  $\Delta P22$  (C) en GN 1 en relación con el tamaño del inóculo (indicado en el margen superior de cada gráfico). La distribución de los nódulos a lo largo de la raíz principal fue medida en relación a la posición de la punta de la raíz al momento de inocular, que es el valor 0. Los valores negativos representan regiones de la raíz inexistentes al momento de la inoculación.

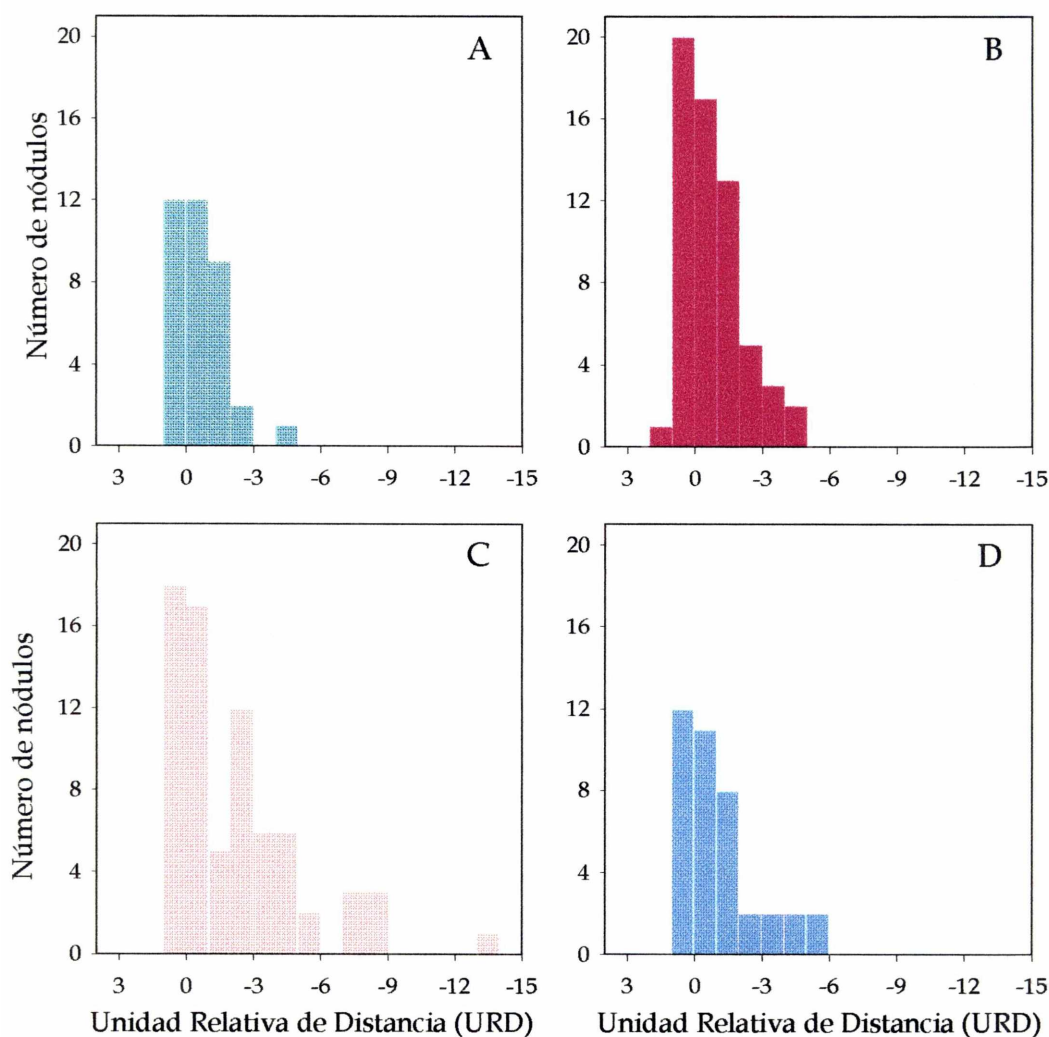
Con estas concentraciones se comparó el efecto de la limitación de N sobre la infectividad, por un lado con la cepa USDA 110 y por el otro con la  $\Delta P22$ . Pudimos observar con la cepa salvaje un pequeño aumento de infectividad para el cultivo en GN 0, reflejado en los valores de las distancias promedio del nódulo más alto a PR, que fueron de  $-0,27$  y  $-0,82$  UDR para los rizobios en GN 0 y GN 1 respectivamente. Además, puede observarse en la Figura 5.4.A que si bien el cultivo en GN 0 formó menos nódulos, éstos se concentraron en las proximidades de la zona donde se encontraba PR al momento de la inoculación. Esta distribución es similar a la observada previamente con la cepa LP 3001 con cultivos jóvenes (Figura 5.2 A, E). Por su parte, la cepa  $\Delta P22$  también mostró un aumento en la infectividad cuando se la cultivó en GN 0. Este aumento tuvo una tendencia similar a la de la cepa USDA 110, puesta de manifiesto en que las distancias promedio del nódulo más alto a PR fueron de  $-0,20$  para el cultivo en GN 0 en comparación con un valor de  $-0,97$  para el cultivo en GN 1. Esto puede observarse también en la aparición de un mayor número de nódulos alrededor de PR con el cultivo en GN 0 (Figura 5.4.B). No obstante, debe tenerse presente que el pequeño aumento en la infectividad alcanzado por  $\Delta P22$  limitada en N se logró gracias a la inoculación de un elevado número de bacterias en cada raíz en comparación con las utilizadas para la cepa salvaje.

La menor infectividad observada con la cepa  $\Delta P22$  corrobora resultados previos de Parniske *et al.* (1993). Esta menor infectividad se vio reflejada en que para obtener números similares de nódulos por encima de PR se requirió de inóculos cien a mil veces más concentrados de la cepa  $\Delta P22$  que de la USDA 110 (Figura 5.3). Aún así, la infectividad de  $\Delta P22$  se vio incrementada por la limitación de N (Figura 5.4.B). Anteriormente, observamos un aumento en la inducción de *nodC* en cultivos jóvenes limitados en N, y lo mismo debería ocurrir en la cepa  $\Delta P22$ , lo que en parte podría explicar la mayor infectividad de los cultivos limitados en N. Sin embargo, Parniske *et al.* (1994) demostraron que este mismo mutante induce un aumento en la actividad quitinasa de la planta. Esta enzima es capaz de hidrolizar el factor Nod rindiendo productos inactivos (Stahelin *et al.*, 1994). Por lo tanto, el aumento de infectividad observado no puede atribuirse sólo a este hipotético aumento en la síntesis de factor Nod por parte de los cultivos limitados en N.

El aumento de la actividad quitinasa en plantas de soja inoculadas con  $\Delta P22$  forma parte de una respuesta de defensa. Esta respuesta también incluye aumentos en la concentración de una fitoalexina como la gliceolina en los exudados radiculares. No se sabe si estas respuestas de



defensa se deben al EPS defectuoso producido por este mutante. De ser así, una mayor producción de dicho EPS en GN 0 debería exacerbar la respuesta de defensa. Sin embargo, nosotros observamos lo contrario, ya que la limitación de N incrementó la infectividad de estos rizobios mutantes. Puesto que es dudoso que esto sólo se deba a un efecto de concentración de factor Nod deberíamos suponer que, o bien no es el propio EPS el que dispara la respuesta de defensa de la planta sino otro elicitador que a su vez sería enmascarado por el EPS normal, o bien que el EPS producido bajo limitación de N sea diferente, con menor actividad como elicitador.



**Figura 5.4.** Infectividad de USDA 110 y  $\Delta P22$  en fase logarítmica cultivadas en GN 0 (A y B) o GN 1 (C y D). La distribución de los nódulos a lo largo de la raíz principal fue medida en relación a la posición de la punta de la raíz al momento de inocular, que es el valor 0. Los valores negativos representan regiones de la raíz inexistentes al momento de la inoculación.

Estas hipótesis podrían corroborarse observando la cantidad de factor Nod sintetizado por la cepa  $\Delta P22$ , su estabilidad frente a quitinasas de soja, la estructura de los PSE producidos por la cepa mutante en GN 0 y GN 1 y sus actividades como elicitores de respuestas de defensa en plantas de soja.

Los resultados presentados en este capítulo mostraron varias influencias positivas de la limitación de N en *B. japonicum* sobre su simbiosis con las plantas de soja. La inducción del gen *nodC* combinada con el aumento de la producción de PSE, su actividad de unión de SBL y la estimulación de la adsorción bacteriana a la raíz, sugieren que la mayor infectividad de los cultivos jóvenes limitados en N puede deberse tanto a una más eficiente penetración de la raíz como a una más rápida inducción del desarrollo de los nódulos.

Estas mejoras en los estadios tempranos de preinfección e infección podrían aprovecharse en la formulación de inoculantes más eficaces desde el punto de vista de su competitividad para la formación de nódulos.



## **CAPÍTULO VI**

### **COMPETITIVIDAD DE LOS RIZOBIOS PARA LA NODULACIÓN DE SOJA: EFECTO DEL ESTADO METABÓLICO Y DE LA POSICIÓN**

## **Introducción**

La competición entre dos cepas de rizobios es un proceso bastante complejo y depende de muchas variables, tanto bióticas –como por ejemplo: predadores, antagonistas, mutualistas, además de los rizobios competidores– como abióticas –por ejemplo: pH del suelo, nutrientes, temperatura, salinidad, concentraciones inadecuadas de iones. Para mejorar la competitividad de los inoculantes frente a las poblaciones naturalizadas en los suelos (véanse páginas 7 y 8 ) se han utilizado varias estrategias, por ejemplo la preparación de inoculantes con cepas seleccionadas y/o mejoradas genéticamente, o el desarrollo de cultivares capaces de ser nodulados selectivamente por cierto grupo de cepas presentes en el inoculante y no por otros a los que pertenece la población del suelo, o inoculantes que por su formulación hagan que los rizobios del inoculante sean más competitivos (para una revisión véase Sadowski y Graham, 1998). Nosotros hemos demostrado que en los rizobios cultivados con una alta relación C/N se mejoran las interacciones tempranas con las raíces de soja. Por lo tanto sería esperable que rizobios crecidos en estas condiciones sean capaces de ocupar los primeros nódulos aún en presencia de poblaciones competidoras. Dado que estos nódulos tempranos ejercen un control por retroalimentación del número total de nódulos, y que por otro lado suelen ser los fijadores de N<sub>2</sub> más activos, es posible que un logro de este tipo permita mejorar el porcentaje de Nda. Ello sería posible si los rizobios limitados en N fueran más competitivos.

En este Capítulo estudiamos los efectos de la limitación de N sobre la competitividad y analizamos si las mejoras logradas por la limitación de N se traducen en aumentos en la ocupación de nódulos en competición con rizobios de una población similar a la existente en el suelo.

## **Resultados y Discusión**

### **VI.1. Competición para la nodulación en relación con el nivel de la fuente de N durante el crecimiento del inóculo bacteriano**

Para determinar si el mejor comportamiento simbiótico observado en los cultivos limitados en N se traduce en una mayor competitividad, se coinocularon rizobios provenientes de dos medios de cultivo diferentes en macetas que contenían plántulas de soja y posteriormente, se cuantificó el grado en que cada uno ocupó los nódulos. Para distinguir de qué tratamiento provenían los rizobios ocupantes de cada nódulo, se utilizaron cepas isogénicas marcadas con diferentes resistencias a antibióticos. Dichas cepas eran LP 3001 (Sp<sup>r</sup>) y LP 3004 (Sm<sup>r</sup>), las que poseen igual capacidad competitiva (Lodeiro, 1994). Para realizar estos ensayos se prepararon mezclas de los rizobios competidores, que se distribuyeron en forma homogénea en macetas conteniendo vermiculita estéril (Figura 6.1). En este ensayo se evaluó la competitividad en dos grados diferentes de intensidad, uno suave con baja concentración de los competidores y otro intenso con mayor concentración.

Pudimos observar que cualquiera sea el inóculo de los rizobios cultivados en GN 0 éstos siempre fueron más competitivos que los de GN 0,1 o de GN 1. Por otra parte, los rizobios cultivados en GN 0,1 ocuparon significativamente más nódulos que los rizobios cultivados en GN 1 sólo en la condición de competición más intensa (Tabla 6.1). Así, hemos puesto de manifiesto tres grados de competitividad diferentes: uno fuerte para los cultivos en GN 0, otro intermedio para los de GN 0,1 y uno débil para los correspondientes a GN 1.

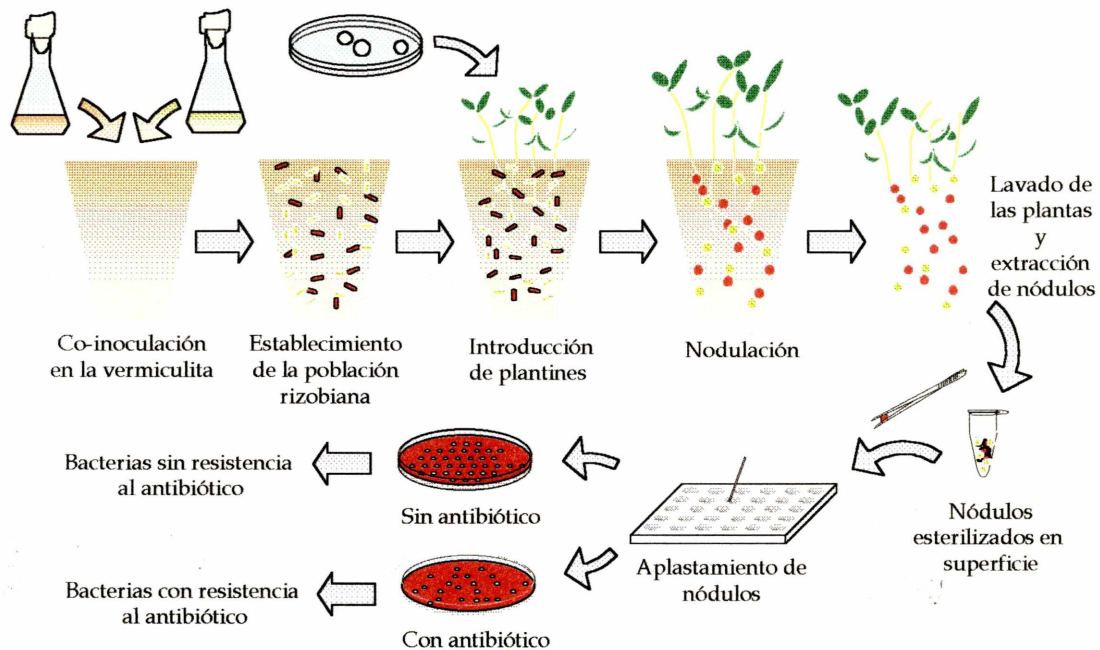
Si tomamos en conjunto los datos obtenidos hasta ahora, podemos correlacionar la eficiencia de los rizobios para llevar a cabo las distintas etapas de preinfección-infección y competitividad, con la intensidad de limitación de N intracelular, observada mediante la actividad GS, y la dirección del flujo de biosíntesis de polímeros ricos en C. De esta manera, la limitación severa de N en los cultivos –puesta de manifiesto por el aumento de la actividad total GS– indujo una mayor expresión de *nodC*, una mayor unión de SBL y mayor estimulación de la adsorción a raíces en concordancia con una mayor biosíntesis de PSE. Todo ello condujo a una mayor tasa de infectividad y competitividad. En el caso de los rizobios con suficiencia de N –con baja actividad total de GS– tanto la inducción de la expresión de *nodC*, como la unión de SBL y la estimulación para la

adsorción fueron las más bajas coincidiendo con la menor producción de PSE; todo esto dio como resultado los rizobios menos infectivos y competitivos. Por su parte, los rizobios cultivados con una escasez intermedia de la fuente de N mostraron un comportamiento intermedio. Cuando se cultivaron hasta fase exponencial se asemejaron a los no limitados en su actividad GS y en su expresión de *nodC* como así también en su baja unión de SBL, mientras que para la acumulación de PSE y la inducción de la adsorción su comportamiento fue más parecido a los de GN 0. Cuando se cultivaron hasta fase estacionaria se comportaron en todos estos aspectos de forma muy similar a los de GN 0. En concordancia con todo ello, la infectividad y la competitividad de los rizobios cultivados en los tres medios siguió el orden GN 0 > GN 0,1 > GN 1. Estas correlaciones permiten sugerir que la limitación metabólica de N otorga una mayor eficiencia a las etapas tempranas de la simbiosis de *B. japonicum* con las raíces de soja.

**Tabla 6.1.** Competición para la ocupación de nódulos (%) entre cepas isogénicas de *B. japonicum* LP 3001 y LP 3004 cultivadas hasta fase logarítmica en los medios GN 0, GN 0,1 o GN 1 e inoculadas en mezclas 1:1 en plantas de soja.

Ensayo de Competición Medio de crecimiento bacteriano e inóculo	Ocupación de Nódulos
GN 0 ( $3,1 \cdot 10^4$ ) vs GN 0,1 ( $1,6 \cdot 10^4$ )	1,6 : 1
GN 0 ( $5,8 \cdot 10^5$ ) vs GN 0,1 ( $8,0 \cdot 10^5$ )	1,5 : 1
GN 0 ( $3,1 \cdot 10^4$ ) vs GN 1 ( $1,7 \cdot 10^4$ )	2,6 : 1
GN 0 ( $5,8 \cdot 10^5$ ) vs GN 1 ( $7,8 \cdot 10^5$ )	1,8 : 1
GN 0,1 ( $1,1 \cdot 10^4$ ) vs GN 1 ( $1,7 \cdot 10^4$ )	1,1 : 1
GN 0,1 ( $3,5 \cdot 10^5$ ) vs GN 1 ( $7,8 \cdot 10^5$ )	2,3 : 1

No se observaron nódulos en los controles sin inocular. Los nódulos provenientes de controles inoculados con una sola cepa para cada medio y fase de crecimiento dieron 100% de ocupación por rizobios resistentes al antibiótico correspondiente. Los resultados fueron analizados por análisis de varianza. Las relaciones de 1,5:1 o mayores fueron estadísticamente diferentes que las 1:1, con  $P < 0,01$ .



**Figura 6.1.** Ensayo de competición para la nodulación entre dos cepas de *B. japonicum* marcadas diferencialmente. Ambas cepas se inoculan juntas en una maceta que contiene vermiculita, de manera tal que queden uniformemente distribuidas. Luego se siembran plántulas de soja de tres días de crecimiento, y al cabo de 20-30 días se recogen los nódulos. Estos nódulos se esterilizan superficialmente, se maceran con palillos estériles y se siembran en placas de Petri réplicas (cada una con el antibiótico selectivo). Finalmente se contabilizan los crecimientos de los nódulos en cada placa y relacionando el número de nódulos ocupados por una cepa en comparación con la otra se tiene una medida de la competitividad de cada una.

## **VI.2. Crecimiento y persistencia de *B. japonicum* en vermiculita**

El logro alcanzado en la eficiencia simbiótica con el cultivo de los rizobios en un medio con alta relación C/N podría aprovecharse en la elaboración de inoculantes más eficaces en la ocupación de nódulos frente a los rizobios naturalizados en el suelo.

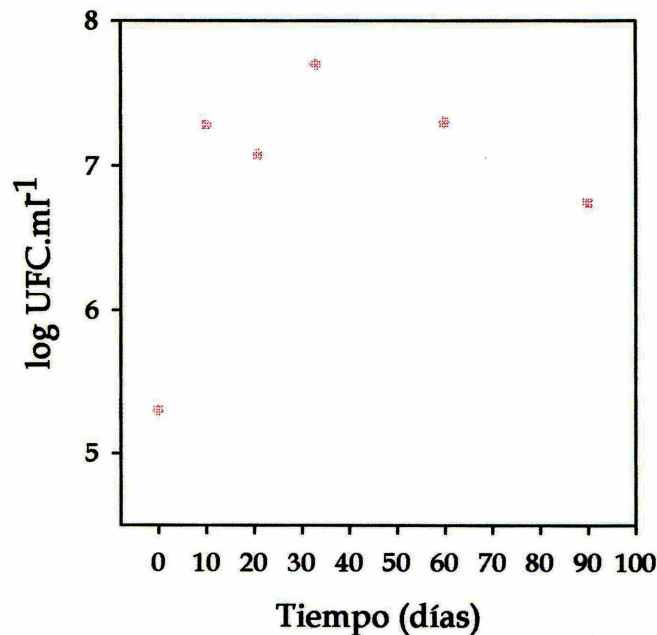
Teniendo en cuenta que la población de rizobios naturalizados en los suelos agrícolas se encuentra en un ambiente en el cual no sólo es escaso el N sino también otros nutrientes, y conociendo la alta competitividad que poseen, podríamos especular que si dicha competitividad depende en

alguna medida de la escasez de nutrientes, la mejora observada por nosotros en cultivos con escasez de N no sea suficiente para lograr aumentar la ocupación de nódulos por las cepas inoculadas.

Por otra parte, el tamaño de las poblaciones en el suelo puede o no experimentar modificaciones en el tiempo. Se sabe que durante la colonización rizosférica dicho tamaño aumenta varios órdenes de magnitud, mientras que en el suelo no rizosférico –que ha sido definido por Meeting, (1993) como un “desierto de nutrientes”– experimenta pocas modificaciones. Así, el estado fisiológico de estas poblaciones podría asemejarse en el primer caso a la fase de crecimiento exponencial y en el segundo, a la estacionaria, que según hemos visto difieren grandemente en sus capacidades de asociación con la raíz. Es incierto todavía si el momento en que ocurre la infección es anterior, simultáneo o posterior a la colonización rizosférica (véanse páginas 22, 23 y 24), con lo cual no podemos predecir si la población del suelo será más o menos infectiva que los rizobios provenientes de un inoculante preparado en las condiciones de limitación de N que hemos definido como óptimas.

Para estudiar esta problemática, es necesario utilizar un sistema de laboratorio en el cual se simule la distribución y la posible situación fisiológica de esta población de rizobios naturalizados. Con este objetivo, utilizamos vermiculita ya que es un sustrato neutro, comúnmente empleado para realizar cultivos hidropónicos de plantas, y que presenta una aireación y retención de agua similares a las del suelo, pero sin la influencia de ninguna otra variable biótica o abiótica. Para establecer las poblaciones se distribuyeron los rizobios en forma homogénea en macetas con vermiculita, las cuales se incubaron luego durante un período prolongado. En primer lugar, decidimos evaluar las posibles variaciones del tamaño y la viabilidad de la población en la vermiculita con el tiempo. Así, establecimos cultivos de  $1,0 \cdot 10^5$  bacterias. $\text{ml}^{-1}$  de la cepa *B. japonicum* LP 3004 ( $\text{Sm}^r$ ) y tomamos muestras de las macetas inmediatamente después de la inoculación y luego a los 10, 21, 33, 60 y 90 días. Observamos que ya a los 10 días las UFC. $\text{ml}^{-1}$  habían aumentado dos órdenes de magnitud con respecto al momento de la inoculación, alcanzando las  $1,0 \cdot 10^7$  bacterias. $\text{ml}^{-1}$ ; esta población se mantuvo durante los siguientes 40 días, para luego decaer hasta  $6,0 \cdot 10^6$  bacterias. $\text{ml}^{-1}$  y estabilizarse a esa densidad aún hasta los 90 días (Figura 6.2). Los datos sugieren que los rizobios crecen en la vermiculita a una velocidad de  $0,7 \text{ día}^{-1}$ , similar a la velocidad de  $1,2 \text{ día}^{-1}$  observada en el medio líquido de Götz (ver Capítulo III). Sin embargo, esta población en la vermiculita tiene

una supervivencia significativamente superior a la de bacterias cultivadas en medio líquido con o sin antibióticos (Figura 3.2).



**Figura 6.2.** Crecimiento y persistencia de *B. japonicum* LP 3004 en vermiculita con solución de Fåhraeus. El número de células viables se estimó por recuento en placa a partir de muestras obtenidas de la vermiculita a distintos tiempos. Para detalles sobre el método de obtención de las bacterias véase sección II. 3.3 del Capítulo II.

Esto indica que el estado fisiológico que presentan las bacterias en la vermiculita no se puede describir como alguno de los estados que tienen en el cultivo líquido, aunque podría semejarse más a la fase estacionaria de crecimiento.

El comportamiento y viabilidad de los rizobios en la vermiculita mostró que un período de 30 días es suficiente para establecer la población puesto que ya ha transcurrido un tiempo considerable como para que la población bacteriana deje de crecer siendo aún elevado el número de rizobios viables. Por esta razón, de aquí en más realizamos los ensayos de competición con poblaciones incubadas durante este período de tiempo. Así, al referirnos a “poblaciones establecidas en la vermiculita” haremos referencia a rizobios incubados durante 30 días en este sustrato.

### **VI.3. Competitividad frente a una población establecida en la vermiculita**

Para observar si la limitación de N conduce a un aumento en la capacidad competitiva de *B. japonicum* frente a una población establecida, rizobios LP 3001 cultivados en los distintos medios descritos anteriormente, se inocularon sobre plántulas de soja sembradas en macetas conteniendo una población establecida de LP 3004. El experimento se inició con la inoculación de  $1,2 \cdot 10^5$  bacterias  $\cdot \text{ml}^{-1}$  en las macetas con vermiculita como se describió anteriormente, las que se incubaron en el invernáculo durante un mes. Se observó que luego de dicho período, la población había aumentado dos órdenes de magnitud con respecto al cultivo original alcanzando las  $1,4 \cdot 10^7$  UFC. $\text{ml}^{-1}$  de solución retenida en la vermiculita, resultado que concuerda con el obtenido en el experimento de la Figura 6.2. Terminado el período de 30 días, se sembraron tres plantines de soja en cada maceta, e inmediatamente se inoculó cada plántula con 1 ml de un cultivo de la cepa LP 3001, con una concentración aproximada de  $1 \cdot 10^8$  UFC. $\text{ml}^{-1}$ . Los rizobios utilizados para inocular las semillas fueron cultivados en GN 0, GN 0,1 o GN 1 durante 5 o 14 días. Las macetas se dejaron 20 días en el invernáculo y luego se extrajeron los nódulos y se analizó su contenido.

En todos los casos la cepa 3004 ocupó más del 66% de los nódulos (incluyendo doble ocupación), no observándose diferencias estadísticamente significativas en la ocupación de los mismos por la cepa 3001 entre las distintas condiciones de crecimiento de los inóculos. (Tabla 6.2).

Este resultado ofrece al menos dos interpretaciones no excluyentes: 1. las bacterias establecidas en la vermiculita poseen una condición fisiológica que las hace más competitivas que las bacterias provenientes de cultivos en medio líquido, cualesquiera sea la composición de éste o la fase de crecimiento del inóculo; 2. la posición de las bacterias establecidas y distribuidas uniformemente en la vermiculita les confiere una ventaja decisiva frente a una inoculación practicada sobre la semilla (Mc Dermott y Graham, 1989), independientemente de la capacidad infectiva del inóculo empleado.



**Tabla 6.2.** Porcentaje de ocupación de nódulos por la cepa *B. japonicum* 3001 cultivada en GN 0, GN 0,1 o GN 1 durante 5 y 14 días de crecimiento, frente a la cepa *B. japonicum* 3004 establecida en la vermiculita.

Medio	Días	UFC.ml <sup>-1</sup> inoculadas	Ocupación de nódulos LP 3001:LP 3004	Nódulos planta <sup>-1</sup> media ± SD
GN 0	5	3,2.10 <sup>8</sup>	0,2 : 1	6,0 ± 3,0
GN 0	14	1,3.10 <sup>8</sup>	0,2 : 1	6,6 ± 2,5
GN 0,1	5	2,6.10 <sup>8</sup>	0,4 : 1	6,7 ± 2,9
GN 0,1	14	4,1.10 <sup>8</sup>	0,2 : 1	5,0 ± 2,5
GN 1	5	1,7.10 <sup>8</sup>	0,2 : 1	6,7 ± 2,3
GN 1	14	7,1.10 <sup>8</sup>	0,5 : 1	8,8 ± 2,9

No se observaron nódulos en los controles sin inocular. Los nódulos provenientes de controles inoculados con una sola cepa para cada medio y fase de crecimiento dieron 100% de ocupación por rizobios resistentes al antibiótico correspondiente. La ocupación de nódulos fue significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre las dos cepas para cada una de las condiciones de cultivo pero no dentro de cada cepa, para distintas condiciones de cultivo.

#### **VI.4. Estimación de las contribuciones del estado fisiológico y la posición de los rizobios de la población establecida en su competitividad**

Para determinar si existe alguna ventaja fisiológica o posicional en la población establecida en la vermiculita, se extrajeron rizobios de la misma e inmediatamente se mezclaron con rizobios provenientes de cultivos líquidos para preparar una mezcla homogénea. Luego se inocularon plántulas de soja y se observó la ocupación de nódulos por cada cepa. Este dato se comparó con la ocupación de nódulos obtenidos de plantas de soja previamente sembradas en macetas cuya población establecida no había sido perturbada, las que inmediatamente fueron inoculadas sobre las semillas (Figura 6.3). Si la ventaja en la competitividad se debe a un estado fisiológico particular de las bacterias en la vermiculita podríamos esperar que no haya cambios en su competitividad cuando se extraigan

los rizobios y se reinoculen a macetas nuevas, ya que ese estado fisiológico no debería modificarse sustancialmente en el corto tiempo (aproximadamente 1 hora) que transcurre durante la operación. Por el contrario, si la posición de los rizobios juega un papel importante para la competición, al desbaratarla este efecto se perdería por completo.

Para el ensayo se inocularon macetas con una población de LP 3004 como se explicó anteriormente (pag. 94), pero luego de treinta días la vermiculita de tres macetas se suspendió en solución de Fåhrens y se sometió a un sonicado suave para remover los rizobios. Luego la vermiculita fue decantada y una alícuota del sobrenadante se utilizó para realizar recuento de UFC.ml<sup>-1</sup>. A la suspensión restante se le añadió una cantidad equivalente de UFC.ml<sup>-1</sup> de la cepa LP 3001 cultivada hasta fase logarítmica en GN 0,1. Se eligió esta condición dado que era la más competitiva que al mismo tiempo permitió tener la densidad celular adecuada en el cultivo iniciador, a diferencia de GN 0 que si bien daba bacterias más competitivas no siempre permitía obtener cultivos suficientemente densos. Para evitar efectos diferenciales debido al sonicado, las bacterias LP 3001 provenientes del cultivo en GN 0,1 fueron sonicadas en las mismas condiciones que las obtenidas de la vermiculita previo a su mezcla. Dicha mezcla se utilizó para inocular macetas que tenían vermiculita nueva y estéril a las que inmediatamente se les transfirió plantines de soja germinados. Este método de inoculación sobre macetas lo abreviaremos IV (inoculación en vermiculita). Como comparación, en otro grupo de tres macetas donde se mantuvo la población de LP 3004 sin perturbar, se transfirió las plántulas y se las inoculó sobre las semillas con 1 ml de un cultivo de LP 3001 en GN 0,1 hasta fase logarítmica conteniendo 2,0.10<sup>8</sup> bacterias.ml<sup>-1</sup>. Este método de inoculación se referirá como IS (inoculación en semilla). Se llevaron todas las macetas al invernáculo y al cabo de 20 días se efectuó el recuento de nódulos para observar la ocupación de los mismos por cada cepa.

Se observó que en las macetas donde la población establecida no fue perturbada, ésta ocupó el 83% de los nódulos, mientras que en las macetas que fueron inoculadas con una suspensión mixta de LP 3001 cultivada en GN 0,1 y LP 3004 extraída de la vermiculita sólo el 25 % de los nódulos fueron ocupados por la cepa LP 3004 (Tabla 6.3). Este resultado demuestra por un lado, que las bacterias LP 3004 de la población de la vermiculita eran menos competitivas *per se* que las LP 3001 cultivadas en GN 0,1 (Tabla 6.3) y por el otro que la dominancia en la ocupación de nódulos por parte de las primeras (Tablas 6.2 y 6.3) se debe a que su posición juega un papel decisivo.

**Tabla 6.3.** Porcentaje de ocupación de nódulos por la cepa *B. japonicum* 3001 (Sp<sup>r</sup>) cultivada en GN 0,1 hasta 5 días de crecimiento, frente a la cepa *B. japonicum* 3004 (Sm<sup>r</sup>) establecida durante 30 días en la vermiculita, con dos métodos diferentes de inoculación.

Método de Inoculación <sup>a</sup>	UFC.ml <sup>-1</sup> inoculados		Ocupación de nódulos <sup>b</sup> LP 3001 : LP 3004	Nódulos planta <sup>-1</sup> media ± SD
	LP 3001	LP 3004		
A LP 3001 (IS) LP 3004 (IV)	2,0.10 <sup>8</sup>	1,0.10 <sup>7</sup>	0,2 : 1	5,7 ± 2,7
B LP 3001 y LP 3004 (IV)	2,0.10 <sup>6</sup>	8,0.10 <sup>6</sup>	3,0 : 1	9,1 ± 3,4

<sup>a</sup>En el método A, la cepa LP 3001 cultivada en GN 0,1 hasta 5 días fue inoculada sobre semillas de soja (IS) que estaban colocadas en macetas conteniendo una población de LP 3004 establecida durante un mes en la vermiculita (IV). En el método B, el cultivo de LP 3001 GN 0,1 y la población de LP 3004 extraída de la vermiculita fueron mezcladas en Fåhraeus e inoculadas en macetas con vermiculita estéril y nueva que contenían los plantines de soja.

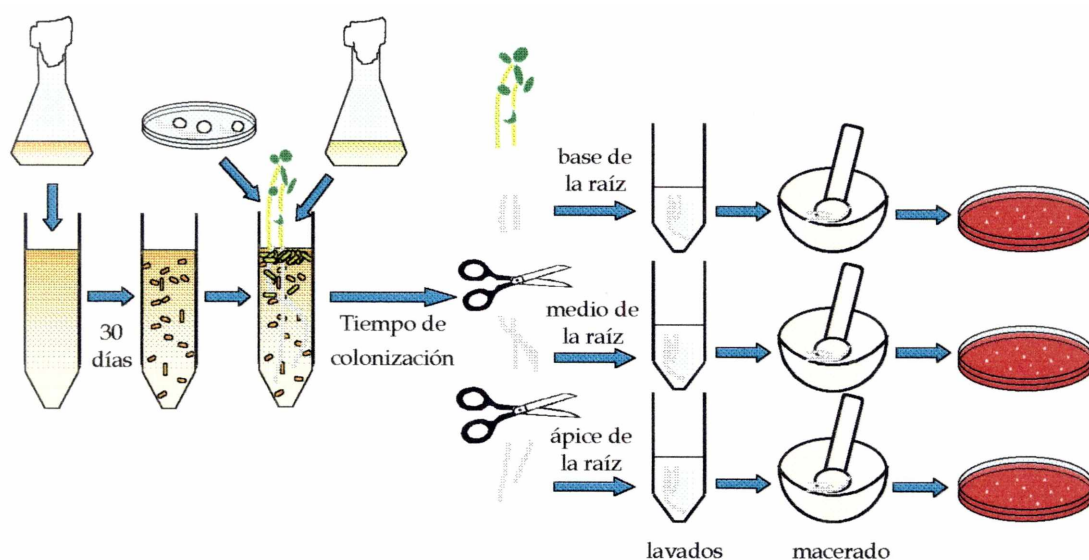
<sup>b</sup>Los nódulos provenientes de controles inoculados con una sola cepa dieron 100% de ocupación por rizobios resistentes al antibiótico correspondiente. Los controles no inoculados no presentaron nódulos. Las diferencias entre cepas y dentro de LP 3001 inoculada con los métodos A y B fueron significativas con  $p < 0,05$ .

### **VI.5. Colonización de raíces de soja por *B. japonicum***

El efecto posicional observado podría estar relacionado con una escasa movilidad vertical de los rizobios en el perfil y su ubicación alrededor de la raíz (Sadowsky y Graham, 1998). La colonización efectiva de las raíces por los rizobios parece depender de factores que promuevan el movimiento de las partículas de suelo, tales como la labranza, la acción de las lombrices, o bien que los rizobios sean transportados por el agua de percolación (Madsen y Alexander, 1982), pero la contribución de la movilidad bacteriana por sí misma parece escasa (Mc Dermott y Graham, 1989). Así, los rizobios inoculados en las semillas permanecerían concentrados alrededor de las mismas y encontrarían dificultades para alcanzar las zonas infectables de las raíces en desarrollo, que se alejan del punto de

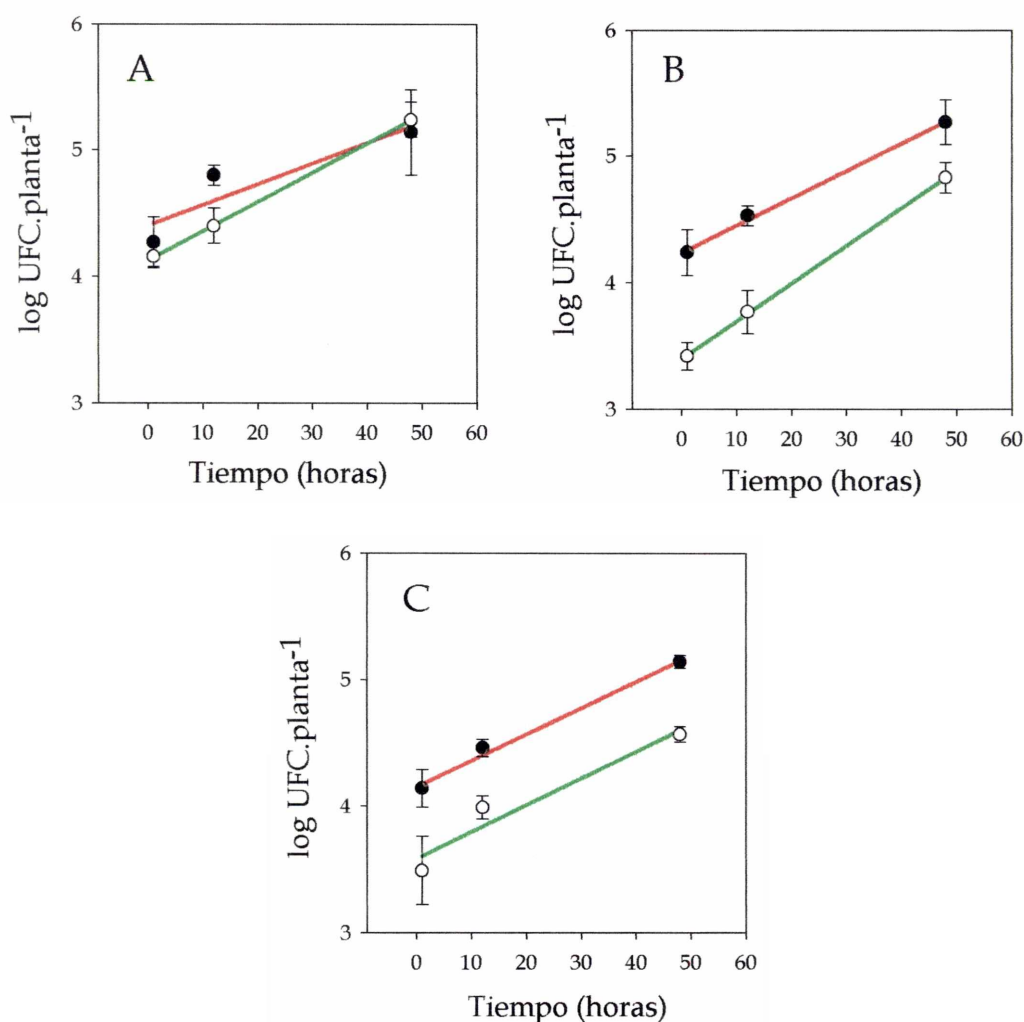
inoculación.

Para evaluar la movilidad vertical de los rizobios en nuestras condiciones, observamos la distribución de un inoculante a diferentes profundidades en la vermiculita y a lo largo de la raíz en presencia de una competidora establecida con anterioridad. Para ello, se estableció una población de *B. japonicum* LP 3004 en la vermiculita como ya se describió. Luego se sembraron plantines de soja de tres días de edad e inmediatamente se inoculó 1 ml de una suspensión de  $1 \times 10^8$  UFC. $\text{ml}^{-1}$  de un crecimiento en GN 0,1 de la cepa *B. japonicum* LP 3001 sobre la semilla de cada plantín. A 1; 12 y 48 horas desde la inoculación con LP 3001 se retiraron 18 plantines por tiempo de muestreo y se eliminaron por lavado las bacterias débilmente unidas (Lodeiro y Favelukes, 1999). A continuación se estimó el número de bacterias de cada cepa que colonizaban los tercios basal, medio y apical de cada raíz (Figura 6.4).



**Figura 6.4.** Ensayo de colonización de rizobios establecidos vs. inoculados a raíces de soja. Se estableció en tubos con vermiculita una población de LP 3004 durante 30 días. Luego se sembraron plantines a los que inmediatamente se los inoculó con una suspensión de LP 3001. Se tomaron muestras de raíces de plantas a 1, 12 y 48 horas, se dividieron en tres partes iguales (basal, medio y apical), se las lavó superficialmente y se las maceró, plaqueándose en cajas de Petri réplica con YEM y el antibiótico correspondiente.

Efectivamente, los rizobios inoculados sobre las semillas colonizaron las zonas infectables de la raíz (tercios medio y apical) en menor número que los rizobios establecidos en la vermiculita en todos los tiempos de muestreo (Figura 6.5). Estos resultados corroboran las observaciones previas de Mc Dermott y Graham (1989) sobre la escasa movilidad vertical de los rizobios a lo largo de la raíz y junto con los presentados en la sección anterior ponen en duda la eficacia de la tecnología de la inoculación sobre semillas tal como es utilizada actualmente.



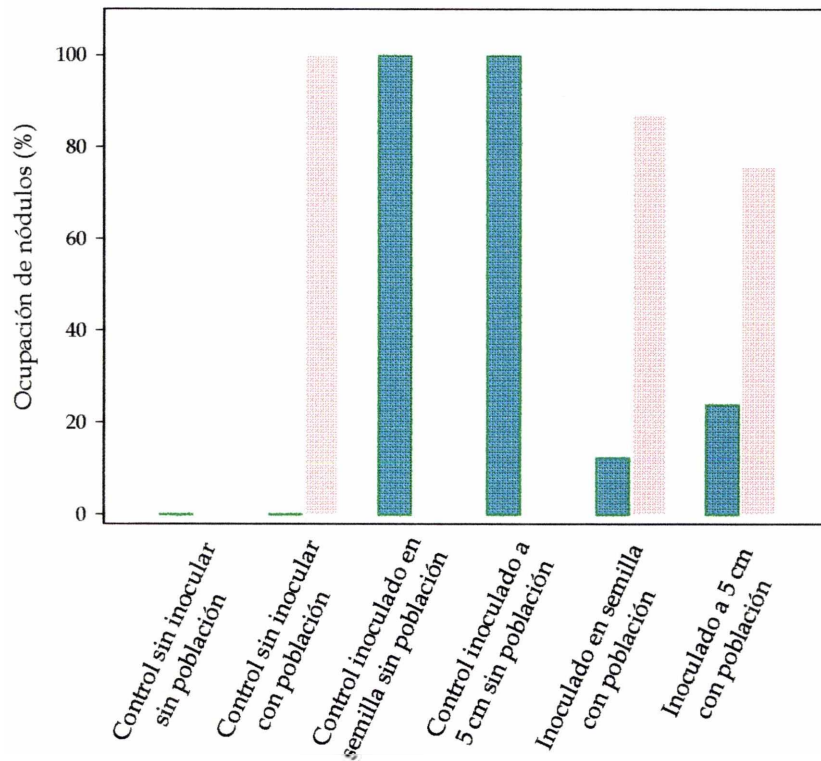
**Figura 6. 5.** Colonización de las raíces principales por *B. japonicum* LP 3001 inoculadas sobre semillas (símbolos vacíos) o *B. japonicum* LP 3004 establecida en la vermiculita (símbolos llenos) a diferentes tiempos (1, 12 y 24 horas) después de la plantación e inoculación, en el tercio basal (A), medio (B), o apical (C) de la raíz.



**VI.6. Inoculación en profundidad**

Los resultados anteriores presentados en las tablas 6.2 y 6.3 y Figura 6.5 nos indica que es indispensable mejorar la distribución del inoculante alrededor de la raíz para poder aprovechar el comportamiento superior de los rizobios limitados en N. Una alternativa a la inoculación de semillas de soja es utilizar inoculantes líquidos o granulados colocados en el surco de siembra cerca o debajo de la semilla (Smith, 1992). Para ver si esta metodología disminuye los efectos adversos de la posición, comparamos la competitividad de un cultivo colocado a 5 cm de profundidad por debajo de las semillas, con la del mismo cultivo inoculado sobre las semillas.

Para llevar a cabo este objetivo, se estableció una población en vermiculita y luego de 30 días se sembraron semillas de soja, como describimos anteriormente, inoculadas de dos maneras diferentes: la tradicional, es decir las semillas embebidas en el inoculante líquido, o bien el mismo inoculante colocado en profundidad. Se estimó la ocupación de nódulos por las dos cepas.



**Figura 6.6.** Porcentaje de ocupación de nódulos de rizobios establecidos (barras de color verde) vs. inoculados (barras de color rosado). Las diferencias entre los porcentajes de ocupación de nódulos por parte de LP 3001 con los dos métodos de inoculación fueron significativas con  $p < 0,01$ .

Se observó que los rizobios inoculados en profundidad ocuparon en promedio un 24,1 % de los nódulos frente a los establecidos; mientras que los inoculados sobre semillas ocuparon sólo un 12,5 % (Figura 6.6).

Estos resultados muestran que la inoculación en profundidad puede mejorar sustancialmente la ocupación de los nódulos por la cepa inoculada y así podría evitarse el problema posicional en situaciones de competición con poblaciones naturalizadas.

## **CAPÍTULO VII**

**MEJORA EN LA OCUPACIÓN DE  
NÓDULOS POR LA INOCULACIÓN EN  
PROFUNDIDAD EN UN SUELO CON  
POBLACIÓN NATURALIZADA DE  
RIZOBIOS NODULADORES DE SOJA**



## **Introducción**

Los ensayos de laboratorio mostrados anteriormente han puesto de manifiesto que la posición de los rizobios de las poblaciones establecidas en el suelo puede ser el factor determinante de su competitividad frente a los inoculantes aplicados sobre semillas, y que la inoculación en profundidad puede permitir obtener un aumento en la ocupación de los nódulos por parte de las bacterias del inoculante. Este resultado es alentador en el sentido de su aplicación directa para solucionar el problema de la competición en los cultivos de soja. Sin embargo, en el campo existen otros factores involucrados en la competitividad, y así los efectos logrados en el laboratorio pueden no traducirse directamente a un aumento similar en la ocupación de los nódulos, que finalmente conduzca a aumentos de rendimiento y calidad. Entre las numerosas variables que pueden influir en la competitividad a campo se destacan las siguientes:

- La composición, textura y estructura de los distintos suelos, que pueden modificar la unión de las bacterias a las partículas del mismo y su asociación en microcolonias, biofilms y otros agregados microbianos.
- La biodiversidad presente en las poblaciones del suelo aumenta la probabilidad de que existan genotipos más competitivos que la cepa del inoculante. Esto difiere de las condiciones ensayadas en el laboratorio en las cuales las dos cepas eran isogénicas y con igual capacidad intrínseca para la competición.
- Los rizobios inoculados en el suelo pueden sufrir el ataque de los predadores, a diferencia de las bacterias inoculadas en las macetas.
- Los rizobios distribuidos en el surco de siembra pueden sufrir la desecación y además pueden quedar expuestos a los rayos ultravioleta, con lo cual la viabilidad de las bacterias del inoculante podría verse afectada.

Así, es necesario poner a prueba las mejoras obtenidas en el laboratorio con un ensayo a campo para evaluar si las mismas se siguen manteniendo en presencia de las variables mencionadas, con el fin de fundamentar la validez de la alternativa tecnológica que se propone.

## **Resultados y Discusión**

### **VII.1. Comparación de la inoculación en semilla con la inoculación en profundidad en un suelo sujeto a monocultivo de soja**

El ensayo que se describe a continuación se realizó en Marcos Juárez en un suelo Argiudol típico de textura franco limosa sometido a monocultivo de soja. Se sembró el 18 de diciembre de 2002 con soja cv Don Mario 4800 empleando una sembradora experimental a chorro de 4 surcos. Se probaron tres tratamientos diferentes: 1- soja sin inocular, 2- soja inoculada sobre semilla y 3- soja inoculada en la línea de siembra a 5 cm de profundidad por debajo de la semilla, con las semillas sembradas en todos los casos a 5 cm de profundidad. Se distribuyó en bloques al azar con 6 repeticiones por tratamiento. El inoculante utilizado fue la cepa *B. japonicum* LP 3007 (Sp<sup>r</sup>/Sm<sup>r</sup>) cultivada en el medio de Evans, comúnmente utilizado en la fabricación de inoculantes (Evans *et al.*, 1970). Este medio fue reformulado para elevar su relación C/N (Tabla 7.1). Luego de que el cultivo alcanzara la fase exponencial se lo inoculó a turba estéril con una concentración final de  $1,0 \cdot 10^8$  UFC.g<sup>-1</sup> de turba.

Tabla 7.1. Composición del medio de Evans modificado con alta relación C/N.

Componente	Cantidad (g.l <sup>-1</sup> )
Manitol	12,00
NH <sub>4</sub> Cl	0,71
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,78
KCl	0,37
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,14
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,13
Ácido Cítrico	0,21
Oligoelementos*	
Vitaminas <sup>#</sup>	

\*Del medio de Evans (Brelles Mariño y Boiardi, 1996).

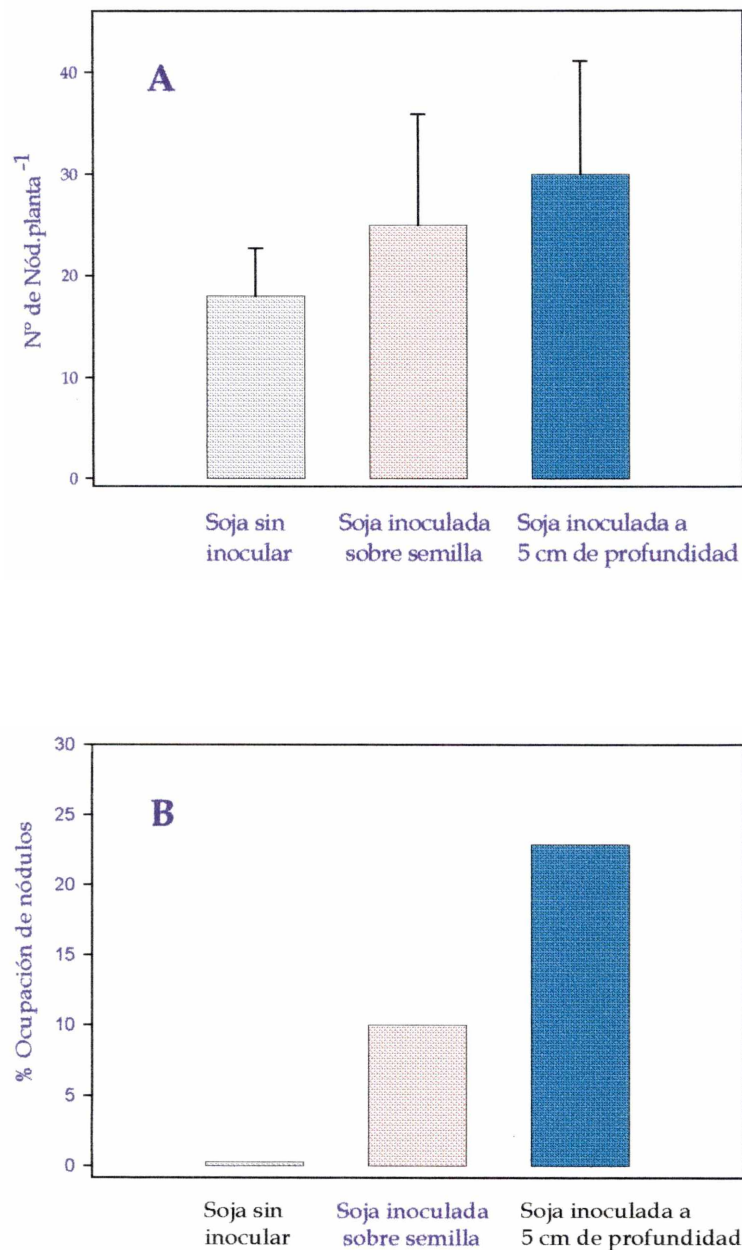
<sup>#</sup>Del medio de Götz (1982).

La inoculación en semillas se realizó con 4 g de inoculante en turba por kg de semilla en cada tratamiento, aplicando previamente 10 ml de agua azucarada al 10% a las semillas. Para la inoculación en el surco de siembra se marcó previamente con la máquina vacía los surcos y se aplicó en el suelo a razón de la misma proporción por parcela de inoculante que el aplicado en semilla, es decir se suspendió 4 g de turba en 1.200 ml de agua y se aplicó 200 ml de esta suspensión por parcela. El campo se dividió en parcelas de 2,8 m por 6,0 m, cada una de las cuales contenía cuatro surcos de 6,0 m distanciados a 0,7 m y se sembró con una densidad de 27 semillas.m<sup>-1</sup>.

A los dos meses se recogieron de cada bloque 10 plantas en estadio R1, se extrajeron los nódulos y se analizó su contenido. En total se procesaron 2.655 nódulos. También se procesaron muestras de suelo del ensayo obtenido de parcelas sin inocular para determinar el tamaño de la población de rizobios naturalizados. El número más probable (NMP) arrojó valores mayores a  $1 \times 10^4$  rizobios noduladores de soja.g<sup>-1</sup> de suelo para dicha población.

El número de nódulos totales no varió significativamente entre los distintos tratamientos (Figura 7.1 A). En cuanto a la ocupación de los mismos, se observó que en las parcelas testigo no inoculadas y que recibieron semillas sin inocular, todos los rizobios aislados de los nódulos de soja fueron sensibles a los dos antibióticos utilizados. Los rizobios inoculados en profundidad ocuparon en promedio un 22,9 % de los nódulos totales, mientras que los inoculados sobre semillas ocuparon sólo un 10,0 % siendo estas diferencias significativas con  $p < 0,01$  (Figura 7.1 B). Dado que para ambos métodos de inoculación se utilizó el mismo inoculante sobre turba –ya sea aplicado sobre la semilla o diluido en agua y aplicado en el surco – las diferencias sólo pueden atribuirse a la posición de los rizobios.

Al terminar el ciclo del cultivo, se determinó el rendimiento en grano, corrigiéndose por el contenido de humedad de cada muestra, y el contenido de nitrógeno en los granos. Se observó un pequeño aumento en el rendimiento en grano en las parcelas inoculadas en profundidad (Tabla 7.2). Si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas el aumento de rendimiento obtenido por la inoculación en profundidad triplicó al aumento obtenido por la inoculación sobre las semillas. Por su parte, el contenido de N en grano no varió significativamente (Tabla 7.2). Estos datos indican que la actividad fijadora de N<sub>2</sub> de la población del suelo y de la cepa del inoculante fueron similares.



**Figura 7.1.** Nodulación de la soja cv Don Mario 4800 inoculada con *B. japonicum* LP 3007 sobre semilla o en el surco, y sembrada en un suelo de Marcos Juárez. A: Promedio de nódulos por planta en cada tratamiento  $\pm$  SD. B: promedio de ocupación de los nódulos por la cepa LP 3007 (%). Los datos se sometieron a una transformación angular y se analizaron por análisis de varianza. La ocupación de nódulos entre el tratamiento inoculado sobre semilla y el inoculado en profundidad fueron significativamente diferentes con  $p < 0,01$ .

Actualmente el INTA recomienda utilizar en los inoculantes la cepa E109, debido a su alta capacidad de nodulación y fijación de N<sub>2</sub>. Por su parte la cepa USDA 110 y sus derivadas (E111, LP 3001, LP 3004 y LP 3007) no presentan tan buenas cualidades agronómicas, pero se la utilizó por estar bien caracterizada genéticamente (Kaneko *et al.*, 2002) y además por ser la empleada en todos nuestro estudios anteriores. Esto podría explicar la baja ocupación de nódulos en general y la baja respuesta en rendimiento y fijación de N. No obstante, el significativo aumento en la ocupación de nódulos obtenido gracias a la inoculación en profundidad permitiría esperar diferencias igualmente significativas en rendimiento y calidad si se utilizara una cepa más efectiva para la fijación de N<sub>2</sub> como por ejemplo E109.

**Tabla 7.2.** Rendimiento en grano de soja cv Don Mario 4800 inoculada con la cepa *B. japonicum* LP 3007 sobre las semillas o en el surco de siembra a 5 cm por debajo de las semillas.

Tratamiento	N en grano (%) ± SD	Rendimiento en grano (kg/Ha) ± SD	Aumento del Rendimiento (%)
Sin inocular	5,66 ± 0,32	3.040,0 ± 242,2	-
Inoculado sobre semilla	5,75 ± 0,19	3.102,0 ± 319,6	2,0
Inoculado en el surco	5,64 ± 0,26	3.235,4 ± 228,0	6,4

Estos resultados corroboran los presentados en el Capítulo VI, esta vez en presencia de todas las variables mencionadas en la introducción de este Capítulo. Asimismo, señalan la necesidad de extender estos estudios con ensayos similares en otras localidades e incluyendo a la cepa E109, además de la LP 3007.

Para que una metodología de este tipo se adapte a los cultivos de soja no es suficiente repetir la observación de que la inoculación en profundidad resulta en una mejora competitiva, sino que luego deberá ajustarse todo el sistema tecnológico a la siembra directa. Entre los ajustes que deberían hacerse se incluyen: 1. la maquinaria a utilizar para efectuar la inoculación en el surco teniendo en cuenta además la profundidad a la cual debe colocarse el inoculante, 2. la fluidez del mismo

para que sea correctamente dosificado en el surco, y 3. contemplar el agregado de algún aditivo que ayude a la sobrevivencia de los rizobios en el suelo. En cuanto a la maquinaria, existen sembradoras equipadas con distribuidores de fertilizantes, las cuales podrían ser adaptadas para realizar la inoculación en profundidad. En cuanto a los inoculantes, se han desarrollado formulaciones líquidas o granuladas para ser aplicadas en el suelo pero que actualmente no se comercializan en el mercado argentino. Este tipo de formulaciones podrían servir de base para la puesta a punto de la metodología que proponemos aquí.

## **CAPITULO VIII**

### **DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIÓN**

### **VIII.1. Discusión General**

Como parte de la microflora de los suelos agrícolas, a menudo los rizobios se encuentran limitados en uno o más nutrientes, y ésta es una condición señalada por algunas evidencias como posible favorecedora de su asociación simbiótica con las leguminosas. A este respecto, es sabido que el proceso de nodulación requiere suelos con bajos niveles de N combinado (como  $\text{NO}_3^-$  y  $\text{NH}_4^+$ ), razón por la cual se han realizado una gran cantidad de investigaciones sobre los efectos que la deficiencia o el exceso de este nutriente causa sobre diversas etapas de la simbiosis. (Wang y Stacey, 1990; Schubert, 1995; Brelles-Mariño y Boiardi, 1996; Matamoros *et al.*, 1999). Se ha estudiado abundantemente el bloqueo de la nodulación por parte de las plantas que crecen en presencia de fuentes de N combinado (principalmente  $\text{NO}_3^-$ ), y como resultado de estos trabajos se sabe hoy que las leguminosas poseen un sistema de control capaz de detectar la presencia de N combinado en la rizosfera y bloquear así la nodulación (para una revisión véase Streeter, 1988). Asimismo, la abundancia de fuentes de N disponible para el rizobio, o su cultivo en medios de baja relación C/N ha sido observada como inhibitoria de sus actividades de preinfección o de infección temprana (Dusha *et al.*, 1993; Kijne *et al.*, 1988; Wang y Stacey, 1990; Wall y Favelukes, 1991; Lodeiro, 1994; Brelles Mariño y Boiardi, 1996; Lucinski *et al.*, 2003). Dado que en la planta la escasez de N promueve la nodulación, es concebible que la limitación de N en los rizobios también tenga efectos positivos sobre su capacidad infectiva y no ejerza sólo un rol pasivo dejando de inhibirla. Sin embargo, pocos trabajos han encarado el efecto que la escasez de N puede tener sobre el cultivo de los rizobios, pese a su importancia básica y aplicada. Esta situación puede deberse en parte a la extraordinaria capacidad de los rizobios de sobrevivir y aún crecer en medios prácticamente desprovistos de nutrientes (Crist *et al.*, 1984), lo cual puede dificultar la identificación y demostración de una situación en donde la limitación en N efectivamente tenga lugar.

El estudio de los efectos de la escasez de N sobre el metabolismo y el comportamiento simbiótico de *B. japonicum* tiene importancia no sólo por su interés científico sino también por la posibilidad cierta de encontrar una aplicación tecnológica de este conocimiento. Si la limitación en N tiene efectos sobre la infección temprana y la competitividad de *B. japonicum* para la nodulación de soja, podría aprovecharse este efecto para mejorar la calidad de los inoculantes.



El cultivo de soja en Argentina ha adquirido un gran auge en los últimos tiempos, y en la actualidad hay más de 13,5 millones de Ha sembradas. Debido a esto, la producción de inoculantes para soja en nuestro país constituye una importante actividad biotecnológica entre las pymes nacionales. Sin embargo, la práctica de la inoculación está encontrando cada vez menos adeptos entre los agricultores debido al problema de la competencia, expuesto en el Capítulo I. Si pudiera superarse este problema, se daría un impulso importante al mencionado sector pyme, y además se contribuiría a la conservación del suelo, necesaria para una agricultura sustentable, ya que desde este punto de vista la biofertilización con rizobios es preferible al empleo de fertilizantes químicos.

De acuerdo a algunos estudios, para mejorar la capacidad infectiva de los rizobios del inoculante, no sólo se requieren mejores formulaciones de los inoculantes, buscando identificar y aprovechar sustancias y/o condiciones fisiológicas que estimulen la infectividad, sino también métodos alternativos de aplicación, que permitan una distribución homogénea de los rizobios en la zona del suelo que va a ser ocupada por la raíz.

En este trabajo de Tesis he estudiado la fisiología y las propiedades simbióticas de *B. japonicum* cuando se cultiva con escasez de la fuente de N. Asimismo, he evaluado la competencia para nodular soja frente a poblaciones establecidas en un sustrato inerte que simula las condiciones naturales del suelo y finalmente, hemos corroborado nuestros resultados con un ensayo a campo.

### **VIII.1.1. La relación C/N y la eficiencia de la infección**

Hemos observado que *B. japonicum* puede crecer al menos durante seis generaciones en un medio con menos de 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{NH}_4^+$  como fuente de N (GN 0) y a una velocidad comparable a la registrada en el medio de Götz (1982), que contiene  $\text{NH}_4^+$  2 mM. (Figura 3.1). El grado de limitación de N obtenido al final de la fase de crecimiento exponencial en el medio GN 0 fue corroborado a través de la actividad GS. La activación total de GS I y la fuerte inducción de GS II (Tabla 3.1) podrían ser responsables de sostener el crecimiento en esta situación, asimilando el N presente en muy baja concentración en el medio extracelular y al mismo tiempo, favoreciendo el reciclaje de N intracelular.

Otros cambios importantes observados bajo severa escasez de la fuente de N se refieren al destino del C, algunos de cuyos polímeros juegan un papel relevante en la simbiosis. Cuando las bacterias pasan de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria la demanda energética se reduce, con lo que tienden a acumularse polímeros ricos en C si hay disponibilidad de este nutriente. La alta relación C/N que se generó en los cultivos limitados en N indujo la síntesis de gran cantidad de PSE tanto al final de la fase de crecimiento exponencial como en fase estacionaria. Por su parte, los rizobios cultivados con suficiencia de N produjeron poca cantidad de polímeros de C en fase de crecimiento exponencial y canalizaron el C hacia la formación de PHB en vez de PSE al entrar en fase estacionaria (Tabla 4.1). Estas tendencias se mantuvieron tanto en alta como en baja relación C/N incluso en un mutante incapaz de sintetizar EPS (Tabla 4.2). Esta observación sugiere que la dirección del flujo metabólico en el sentido glicolítico o gluconeogénico controlada por el estado de carga energética en la célula tiene un rol central en el direccionamiento del C hacia PSE o PHB, además del papel que juega el nivel de poder reductor intracelular. De todas maneras, la comparación del comportamiento de la cepa mutante y la salvaje con suficiencia de N señala que las vías de biosíntesis de PSE y PHB efectivamente estaban compitiendo por el C ya que en este caso el mutante produjo significativamente más PHB que el salvaje (Tabla 4.2).

Nuestra interpretación es que la síntesis de uno u otro polímero de C (PSE o PHB) dependería al menos en parte de que se produzca o no una acumulación de intermediarios del ciclo de Krebs (en particular acetil-CoA y  $\alpha$ -cetoglutarato), poder reductor y/o carga energética, que desviarían el flujo de C hacia una u otra vía de síntesis. En los cultivos con suficiencia de N el probable exceso de poder reductor y la acumulación de acetil-CoA, conduciría a la formación de PHB al entrar el cultivo en fase estacionaria. Mientras tanto, en los cultivos limitados en N no podría llegar a acumularse suficiente acetil-CoA como consecuencia de la aumentada actividad GS, que secuestra  $\alpha$ -cetoglutarato del ciclo de Krebs. Además, la alta carga energética disponible en estos cultivos contribuiría a orientar el flujo de C hacia la síntesis de PSE.

El crecimiento con alta relación C/N también tuvo efectos sobre las etapas tempranas de la infección y la nodulación. Dado que el sitio de unión de SBL se encuentra en el CPS, y éste está aumentado en los cultivos de alta relación C/N, decidimos analizar si también se estimulaba la adsorción como consecuencia de un posible aumento en la unión de SBL. Pudimos comprobar que en efecto las bacterias cultivadas con

escasez en la fuente de N unían más SBL y los rizobios de cultivos jóvenes se estimulaban más para la adsorción a raíces al ser pretratados con SBL (Tabla 5.2). Como en el caso del análisis de actividad GS y de acumulación de PSE, observamos que tanto la capacidad de unir SBL como la estimulación de la adsorción tuvieron un comportamiento intermedio en el cultivo en GN 0,1, con moderada escasez de la fuente de N (Tabla 3.1, Figura 4.1, Tabla 4.1 y Tabla 5.2). Este comportamiento corrobora el de los extremos en GN 0 y GN 1 y señala claramente que los efectos ocurren en la transición del crecimiento exponencial a la fase estacionaria, ya que el cultivo en GN 0,1 en fase exponencial se comportó similarmente al de GN 1 mientras que en la fase estacionaria lo hizo como el de GN 0. De hecho, si bien hemos decidido trabajar con cultivos de las mismas edades cronológicas (5 y 14 días) no debe perderse de vista que los cultivos en GN 0 ingresaron mucho antes a la fase estacionaria (Figura 3.1) y por lo tanto a los 5 días de crecimiento en realidad estaban en plena transición, a diferencia de los otros dos.

Otro evento importante de la preinfección es la inducción de los genes de nodulación (*nod*) por parte de los flavonoides liberados por la raíz. Estos genes codifican las enzimas y proteínas reguladoras necesarias para la biosíntesis y liberación del factor Nod, una molécula señal que dispara la organogénesis del nódulo. Ciertas evidencias habían señalado que la inducción de la expresión de los genes *nod* sería sensible al nivel de N en el sentido de que la presencia de una abundante cantidad de la fuente de N combinado sería inhibitoria (Dusha *et al.*, 1989; Wang y Stacey, 1990). Nosotros pudimos observar que la muy baja disponibilidad de fuente de N conduce a un mayor nivel de inducción de la expresión de *nodC* (Tabla 5.1) indicando que la infectividad de los rizobios podría aumentar no sólo en forma pasiva –falta de inhibición– sino activa ante la escasez de fuente de N.

En la Tabla 8.1 se resumen las características salientes de los cultivos con escasez severa o moderada en la fuente de N o bien con suficiencia de la misma, y puede apreciarse allí el comportamiento secuencial entre estos tres estados.

La adsorción y la inducción de la organogénesis del nódulo constituyen dos etapas clave de la preinfección, cuya eficiencia puede definir la del proceso final de penetración de la raíz e infección del nódulo. Así, podría esperarse que rizobios más estimulados para la adsorción y más sensibles a la genisteína para la inducción de los genes de nodulación sean en consecuencia más infectivos.

**Tabla 8.1.** Caracterización de los rizobios sometidos a diversos grados de escasez de fuente de N en base a los resultados obtenidos en esta Tesis.

Medio	Propiedad y edad del cultivo (días de crecimiento)											
	Actividad GS I (%)		Actividad GS II (%)		Relación PSE/PHB (mg/mg)		Unión de SBL (%)		E %		Inducción de <i>nodC</i> (veces)	
	5	14	5	14	5	14	5	14	5	14	5	14
GN 0	35,7	80,8	64,3	19,2	31,5	154,3	27,0	6,5	276,0	-	15,2	7,1
GN 0,1	77,9	93,8	22,1	6,2	35,2	20,3	1,5	8,5	58,3	-	5,7	10,2
GN 1	82,5	91,1	17,5	8,9	33,6	1,8	1,5	0,7	-	-	8,4	1,6

En concordancia con ello, hemos observado que los cultivos en GN 0 fueron más infectivos (Figura 5.1 y 5.2) y competitivos (Tabla 6.1) para nodular que los de GN 1. Por lo tanto, nuestros datos indican que esta condición podría aprovecharse para obtener inoculantes mejorados mediante el cultivo de los rizobios bajo limitación de N.

### **VIII.1.2. Posibilidades de aprovechar la mayor infectividad para solucionar el problema de la competición para la nodulación**

La presencia de poblaciones naturalizadas de rizobios competidores en diversos suelos donde se ha cultivado soja durante varios años constituye un formidable obstáculo para la efectividad con que los rizobios llevados por los inoculantes pueden ocupar un número significativo de nódulos de modo que se manifieste plenamente su capacidad fijadora de N<sub>2</sub>. Nuestros resultados precedentes sugirieron que sería posible aumentar la competitividad de los inoculantes si éstos se preparan con rizobios limitados en N. Para aproximarnos a determinar si los rizobios cultivados con muy alta relación C/N pueden competir mejor hemos estudiado la

capacidad de diversos inoculantes para ocupar nódulos en un sistema de cultivo de soja en macetas con vermiculita, donde previamente se habían establecido poblaciones competidoras de una cepa isogénica a la usada en el inoculante. Como resultado de estos ensayos, observamos que la ocupación de los nódulos por los inoculantes fue siempre muy escasa en comparación con la población, con independencia del grado de limitación de N con que aquellos habían sido preparados (Tabla 6.2). Este resultado indicaba la existencia de un factor limitante más severo que las diferencias de infectividad obtenidas con diferentes niveles de la fuente de N.

Ciertas observaciones previas describen la dificultad de los rizobios inoculados sobre las semillas para ocupar las zonas infectables de la raíz (McDermott y Graham, 1989), lo que podría deberse a la escasa movilidad de los rizobios en el suelo. Por otra parte, es bien conocido que las condiciones de escasez de nutrientes que predominan en el suelo inducen cambios fisiológicos en los rizobios que los podrían capacitar para una mayor eficiencia en la interacción temprana. En un experimento tendiente a discriminar entre estas posibilidades, se estableció una población de rizobios en vermiculita, que luego de 30 días de incubación fue retirada de allí y mezclada en una solución homogénea con un cultivo limitado en N en una proporción 1:1. De esta manera, se destruyeron todos los posibles efectos de posición que pudieran influir en la mayor competitividad de la población pero se mantuvo el estado fisiológico de todos los rizobios para observar cuáles eran intrínsecamente más competitivos. Con esta mezcla se inocularon macetas nuevas y se comparó la competitividad con macetas donde la población no había sido perturbada. Observamos que en la solución homogénea la cepa cultivada con escasez de N resultó ser intrínsecamente la más competitiva. Por el contrario, cuando la cepa cultivada con escasez de N se inoculó sobre las semillas de plantas de soja colocadas en macetas cuya población no había sido perturbada, observamos nuevamente que la competitividad de la cepa inoculada sobre las semillas era muy baja respecto de la población (Tabla 6. 3). Estos resultados mostraron que para la mayor ocupación de nódulos por parte de la cepa establecida en la vermiculita la posición de los rizobios juega un papel decisivo. Para corroborar esta idea, analizamos la colonización de distintos segmentos de las raíces de soja por parte de los rizobios inoculados sobre las semillas y los de la población, y pudimos confirmar que la posición de los rizobios respecto de la raíz condiciona incluso el temprano evento de colonización (Figura 6. 4).

Estos resultados indicaron que la posición de los rizobios y su escasa movilidad a lo largo de la raíz era el factor limitante buscado. Nuestro

siguiente objetivo fue mejorar la posición de los rizobios del inoculante con respecto a los del suelo ya que de otra manera no parece ser posible lograr que las mejoras de competitividad alcanzadas con el cultivo en alta relación C/N puedan tener un efecto apreciable. A este respecto, observamos que la inoculación en el sustrato –vermiculita o suelo– a 5 cm de profundidad por debajo de la semilla puede paliar el efecto de la posición desventajosa de los rizobios inoculados sobre las semillas. Los datos de ensayos llevados a cabo en el laboratorio y a campo mostraron una mejoría sustancial en la ocupación de nódulos cuando el inoculante se colocó en profundidad (Figuras 6.6 y 7.1).

### **VIII.2. Conclusión**

El cultivo de *B. japonicum* con muy alta relación C/N provoca en las células una limitación metabólica en N que conduce a la acumulación de PSE. Paralelamente, los rizobios se vuelven más infectivos y competitivos para la formación de nódulos en parte gracias a que el mayor contenido de PSE mejora la adhesividad y a una mayor sensibilidad de la inducción de los genes *nod* a la genisteína. Sin embargo, la mayor infectividad no puede aprovecharse para solucionar el problema de la competición para la nodulación frente a poblaciones naturalizadas de rizobios compatibles ya que la distribución de los mismos y la falta de movilidad vertical del inoculante constituyen factores limitantes. La inoculación en profundidad puede ayudar a revertir estos problemas.

### **VIII.3. Perspectivas**

Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis abren nuevas vías respecto de la optimización de los métodos de inoculación y a su vez plantean preguntas básicas del metabolismo de C y N en *B. japonicum* de vida libre.

Desde el punto de vista agronómico, es importante avanzar en la optimización de tecnologías alternativas a la inoculación sobre semillas, que sean adaptables a paquetes tecnológicos de siembra directa, de bajo costo, fácil aplicación y que posicionen a los rizobios del inoculante al menos en una situación equivalente a los de la población del suelo. Esto

plantea desafíos acerca del estado en que se encuentran los rizobios en el suelo: si forman biofilms, si su movilidad y quimiotaxis se ejercen en un rango corto o amplio y además renuevan la importancia de los estudios de colonización radicular. Es interesante hacer notar que los rizobios no sólo son capaces de colonizar la endorrizosfera de las leguminosas sino que también pueden hacerlo en otras especies vegetales. Nosotros hemos observado que *B. japonicum* también es capaz de colonizar la endorrizosfera de trigo (resultados no publicados) con lo cual podría pensarse incluso en utilizar las raíces de este cereal como vehículo de dispersión de los rizobios en rotaciones trigo/soja. Además, surge como interesante la posibilidad de complementar estos estudios con mutantes alterados en su movilidad.

Con respecto a los estudios básicos, éstos podrían enriquecerse con la obtención de mutantes alterados en ciertos genes clave del metabolismo del N, tales como *glnA*, *glnII* o *ntrBC* en experimentos similares a los ya efectuados con el mutante *exoB*. Estos mutantes también deberían ser ensayados con respecto a la inducción de la expresión de los genes *nod* con el fin de aclarar si existe o no un diálogo entre el sistema de captación de los niveles de N y el de la percepción del hospedador.

Los estudios podrían ampliarse con la incorporación de otras metodologías, como el cultivo continuo en biorreactores y la proteómica. Con el primer abordaje podríamos establecer balances de masa en cultivos limitados en N o en C y dado que se conoce bastante de las vías metabólicas involucradas, elaborar hipótesis acerca del control metabólico en ambas situaciones. Los estudios proteómicos, aprovechando el conocimiento de la secuencia completa del genoma de *B. japonicum* (Kaneko *et al.*, 2002), aportarían información sobre el patrón de expresión génica lo cual profundizaría notablemente los estudios de regulación e integración del metabolismo del N y el C en esta especie.

Para comprender mejor el destino del C debería analizarse la composición de los PSE producidos por la cepa salvaje y la mutante *exoB* cultivadas con diversas fuentes de C en medios con o sin escasez de N y luego introducir el empleo de precursores marcados. Además, debe estudiarse si el EPS es responsable de inhibir los sistemas de defensa de la planta y si esta inhibición es revertida por un EPS defectuoso.

Como resultado de estas propuestas de investigación podría obtenerse una visión más extensa y profunda sobre el metabolismo central del N y el C en *B. japonicum*, el cual no ha sido estudiado sistemáticamente más allá de lo que concierne a la fijación de N<sub>2</sub>.

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Arcondeguy, T., R. Jack y M. Merrick.** 2001. P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **65**: 80-105.
- Allaway, D., E. M. Lodwig, L. A. Crompton, M. Wood, R. Parsons, T. R. Wheeler y P. S. Poole.** 2000. Identification of alanine dehydrogenase and its role in mixed secretion of ammonium and alanine by pea bacteroids. *Mol. Microbiol.* **36**: 508-15.
- Ausmees, N., K. Jacobsson y M. Lindberg.** 2001. A unipolarly located, cell-surface-associated agglutinin RapA belongs to a family of *Rhizobium*-adhering proteins (Rap) in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Microbiol.* **147**: 549-559.
- Banfalvi, Z., A. Nieuwkoop, M. Schell, L. Besl, y G. Stacey.** 1988. Regulation of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **214**: 420-424.
- Barbour, W. M., D. R. Hatterman y G. Stacey.** 1991. Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2635-2639.
- Becker, B. U., K. Kosch, M. Parniske y P. Müller.** 1998. Exopolysaccharide (EPS) síntesis in *Bradyrhizobium japonicum*: sequence, operon structure and mutational analysis of an *exo* gene cluster. *Mol. Gen. Genet.* **259**: 161-71.
- Becker, A. y A. Pühler.** 1998. Production of Exopolysaccharides. En: *The Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas (Eds.). pp 97-118. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Bender, R. A., K. A. Janssen, A. D. Resnick, M. Blumemberg, F. Foor y B. Magasanik** 1977. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* **129**: 1001-1009.
- Bhagwat, A. A., K. C. Gross, R. E. Tully y D. L. Keister.** 1996. Beta-glucan synthesis in *Bradyrhizobium japonicum*: characterization of a new locus (*ndvC*) influencing beta-(1-6) linkages. *J. Bacteriol.* **178**: 4635-42.
- Bhuvaneswari, T. V., S. Pueppke y W. D. Bauer.** 1977. Role of lectins in plant-microorganism interactions. *Plant Physiol.* **60**: 486-491.
- Bhuvaneswari, T. V., B. G. Turgeon y W. D. Bauer.** 1980. Early events in the infection of soybean (*Glycine max* L. Merr.) by *Rhizobium japonicum* I. Localization of infective root cells. *Plant Physiol.* **66**: 1027-1031.
- Bhuvaneswari, B. V., K. K. Mills, D. K. Crist, W. R. Evans, y W. D. Bauer.** 1983. Effects of culture age on symbiotic infectivity of *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **153**: 443-451.
- Bianciotto, V, S. Andreotti, R. Balestrini, P. Bonfante y S. Perotto.** 2001. Extracellular polysaccharides are involved in the attachment of *Azospirillum brasilense* and *Rhizobium leguminosarum* to arbuscular mycorrhizal structures. *Eur J Histochem.* **45**: 39-49.
- Blume, H., H. Beier y H. J. Gross.** 1987. An improved method for silver staining of polypeptides in polyacrilamide gels. *Electrophoresis.* **8**: 93-99.



- Boiardi, J. L., N. Moreni y M. L. Galar.** 1988. Survival and infectivity of a *Rhizobium meliloti* strain maintained in water and buffer suspensions. *J. Appl. Bacteriol.* **65**:189-193.
- Boogerd, F. C. y D. van Rossum.** 1997. Nodulation of groundnut by *Bradyrhizobium*: a simple infection process by crack entry. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 5-27.
- Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bravo, A. y J. Mora.** 1988. Ammonium assimilation in *Rhizobium phaseoli* by the glutamine synthetase-glutamate pathway. *J. Bacteriol.* **170**: 980-984
- Breedveld, M. W. y K. J. Miller.** 1994. Cyclic  $\beta$ -glucans of members of the family *Rhizobiaceae*. *Microbiol. Rev.* **58**: 145-161.
- Brelles Mariño, G. y J. L. Boiardi.** 1996. Nitrogen limitation of chemostat-grown *Rhizobium etli* elicits higher infection-thread formation in *Phaseolus vulgaris*. *Microbiology* **142**: 1067-1070.
- Broughton, W. J., S. Jabbouri y X. Perret.** 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**: 5641-5652.
- Broughton, W. J.** 2003. Roses by other names: taxonomy of the *Rhizobiaceae*. *J. Bacteriol.* **185**: 2975-2979.
- Caetano-Anollés, G.** (1985) La Asociación Simbiótica de Rizobios y Leguminosas. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de La Plata.
- Caetano-Anollés, G. y G. Favelukes.** 1986a. Quantitation of adsorption of Rhizobia in low numbers to small legume roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 371-376.
- Caetano-Anollés, G., D. K. Crist Estes y W. D. Bauer.**(1988) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* to the plant flavone luteolin requires functional nodulation genes. *J. Bacteriol.* **170**: 3164-3169.
- Caetano Anollés G., A. Lagares y G. Favelukes.** 1989. Adsorption of *Rhizobium meliloti* to alfalfa roots: dependence on divalent cations and pH. *Plant Soil.* **117**: 67-74.
- Caetano-Anollés, G. y P. M. Gresshoff.** 1991a. Alfalfa controls nodulation during the onset of *rhizobium*-induced cortical cell division. *Plant Physiol.* **95**: 366-373.
- Caetano-Anollés, G. y P.M. Gresshoff.** 1991b. Plant genetic control of nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **45**: 345-382
- Caetano-Anollés, G., E. Wrobel-Boerner, y W. D. Bauer.** 1992. Growth and movement of spot inoculated *Rhizobium meliloti* on the root surface of alfalfa. *Plant Physiol.* **98**: 1181-1189.
- Cardenas L., T. L. Holdaway-Clarke, F. Sanchez, C. Quinto, J. A. Feijo, J. G. Kunkel y P. K. Hepler.** 2000. Ion changes in legume root hairs responding to Nod factors. *Plant. Physiol.* **123**: 443-452.
- Cardenas L., J. E. Thomas-Oates, N. Nava, I. M. Lopez-Lara, P. K. Hepler y C. Quinto.** 2003. The role of nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**: 326-34.

- Carlson, T. A., G. B. Martin, y B. K. Chelm.** 1987. Differential transcription of the two glutamine synthetase genes of *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **169**: 5861-5866.
- Cebolla A. y A. J. Palomares.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in *Rhizobium meliloti*. *Microbiologia.* **10**: 371-84.
- Cermola M., E. Fedorova, R. Tate, A. Riccio, R. Favre y E. J. Patriarca.** 2000. Nodule invasion and symbiosome differentiation during *Rhizobium etli-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **13**: 733-741.
- Cevallos, M. A, S. Encarnacion, A. Leija, Y. Mora y J. Mora.** 1996. Genetic and physiological characterization of a *Rhizobium etli* mutant strain unable to synthesize poly-beta-hydroxybutyrate. *J. Bacteriol.* **178**: 1646-1654.
- Cohn, J., R. B. Day y G. Stacey.** 1998. Legume nodule organogenesis. *Trends Plant Sci.* **3**: 105-110.
- Crist, D. K., R. E. Wyza y K. K. Mills.** 1984. Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in water. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 895-900.
- Cullimore, J. V., Ranjeva, R., y J. J. Bono.** 2001. Perception of lipochitoooligosaccharidic Nod factors in legumes. *Trends Plant Sci.* **6**: 24-30.
- Chen, R., A. A. Bhagwat y D. L. Keister.** 2003. A motility revertant of the *ndvB* mutant of *Bradyrhizobium japonicum*. *Curr. Microbiol.* **47**: 431-3.
- Chiurazzi, M., R. Meza, M. Lara, A. Lahm, R. Defez, M. Iaccarino y G. Espin.** 1992. The *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli *glnT* gene, encoding glutamine synthetase III. *Gene.* **119 (1)**:1-8.
- Dardanelli, M., J. Angelini y A. Fabra.** 2003. A calcium-dependent bacterial surface protein is involved in the attachment of rhizobia to peanut roots. *Can J Microbiol.* **49**: 399-405.
- Darrow, R. A. y R. R. Knotts** 1977. two forms of glutamine synthetase in free-living root-nodule bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **78**: 554-559.
- Dazzo, F. B. y G. Truchet.** 1983. Interactions of lectins and their saccharide receptors in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *J. Membr. Biol.* **73**: 1-16.
- de Bruijn F. J., S. Rossbach, M. Schneider, P. Ratet, S. Messmer, W. W. Szeto, F. M. Ausubel y J. Schell.** 1989. *Rhizobium meliloti* 1021 has three differentially regulated loci involved in glutamine biosynthesis, none of which is essential for symbiotic nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* **171**: 1673-1682.
- Dénarié, J., F. Debellé y C. Rosenberg.** 1992. Signalling and host range in nodulation. *Ann. Rev. Microbiol.* **46**: 497-525.
- Dénarié, J y J. Cullimore.** 1993. Lipo-oligosaccharide nodulation factors: a new class of signaling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Cell* **74**: 951-954.
- Díaz, C. L.** 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-legume symbiosis. PhD Thesis. Leiden University, The Netherlands.
- Díaz, C. L., L. S. Melchers, P. J. J. Hooykaas, B. J. J. Lugtenberg y J. W. Kijne.** 1989. Root lectin as a determinant of host-plant specificity in the *Rhizobium*-Legume symbiosis. *Nature.* **338**: 579-581.

- Díaz-Marrero A. R., M. Santamaría, Poveda A., J. Jiménez Barbero y J. Corzo.** 1998. Electroforetic behavior and size distribution of the acidic polysaccharides produced by the bacteria *Bradyrhizobium* (Chamaecytisus) strain BGA-1 and *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Electrophoresis*. **19**: 2621-2624.
- Dockendorff, T. C., J. Sanjuan, P. Grob, y G. Stacey.** 1994. NodA represses *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**:596-602.
- Dusha, I., A. Bakos, A. Kondorosi, F. de Bruijn y J. Schell.** 1989. The *Rhizobium meliloti* early nodulation genes (*nodABC*) are nitrogen-regulated. Isolation of a mutant strain with efficient nodulation capacity on Alfalfa in the presence of ammonium. *Mol. Gen. Genetics.* **219**: 89-96.
- Dusha, I. y A. Kondorosi.** 1993. Genes at different regulatory levels are required for the ammonia control of nodulation in *Rhizobium meliloti*. *Mol Gen Genet.* **240**: 435-44.
- Dusha, I.** 2002. Nitrogen control of bacterial signal production in *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis. *Indian. J. Exp. Biol.* **40**: 981-988.
- Evans, C. G. T., D. Herbst y D. W. Tempest.** 1970. *Methods in Microbiology.* **2**: 275-327.
- Fåhræus, G.** 1957. The infection of Clover Root Hairs by Nodule Bacteria Studied by a Simple Glass Slide Technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 374-381.
- Fell, D.** 1997. *Understanding the control of metabolism.* Portland Press, London, Inglaterra.
- Felle, H. H., A. Kondorosi, E. Kondorosi y M. Schultze.** 1995. Nod signal-induced plasma membrane potential changes in alfalfa root hairs are differentially sensitive to structural modifications of the lipochitooligosaccharide. *Plant J.* **7**: 939-947.
- Fischer, H. M.** 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation in rhizobia. *Microbiol. Rev.* **58**: 352-386.
- Foucher F. y E. Kondorosi.** 2000. Cell cycle regulation in the course of nodule organogenesis in Medicago. *Plant Mol Biol.* **43**: 773-86.
- Frayse, N. F., F. Couderc y V. Poinsoy.** 2003. Surface polysaccharide involvement in establishing the rhizobium-legume symbiosis. *Eur. J. Biochem.* **270**: 1365-1380.
- Gage D. J. y W. Margolin.** 2000. Hanging by a thread: invasion of legume plants by rhizobia. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**: 613-617.
- Göttfert, M., D. Holsduser y H. Hennecke.** 1990. Proposed regulatory pathway encoded by the *nodV* and *nodW* genes, determinants of host specificity in *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA).* **87**: 2680-2684.
- Göttfert M., D. Holzhauser, D. Bani y H. Hennecke.** 1992. Structural and functional analysis of two different *nodD* genes in *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **5**: 257-65.
- Götz, R., N. Limmer, K. Ober y R. Schmitt** 1982. Motility and chemotaxis in two strains of *Rhizobium* with complex flagella. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 789-798.
- Greaves, M. P. y J. F. Darbyshire.** 1972. The ultrastructure of the mucilaginous layer on plant roots. *Soil Biol. Biochem.* **4**: 443-449.

- Green, L. S. y D. W. Emerich.** 1997. *Bradyrhizobium japonicum* does not require alpha-ketoglutarate dehydrogenase for growth on succinate or malate. *J. Bacteriol.* **179**: 194-201.
- Guirard, B. M. y E. E. Snell.** 1981. Biochemical factors in growth. En: Manual of methods for general bacteriology. Gerhardt, P., R.G.E. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.E. Krieg, and G. B. Phillips, eds. American Society for Microbiology. Washington, EEUU. pp 79-111.
- Gyorgyey, J., D. Vaubert, J. I. Jimenez-Zurdo, C. Charon, L. Troussard, A. Kondorosi y E. Kondorosi.** 2000. Analysis of *Medicago truncatula* nodule expressed sequence tags. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**: 62-71.
- Hablieb, C. M. y P. W. Luden.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* **130**: 1081-1084.
- Halverson, L.J. y G. Stacey.** 1986a. Effect of lectin on nodulation by wild-type *Bradyrhizobium japonicum* and a nodulation defective mutant. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 753-760.
- Halverson, L. J. y G. Stacey.** 1986b. Signal exchange in plant-microbe interactions. *Microbiol. Rev.* **50**: 193-225.
- Harris J. M, R. Wais y S. R. Long.** 2003. Rhizobium-induced calcium spiking in *Lotus japonicus*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **16**: 335-341.
- Heidstra, R., R. geurts, H. Franssen, H. P. Spaink, A. van Kammen y Bisseling, T.** 1994. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate on *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**: 787-797.
- Heldt, H.W.** 1997. Plant Biochemistry and molecular Biology. Oxford University Press. Oxford, Reino Unido.
- Hernández, L. E., S. Perotto, N. J. Brewin y B. K Drobak.** 1995. A novel inositol-lipid in plant-bacteria symbiosis. *Biochem. Soc. Trans.* **23**: 582S.
- Hilgert, U., J. Schell, y F. J. de Bruijn.** 1987. Isolation and characterization of Tn5-induced NADPH-glutamate synthase (GOGAT-) mutants of *Azorhizobium sesbaniae* ORS571 and cloning of the corresponding *glt* locus. *Mol. Gen. Genet.* **210**: 195-202.
- Hirsch, A. M.** 1992. Tansley Review No. 40. Developmental biology of legume nodulation. *New Phytologist.* **122**: 211-237.
- Hirsch, A. M.** 1999. Role of lectins (and rhizobial exopolysaccharides) in legume nodulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 320-326.
- Hirsch, Ann M., M. R. Lum y J. A. Downie.** 2001. What makes the rhizobia-legume symbiosis so special?. *Plant Physiology.* **127**: 1484-1492,
- Ho, S. C., J. L. Wang y M. Schindler.** 1990. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*. II. Isolation and characterization of a galactose-specific lectin. *J. Cell. Biol.* **111**: 1639-1643.
- Hoch, J. A. y T. J. Silhavy.** 1995. Two-component signal transduction. American Society for Microbiology. Washington, D. C.

- Horken, K. M. y F. R. Tabita.** 1999. Closely related form I ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase molecules that possess different CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> substrate specificities. *Arch Biochem Biophys.* **361**: 183-94.
- Howitt, S. M., and P. M. Gresshoff.** 1985. Ammonia regulation of glutamine synthetase in *Rhizobium* sp. ANU289. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1433-1440.
- Humbeck C., H. Thierfelder, P. M. Gresshoff y D. Werner.** 1985. Competitive growth of slow growing *Rhizobium japonicum* against fast growing *Enterobacter* and *Pseudomonas* species at low concentrations of succinate and other substrates in dialysis culture. *Arch. Microbiol.* **142**: 223-228.
- Ielpi, L., T. Dylan, G. S. Ditta, D. R. Helinski y S. W. Stanfield.** 1990. The *ndvB* locus of *Rhizobium meliloti* encodes a 319-kDa protein involved in the production of  $\beta$ -(1,2)-glucan. *J. Biol. Chem.* **265**: 2843-2851.
- Jordan, D. C.** 1984. The Rhizobiaceae. En *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (9<sup>th</sup>. edn.) Vol. 1. (eds J.G. Holt y N.R. Kreig), Willians y Wilkins, London pp. 24-43.
- Kaneko, T, Y. Nakamura, S. Sato, K. Minamisawa, T. Uchiumi, S. Sasamoto, A. Watanabe, K. Idesawa, M. Iriguchi, K. Kawashima, M. Kohara, M. Matsumoto, S. Shimpo, H. Tsuruoka, T. Wada, M. Yamada, S. Tabata.** 2002. Complete genomic sequence of nitrogen-fixing symbiotic bacterium *Bradyrhizobium japonicum* USDA110. *DNA. Res.* **9**: 189-197.
- Kannenberg, E. L., Reuhs, B. L., Forsberg, L. S. and Carlson, R. W.** 1998. Lipopolysaccharides and K antigens: their structures, biosynthesis and functions. En: *The Rhizobiaceae*. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas (Eds.). pp 119-1154. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Kape, R., M. Parniske y D. Werner.** 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydrocinnamic acids and isoflavonoids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 316-319.
- Karr, D. B., R- T. Liang, B. L. Reuhs, y D. W. Emerich.** 2000. Altered exopolysaccharides of *Bradyrhizobium japonicum* mutants correlate with impaired soybean lectin binding, but not with effective nodule formation. *Planta* **211**: 218-226.
- Kashefi, K. y D. R. Lovley.** 2003. Extending the upper temperature limit for life. *Science.* **301**: 934.
- Kijne, J. W., G. Smit, C. L. Diaz y B. J. J. Lugtenberg.** 1988. Lectin-enhanced accumulation of manganese-limited *Rhizobium leguminosarum* cells on pea root hair tips. *J. Bacteriol.* **170**: 2994-3000.
- Kijne, J. W.** 1992. The *Rhizobium* infection process. pp. 349-398. En G. Stacey, R. Burris & H.J. Evans (eds). *Biological nitrogen fixation*. Chapman and hall, New York, USA.
- Kijne, J. W., M. A. Bauchrowitz y C. L. Diaz.** 1997. Root lectins and rhizobia. *Plant Physiol.* **115**: 869-873.
- Kluepfel, D. A.** 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopatol.* **31**: 441-472.

- Kosslak, R. M., R. Bookland, J. Barker, H. E. Paaren y E. R. Applebaum.** 1987. Induction of *Bradyrhizobium japonicum* common nod genes by isoflavones isolated from *Glycine max*. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa. **84**: 7428-7432.
- Krusell, L., L. H. Madsen, S. Sato, G. Aubert, A. Genua, K. Szczyglowski, G. Duc, T. Kaneko, S. Tabata, F. de Bruijn, E. Pajuelo, N. Sandal y J. Stougaard.** 2002. Shoot control of root development and nodulation is mediated by a receptor-like kinase. Nature. **420**: 422-426.
- Kundu, S., J. T. 3rd Trent y M. S. Hargrove.** 2003. Plants, humans and hemoglobins. Trends. Plant. Sci. **8**: 387-393.
- Laemli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. **227**: 680-685.
- Lagares, A.** 1989. La asociación simbiótica rizobio-leguminosa: componentes superficiales bacterianos involucrados en las etapas tempranas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Lam, H. M., K. Coschigano, C. Schultz, R. Melo-Oliveira, G. Tjaden, I. Oliveira, N. Ngai, M. H. Hsieh y G. Coruzzi.** 1995. Use of Arabidopsis mutants and genes to study amide amino acid biosynthesis. Plant Cell. **7**: 887-898.
- Law, J. H. y R. A. Slepecky.** 1961. Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. J. Bacteriol. **82**: 33-36.
- Lerogue, P., P. Roche, C. Faucher, F. Maillet, G. Truchet, J.C. Promé y J. Dénarié.** 1990. Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. Nature. **344**: 781-784.
- Limpens, E. y T. Bisseling.** 2003. Signaling in symbiosis. Current Opinion in Plant Biology. **6**: 343-350
- Lison, L.** 1976. Estadística aplicada a la biología experimental. Eudeba Manuales. Bs As.
- Lodeiro, A. R.** 1994. Fisiología de las interacciones tempranas planta-bacteria: asociación de rizobios y leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno. Tesis Doctoral. UNLP.
- Lodeiro, A. R., A. Lagares, E. N. Martínez, y G. Favelukes.** 1995. Early Interactions of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli and bean roots: specificity in the process of adsorption and its requirement of  $Ca^{2+}$  and  $Mg^{+2}$  ions. Appl. Environ. Microbiol. **61**: 1571-1579.
- Lodeiro A. R., A. Peticari y G. Favelukes.** 1996. Efectos de la lectina y la harina de soja sobre la infectividad y competitividad de *Bradyrhizobium japonicum* para la nodulación. Memorias. XVIII Reunión Latinoamericana de Rizobiología. Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. pp. 287-290
- Lodeiro, A. R. y G. Favelukes.** 1999. Early interactions of *Bradyrhizobium japonicum* and soybean roots: specificity in the process of adsorption. Soil Biol. Biochem. **31**: 1405-1411.
- Lodeiro, A., S. López García, T. Vázquez, y G. Favelukes.** 2000. Stimulation of adhesiveness, infectivity, and competitiveness for nodulation of *Bradyrhizobium japonicum* by its treatment with soybean seed lectin. FEMS Microbiol. Lett., **188**: 177-184.

- Lodeiro, A. R., S. L. López García, E. Mongiardini, J. I. Quelas y A. Peticari.** 2003. "Los rizobios y la inoculación de las leguminosas para la fijación simbiótica de nitrógeno". En: Microbiología agrícola: un aporte de la investigación argentina. Comité Editor: Albanesi A., Anriquez A., Luna S., Kunst C. y Ledesma R. Págs. 159-193. Editorial: Universidad Nacional de Santiago del Estero. ISBN: 987- 99083-5-X. Argentina. Julio 2003.
- Lodwig, E. M., A. H. Hosie, A. Bourdes, K. Findlay, D. Allaway, R. Karunakaran, J. A. Downie y P. S. Poole.** 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-Rhizobium symbiosis. *Nature*. **422**: 722-726.
- Lodwig, E. y P. Poole.** 2003. Metabolism of rhizobium bacteroids. *Crit. Rev. Plant Sciencis*. **22**: 37-78.
- Loh, J. T., S. C. Ho, A. W. de Feijter, J. L. Wang y M. Schindler.** 1993. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*: unipolar localization of the lectin BJ38 on the bacterial cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **90**: 3033-3037.
- Loh, J., M. García, y G. Stacey.** 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **179**: 3013-3020.
- Loh, J., M. G. Stacey, M. J. Sadowsky, y G. Stacey.** 1999a. The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene encodes three functionally distinct proteins. *J. Bacteriol.* **181**: 1544-1554
- Loh, J., J. P. Y. Yuen;M. G. Stacey y G. Stacey.** 1999b. Unique aspect of *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. Ed.: Martinez y Hernadez. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York. Pág. 115-120.
- Loh, J., J. P. Y. Yuen-Tsai, A. Welborn, y G. Stacey.** 2001. Population density-dependent regulation of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *Mol. Microbiol.* **42**: 37-46.
- Loh, J., R. W. Carlson, W. S. York, y G. Stacey.** 2002. Bradyoxetin, a unique chemical signal involved in symbiotic gene regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 14446-14451.
- Loh, J., D. Lohar, B. Andersen, y G. Stacey.** 2002. A two-component regulator mediates population density dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *J. Bacteriol.* **184**: 1759-1766
- Loh, J. y G. Stacey.** 2003. Nodulation gene regulation in *Bradyrhizobium japonicum*: a unique integration of global regulatory circuits. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 10-17
- Lotan, R, H. W Siegelman, H. Lis y N. Sharon.** 1974. Subunit structure of soybean agglutinin. *J Biol Chem.* **249**: 1219-1224.
- Lucinski, R., W. Polcyn y L. Ratajczak.** 2002. Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium*-legumes. *Acta Biochimica Polonica*. **49**: 537-546.
- Ludwig, R. A.** 1978. Control of ammonium assimilation in *Rhizobium* 32H1'. *J. Bacteriol.* **135**:114-123.
- McRae, D. G., R. W. Miller, W. B. Berndt y K. Joy.** 1989. Transport of C4-dicarboxylic and amino acids by *Rhizobium meliloti* bacteroids. *Mol. Plant-Microbe Int.* **2**: 273-278.

- Madison, L. L., y G. W. Huisman.** 1999. Metabolic engineering of poly (3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 21-53.
- Madsen, E. L. y M. Alexander.** 1982. Transport of *Rhizobium* and *pseudomonas* through soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **46**: 557-560.
- Madsen, E. B., Madsen, L. H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N., y Stougaard J.** 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature.* **425**: 637-640.
- Martin, G. B., K. A. Chapman y B. K. Chelm.** 1988. Role of the *Bradyrhizobium japonicum ntrC* gene product in differential regulation of the glutamine synthetase II gene (*glnII*). *J. Bacteriol.* **170**: 5452-5459.
- Martínez-Drets, G., A. Gardiol y A. Arias.** 1977. 6-Phospho-D-gluconate: NAD<sup>+</sup> 2-oxidoreductase (decarboxylating) from slow- growing rhizobia. *J. Bacteriol.* **130**: 1139-1143.
- Matamoros, M., L. M. Baird, P. R. Escuredo, D. A. Dalton, F. R. Minchin, I. Iturbe-Ormaetxe, M. C. Rubio, J. F. Moran, A. J. Gordon, and M. Becana.** 1999. Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, Biochemical, and Structural alterations. *Plant Physiol.* **121**: 97-111.
- McDermott, T. R. y P. H. Graham.** 1989. *Bradyrhizobium japonicum* inoculant mobility, nodule occupancy, and acetylene reduction in the soybean root system. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2493-2498.
- McLoughlin, T. J., S. G. Alt y P. A. Merlo.** 1990. Persistence of introduced *bradyrhizobium japonicum* strains in subsequent years after inoculation in wisconsin Soils. *Can J. Microbiol.* **36**: 794-800.
- Mendoza, A., A. Leija, E. Martinez-Romero, G. Hernandez, y J. Mora.** 1995. The enhancement of ammonium assimilation in *Rhizobium etli* prevents nodulation of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 584- 592.
- Mergaert P., M. van Montagu, J. C. Promé y M. Holsters.** 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbomoyl group are present on Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 1551-1555.
- Metting, F. B.** 1993. Structure and physiological ecology of soil microbial communities. Metting, F.B. (ed). En: *Soil Microbial Ecology. Applications in Agricultural and Environmental Management.* Marcel Dekker, Inc. New York - Basel - Hong Kong. 3-25.
- Miller, J. H.** 1972. *Experiments in molecular genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EEUU.
- Mort, A. J., y W. D. Bauer.** 1980. Composition of the capsular and extra-cellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum*: changes with culture age and correlations with binding of soybean seed lectin to the bacteria. *Plant Physiol.* **66**: 158-163.
- Mort, A. J., y W. D. Bauer.** 1982. Application of two new methods for cleavage of polysaccharides into specific oligosaccharide fragments. Structure of the capsular and extracellular polysaccharides of *Rhizobium japonicum* that bind soybean lectin. *J. Biol. Chem.* **257**: 1870-1875.



- Natera, S. H. A., N. Guerreiro y M. Djordjevic.** 2000. Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for the investigation of symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 995-1009.
- Newcomb, W., D. Sippel y R. L. Peterson.** 1979. The early morphogenesis of *Glycine max* and *Pisum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **57**: 2603-2616.
- Ninfa, A. J., M. R. Atkinson, E. S. Kamberov, J. Feng y E. G. Ninfa.** 1995. Control of nitrogen assimilation by the NRI-NRII two-component system of enteric bacteria. En: Two-component signal transduction. Hoch, J.A. and Silhavy T.J., eds. American Society for Microbiology. Washington, EEUU. pp 67-88.
- Nowotny, A.** 1979. Basic exercises in immuno chemistry. Laboratory manual. 2° Ed. Springer-Verlag Heidelberg. Alemania.
- O'Gara, F., S. Manian, y J. Meade.** 1984. Isolation of an *Asm*-mutant of *Rhizobium japonicum* defective in symbiotic N<sub>2</sub> [nitrogen]-fixation. *FEMS Microbiol. Lett.* **24**: 241-245.
- O'Gara, F., F. Birkenhead, Y. P. Wang, C. Condon y S. S. Manian.** 1988. Dicarboxylic acid utilization and nitrogen fixation efficiency in *Rhizobium* legume symbiosis. pp.149-157. In F. O'Gara (ed.), *Physiological limitations and the genetic improvement of symbiotic nitrogen fixation*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Odum, E. P.** 1959. *Fundamentals of ecology*. 2° ed. W. B. Saunders, Philadelphia.
- Oke, V. y S. R. Long.** 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Microbiol.* **2**: 641-6.
- Parniske, M., K. Kosch, D. Werner y P. Müller** 1993. *ExoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum* with reduced competitiveness for nodulation of *Glycine max*. *Mol. Plant-Microbe Int.* **6**: 99-106.
- Parniske, M., P. E. Schmidt, K. Kosch y P. Müller.** 1994. Plant defense response of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective *exoB* mutants of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 631-638.
- Parniske M. y J. A. Downie.** 2003. Plant biology: locks, keys and symbioses. *Nature.* **425**: 569-570.
- Patriarca, E. J., R. Tate y M. Iaccarino.** 2002. Key role of bacterial NH<sub>4</sub><sup>+</sup> metabolism in *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 203-22.
- Perret, X., C. Staehelin y W. J. Broughton.** 2002. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- Paul, E. A. y F. E. Clark.** 1996. *Soil Microbiology and Biochemistry* 2° Ed. Academic Press. San Diego, EEUU.
- Pueppke, S. G.** 1996. The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Crit. Rev. Biotechnol.* **16**: 1-51.
- Peters, N. K. y D. P. S. Verma.** 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3**: 4-8.
- Poole, P. y D. Allaway.** 2000. Carbon and nitrogen metabolism in *Rhizobium*. *Adv Microb Physiol.* **43**: 117-63.

- Portais, J. C., P. Tavernier, I. Gosselin y J. N. Barbotin.** 1999. Cyclic organization of the carbohydrate metabolism in *Sinorhizobium meliloti*. *Eur. J. Biochem.* **265**: 473-480.
- Pueppke, S. G.** 1996. The genetic and biochemical basis for nodulation of legumes by rhizobia. *Crit. Rev. Biotechnol.* **16**: 1-51.
- Quispel, A.** 1974. The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Company, Amsterdam, Holanda.
- Radutoiu, S., L. H. Madsen, E. B. Madsen, H. H. Felle, Y. Umehara, M. Gronlund, S. Sato, Y. Nakamura, S. Tabata, N. Sandal, y J. Stougaard.** 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature.* **425**: 585-592.
- Reddy, P. M., J. K. Ladha, R. B. So, R. J. Hernandez, M. C. Ramos, O. R. Angeles, F. B. Dazzo y F. J. de Bruijn.** 1997. Rhizobial communication with rice roots: Induction of phenotypic changes, mode of invasion and extent of colonization. *Plant Soil.* **194**: 81-98.
- Relic, B., F. Talmont, J. Kopcinska, W. Golinowski, J. C. Promé y W. J. Broughton.** 1993. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod-factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 764-774.
- Reitzer, L. J.** 1996a. Sources of nitrogen and their utilization. En: Neidhardt, F.C., CurtisIII, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and UmBarger, H. E. (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. Second Edition-Volume I. pp. 380-390. ASM Press. Washington, D. C., EEUU.
- Reitzer, L. J.** 1996b. Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, asparagine, L-alanine and D-alanine. En: Neidhardt, F.C., CurtisIII, R., Ingraham, J. L., Lin, E. C. C., Brooks Low, K., Magasanik, B., Reznikoff, W. S., Riley, M., Schaechter, M. and UmBarger, H. E. (Eds.) *Escherichia coli* and *Salmonella*, Cellular and Molecular Biology. Second Edition-Volume I. pp. 391-407. ASM Press. Washington, D. C., EEUU.
- Rolfe, B. G., y P. M Gresshoff.** 1988. Genetic analysis of legume nodule initiation. *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* **39**: 297-319.
- Sadowsky, M. J., P. B. Cregan, M. Gottfert, A. Sharma D. Gerhold, F. Rodriguez-Quinones, H. H. Keyser, H. Hennecke y G. Stacey.** 1991. The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene and its involvement in the genotype-specific nodulation of soybeans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **88**: 637-41.
- Sadowski, M. J. y P. H. Graham.** 1998. Soil Biology of the *Rhizobiaceae*. En: The *Rhizobiaceae*. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. H.P. Spaink, A. Kondorosi and P.J.J. Hooykaas (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp 155-172.
- Sadowski, M. J., y P. H. Graham.** 1999. Agricultural and environmental applications of nitrogen fixing organisms. Martínez, E. y G. Hernández, (eds). En *Highlights of Nitrogen Fixation Research*. New York, USA: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 219-223.
- Sahlman, K., y G. Fåhræus.** 1963. An electron microscope study of root-hair infection by *Rhizobium*. *J. Gen. Microbiol.* **33**: 425-427.
- Sanjuan, J., R. W. Carlson, H. P. Spaink, U. R. Bhat, W. M. Barbour, J. Glushka y G. Stacey.** 1992. A 2-O-Methylfucose Moiety is Present in the Lipo-Oligosaccharide

Nodulation Signal of *Bradyrhizobium japonicum*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 8789-8793.

**Sanjuan, J., P. Grob, M. Göttfert, H. Hennecke y G. Stacey.** 1994. NodW is essential for full expression of the common nodulation genes in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Plant-Microbe Int. **7**:364-369.

**Sauer, F. G., M. Barnhart, D. Choudhury , S. D. Knight, G. Waksman y S. J. Hultgren.** 2000. Chaperone-assisted pilus assembly and bacterial attachment. Current Opinion in Structural Biology. **10**: 548-556.

**Schauser, L., A. Roussis, J. Stiller y J. Stougaard.** 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. Nature. **402**: 191-195.

**Schubert, K. R.** 1986. Products of biological nitrogen fixation in higher plants: synthesis transport and metabolism. Annu. Rev. Plant Physiol. **37**: 539-574

**Schubert, S.** 1995. Nitrogen assimilation by legumes-processes and ecological limitations. Fert. Res. **42**:99-107.

**Seneviratne, G. y H. S. Jayasinghearachchi.** 2003. Mycelial colonization by bradyrhizobia and azorhizobia. J. Biosci. **28**: 243-247.

**Shapiro, B. M. y E. R. Stadtman.** 1970. Glutamine synthetase (*E. coli*) Methods Enzymol. **XVII**(A): 910-922.

**Shapiro, L., H. H. Mc Adams y R. Losick.** 2002. Generating and exploiting polarity in bacteria. Science. **298**: 1942-1946.

**Shatters, R. G., Y. Liu y M. L. Kahn.** 1993. Isolation and characterization of a novel glutamine synthetase from *Rhizobium meliloti*. J. Biol. Chem. **268**: 469-475.

**Shaw, V. K. y W. J. Brill.** 1977. Isolation of an iron-molybdenum cofactor from nitrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**: 3249-3253.

**Shaw, S. L. y S. R. Long.** 2003. Nod factor elicits two separable calcium responses in *Medicago truncatula* root hair cells. Plant. Physiol. **131**: 976-984.

**Smit, G., J. W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg.** 1986 Correlation between extracellular fibrils and attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. **168**: 821-827.

**Smit, G., J. W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg.** (1987) Involvement of both cellulose fibrils and a  $Ca^{2+}$ -dependent adhesin in the attachment of *Rhizobium leguminosarum* to pea root hair tips. J. Bacteriol. **169**: 4294-4301.

**Smit G., T. J. Logman, M. E. Boerrigter, J. W. Kijne y B. J. Lugtenberg.** 1989. Purification and partial characterization of the *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae  $Ca^{2+}$ -dependent adhesin, which mediates the first step in attachment of cells of the family Rhizobiaceae to plant root hair tips. J Bacteriol. **171**: 4054-62.

**Smit, G., D., M.,J. Tubbing, J.,W. Kijne y B. J. J. Lugtenberg.** 1991 Role of  $Ca^{2+}$  in the activity of rhicadhesin from *Rhizobium leguminosarum* biovar viceae, which mediates the first step of attachment of *Rhizobiaceae* cells to plant root hair tips. Arch. Microbiol. **155**: 278-283.

**Smit, G., B. J. J. Lugtenberg y J. W. Kijne.** 1992. Molecular mechanisms of attachment of *Rhizobium* bacteria to plant roots. Mol Microbiol. **6**: 2897-2903.

- Smith, R. S.** 1992. Legume inoculant formulation and application. *Can. J. Microbiol.* **38**: 485-492.
- Socolow, R. H.** 1999. Nitrogen management and the future of food: Lessons from the management of energy and carbon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 6001-6008.
- Sosa-Saavedra, F., M. León-Barrios y R. Pérez-Galdona.** 2001. Pentose phosphate pathway as the main route for hexose catabolism in *Bradyrhizobium* sp. lacking Entner-Doudoroff pathway. A role for NAD<sup>+</sup>-dependent 6-phosphogluconate dehydrogenase (decarboxylating). *Soil Biol. Biochem.* **33**: 339-343
- Spaink, H. P., D. M. Sheeley, A. A. N. van Brussel, J. Glushka, W. S. York, T. Tak, O. Geiger, E. P. Kennedy, V. N. Reinhold y B. J. J. Lugtenberg.** 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determines host specificity of *Rhizobium*. *Nature.* **354**: 125-130
- Spaink, H. P.** 1995 The molecular basis of infection and nodulation by rhizobia: the in and out of symbiogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33** : 345-368.
- Stacey, G.** 1995. *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genetics. *FEMS Microbiol. Lett.* **127**: 1-9.
- Stachelin, C., M. Schultze, E. Kondorosi, R. B. Mellor, T. Boller y A. Kondorosi.** 1994b. Structural modifications in *Rhizobium meliloti* Nod Factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *Plant J.* **5**: 319-330.
- Stracke, S., C. Kistner, S. Yoshida, L. Mulder, S. Sato, T. Kaneko, S. Tabata, N. Sandal, J. Stougaard, K. Szczyglowski y M. Parniske.** 2002. A plant receptor-like kinase required for both bacterial and fungal symbiosis. *Nature.* **417**: 959-962.
- Streeter, J.** 1988 Inhibition of legume nodule formation and N<sub>2</sub> fixation by nitrate. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **7**: 1-23.
- Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies y J. W. Costerton.** 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev. Microbiol.* **56**: 187-209.
- Stougaard, J.** 2000. Regulators and regulation of legume root nodule development. *Plant Physiology.* **124**: 531-540.
- Stougaard, J.** 2001. Genetics and genomics of root symbiosis. *Curr Opin Plant Biol.* **4**: 328-335.
- Stowers, M. D.** 1985. Carbon metabolism in *Rhizobium* species. *Annu Rev Microbiol.* **39**: 89-108.
- Streeter, J.** 1988. Inhibition of legume nodule formation and nitrogen fixation by nitrate. *CRC Crit. Rev. Plant. Sci.* **7**: 1-23.
- Stuurman, N., C. P. Bras, H. R. M. Schlaman, A. H. M. Wijffjes, G. Bloemberg, y H. P. Spaink.** 2000. Use of green fluorescent protein color variants expressed on stable broad-host-range vectors to visualize rhizobia interacting with plants. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 1163-1169.
- Tate, R., A. Riccio, M. Merrick y E. J. Patriarca.** 1998. The *Rhizobium etli amtB* gene coding for an NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporter is down-regulated early during bacteroid differentiation. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* **11**: 188-198.

- Tate R., L. Mandrich, M. R. Spinoso, A. Riccio, A. Lamberti, M. Iaccarino y E. J. Patriarca.** 2001. The Rhizobium GstI protein reduces the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> assimilation capacity of *Rhizobium leguminosarum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **14**: 823-831.
- Thies, J. E., P. W. Singleton y B. B. Bohlool.** 1991. Influence of the size of indigenous rhizobial populations on establishment and symbiotic performance of introduced rhizobia on field-grown legumes. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 199-206.
- Timmers, A. C., M. C. Auriac, F. de Billy y G. Truchet.** 1998. Nod factor internalization and microtubular cytoskeleton changes occur concomitantly during nodule differentiation in alfalfa. *Development* **125**: 339-349.
- Toro, N.** 1996. Nodulation competitiveness in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **12**: 157-162.
- Trevelyan, W. E. y J. S. Harrison.** 1952. Studies on yeast metabolism. I. Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. *Biochem. J.* **50**: 298-310.
- Truchet, G., P. Roche, P. Lerouge, J. Vasse, S. Camut, F. de Billy, J-C Promé y J. Dénarié.** 1991 Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.
- Turgeon, B. G. y B. W. Bauer.** 1985. Ultraestructure of infection thread development during the infection of *Rhizobium japonicum*. *Planta.* **163**: 328-349.
- Unkovich, M. J. y J. S. Pate.** 2000. An appraisal of recent field measurements of symbiotic N<sub>2</sub> fixation by annual legumes. *Field Crops Res.* **65**: 211-228.
- van Eijsden, R., C. L. Díaz, B. S. de Pater y J. W. Kijne.** 1995. Sugar-binding activity of pea (*Pisum sativum*) lectin is essential for heterologous infection of transgenic white clover hairy roots by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Plant Mol. Biol.* **29**: 431-9.
- van Rhijn, P., R. B. Goldberg, y A. M. Hirsch.** 1998. *Lotus corniculatus* nodulation specificity is changed by the presence of a soybean lectin gene *Plant Cell.* **10**: 1233-1250.
- van Rhijn P, N. A. Fujishige, P. O. Lim y A. M. Hirsch.** 2001. Sugar-binding activity of pea lectin enhances heterologous infection of transgenic alfalfa plants by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae. *Plant. Physiol.* **126**: 133-44.
- Vande Broek, A. y J. Vanderleyden.** 1995. The role of bacterial motility, chemotaxis and attachment in bacteria-plant interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**: 800-810.
- Verma, D. P. S.** 1992. Signals in root nodule organogenesis and endocytosis of *Rhizobium*. *Plant Cell.* **4**: 373-382.
- Verma D. P. y Z. Hong.** 1996. Biogenesis of the peribacteroid membrane in root nodules. *Trends. Microbiol.* **4**: 364-368.
- Vesper, S. J. y W. D. Bauer.** 1985. Characterization of *Rhizobium* attachment to soybean roots. *Symbiosis.* **1**:139-162.
- Vesper, S. J. y W. D. Bauer.** 1986. Role of pili (fimbriae) in attachment of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 134-141.
- Vesper, S. J., N. S. A. Malik y W. D. Bauer.** (1987). Transposon mutants of *Bradyrhizobium japonicum* altered in attachment to host roots. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 1959-1961.

- Vincent, J. M.** 1970. A manual for the practical study of the root nodule bacteria. IBP Handbook N° 15. Blackwell Scientific Publications, Oxford, UK.
- Vlassak, K. M. y J. Vanderleyden.** (1997). Factors influencing nodule occupancy by inoculant Rhizobia. *Crit. Rev. Plant Sci.* **16**: 163-229.
- Wall, L. G. y G. Favelukes.** 1991. Early recognition in the *Rhizobium meliloti*-alfalfa symbiosis: root exudate factor stimulates root adsorption of homologous rhizobia. *J. Bacteriol.* **173**:3492-3499.
- Wang, S. P. y G. Stacey.** 1990. Ammonia regulation of *nod* genes in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 329-331.
- Wang, S. P. y G. Stacey.** 1991. Studies of the *Bradyrhizobium japonicum* nodD1 promoter: a repeated structure for the nod box. *J. Bacteriol.* **173**: 3356-65.
- Waters, J. K., B. L. Hughes, L. C. Purcell, K. O. Gerhardt, T. P. Mawhinney, y D. W. Emerich.** 1998. Alanine, not ammonia, is excreted from N<sub>2</sub>-fixing soybean nodule bacteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 12038-12042.
- Wilson, J. K.** 1939. Leguminous plants and their associated organisms. Cornell Agric. Exp. Stn. Mem. p. 221.
- Wisniewski, J. P., M. Monsigny y F. M. Delmotte.** 1994. Purification of an  $\alpha$ -L-fucoside binding protein from *Rhizobium lupini*. *Biochimie.* **76**: 121-128.
- Yanni, Y. G., R. Y. Rizk, V. Corich, A. Squartini, K. Ninke, S. Philip-Hollingsworth, G. Orgambide, F. de Bruijn, J. Stoltzfus, D. Buckley, T. M. Schmidt, P. F. Mateos, J. K. Ladha, y F. B. Dazzo.** 1997. Natural endophytic association between *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and rice roots and assessment of its potential to promote rice growth. *Plant Soil.* **194**: 99-114.
- Young, J. P. W.** 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: Biological nitrogen fixation. G. Stacey, R.H. Burris y H.J. Evans (eds.) Chapman y Hall. N.Y., pp. 43-86.
- Zahran, H. H.** 1999. Rhizobium-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in an arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 968-989.
- Zevenhuizen, L. P.** 1981. Cellular glycogen,  $\beta$ -1,2-glucan, poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid and extracellular polysaccharides in fast-growing species of *Rhizobium*. *Antonie van Leeuwenhoek.* **47**: 481-497.
- Zorreguieta, A., y R. A. Ugalde.** 1986. Formation in *Rhizobium* and *Agrobacterium* spp. of a 235-kilodalton protein intermediate in  $\beta$ -D(1,3) glucan synthesis. *J. Bacteriol.* **167**: 947-951.
- Zorreguieta, A., R. A. Geremía, S. Cavaignac, G. A. Cangelosi, E. A. Nester y R. A. Ugalde.** 1988. Identification of the product of an *Agrobacterium tumefaciens* virulence gene. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 121-127.



Biblioteca Central  
Fac. Cs. Exactas  
U.N.L.P.

DONACION.....  
A .....  
Fecha 16-09-04 .....  
Inv. # ..... Inv. # S.F. 760.....