



FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PAMPA

TESINA PRESENTADA PARA OBTENER  
EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIADO EN QUÍMICA

“CONSTRUCCIÓN Y DESARROLLO DE CEPAS MUTANTES CON UNA FUSIÓN  
*nodY::lacZ*, DE DIFERENTES ESPECIES RIZOBIANAS QUE SE ASOCIAN  
SIMBIÓTICAMENTE A LEGUMINOSAS DE IMPORTANCIA ECONÓMICA”.

María Valeria FIORDA GIORDANINO

SANTA ROSA (LA PAMPA)

2008

ARGENTINA

## **Prefacio**

"Esta Tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Licenciado en Química, de la Universidad Nacional de La Pampa y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad ni en otra Institución Académica. Se llevó a cabo en el Instituto de Investigación y Desarrollo en Microbiología y Química Aplicada (IMIQA), dependiente del Departamento de Química, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UNLPam, durante el período comprendido entre el 18 de diciembre de 2007 y el 6 de noviembre de 2008, bajo la dirección de MSc. Fabiola Pagliero; y bajo la codirección de Dra. Graciela Lorda”.

## **Agradecimientos**

En primer lugar quiero agradecer a mi directora, Fabiola, por su dedicación y por toda la confianza depositada en mi persona. También quisiera agradecer a mi codirectora, Graciela, así como a todos los que me acompañaron y ayudaron en el laboratorio: Carola, Mari y Marcelo. Al Departamento de Química de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, a la Facultad y a la Universidad por haber sido los lugares en los que pude desarrollar mi tesina y mi carrera.

A mis compañeros del grupo de trabajo por el apoyo que me brindaron, y en especial a Sofi, que más que compañera fue una hermana en estos años de sacrificio: gracias por tu invaluable amistad. Tampoco me puedo olvidar de todas mis amigas y en especial de Vero y Mariana que, junto con Sofía, supieron darme refugio y alegría.

Quiero agradecer a mis padres por exigirme lo máximo desde el momento en que abrí los ojos y enseñarme que todo es posible con esfuerzo: gracias por confiar en mi cuando parecía que todo era un castillo en el aire. A mi hermano por enseñarme que “en la vida todo es cuestión de decisiones” y mi cuñada, por mostrarme “nuevos horizontes” y alentarme a alcanzarlos. A mi novio por su apoyo incondicional en esta dura etapa de la escritura de la tesis y el comienzo de otra nueva, gracias por tu compañía y cariño. A mi abuela por esas charlas interminables que tanto me sirvieron y tanto extraño. A mi hija, por

sus abrazos, besos, mimos, masajes, llantos y enojos: nada hubiera sido posible sin tu ayuda y colaboración. Perdón por todas esas horas que te “robé”, serán bien recompensadas...

A toda mi familia, a mis compañeros de la licenciatura y el profesorado, a mis profesores y a mis amigos de la vida. A todos mil gracias, nada hubiera sido posibles sin el apoyo de todos.

06 de noviembre de 2008

María Valeria FIORDA GIORDANINO

Departamento de Química

FACULTAD DE CIENCIAS  
EXACTAS Y NATURALES

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA  
PAMPA

## RESUMEN

El desarrollo de inoculantes se ha visto favorecido con el aumento de cultivos de leguminosas. Estudios recientes han demostrado que a altas densidades celulares, estos microorganismos manifiestan un mecanismo denominado *quorum sensing* mediante el cual reprimen los genes necesarios para la nodulación, perjudicando el proceso de simbiosis.

Con el objetivo de estudiar cómo influye el *quorum sensing* en distintas estirpes de rizobios, se construyeron y caracterizaron cepas transformadas, portadoras de la fusión *nod Y::lacZ*. Se transformaron cuatro cepas rizobianas simbiotes de soja, alfalfa, maní y poroto. Para la construcción, se movilizó el plásmido TCD900, portador de la fusión *nod Y::lacZ*, por conjugación biparental, desde una célula de *E. coli* DH5 $\alpha$  a la que había sido introducido. Para la caracterización, se compararon dos puntos en la curva de crecimiento, se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se compararon los *fingerprints* de las cepas parentales y las transformadas, y se comprobó la capacidad de nodulación en un ensayo en plantas.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa confirmó la presencia del plásmido en las cepas obtenidas, y en ensayos en plantas se comprobó que dicha introducción no inhibía la capacidad de nodulación. Los *fingerprints* arrojaron el mismo patrón de bandas, probando que se trataba de la misma cepa. Sin embargo, los puntos de la curva de crecimiento mostraron que las cepas transformadas tenían un desfase en el crecimiento en comparación con las cepas parentales (menor velocidad de crecimiento), lo que se explica debido a la necesidad de crecer en un medio con antibióticos, utilizados para seleccionarlas.

# **INDICE**

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
1. Fijación biológica del nitrógeno.....	1
2. Rizobios y su destacada simbiosis con las planta.....	2
2.1 Nodulación.....	2
2.2 Factores y genes <i>nod</i> .....	3
3. <i>Quorum sensing</i> .....	5
3.1 Conceptos generales.....	5
3.2 <i>Quorum sensing</i> en <i>Rhizobium</i> .....	6
3.2.1 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> y bradióxetina.....	7
3.2.2 <i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> .....	8
3.2.3 <i>Sinorhizobium meliloti</i> .....	9
4. Transformación de rizobios por conjugación biparental.....	10
5. REP-PCR como técnica para diferenciar cepas. ....	10
<b>Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>12</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>13</b>
1. Microorganismos.....	13
2. Conservación de cepas <i>wild type</i> y transformadas.....	14
2.1 Conservación a corto plazo.....	14
2.2 Conservación a largo plazo.....	15
3. Medios de cultivo.....	15
3.1 Medios de cultivo con antibióticos.....	18
4. Determinación del crecimiento celular.....	18
4.1 Determinación de la densidad óptica.....	18
4.2 Recuento de células viables.....	19
5. Aislamiento de mutantes espontáneos de resistencia a antibióticos.....	19
6. Transformación de células de rizobios.....	19
6.1 Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	19

6.2 Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	20
6.3 Transformación de células de rizobios mediante conjugación biparental.....	20
7. Análisis genómico de cepas parentales, de mutantes espontáneas resistentes a antibióticos y de transconjugantes.....	21
7.1 Extracción de ADN a partir de colonias bacterianas.....	21
7.2 Obtención de perfiles de <i>fingerprints</i> de ADN.....	22
8. Evaluación de producción de $\beta$ -galactosidasa.....	22
8.1 Evaluación en placa.....	22
8.2 Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.....	23
9. Ensayo en plantas.....	25
9.1 Semillas.....	25
9.2 Esterilización de semillas y pre-germinación.....	25
9.3 Ensayo en tubos.....	26
9.4 Ensayo en plantas.....	27
10. Análisis Estadístico.....	28
<b>Resultados.....</b>	<b>29</b>
1. Selección de los medios de cultivos.....	29
2. Obtención de cepas transformadas.....	29
2.1 Selección de cepas resistentes a antibióticos.....	30
2.2 Transconjugación.....	30
3. Curva de Crecimiento.....	30
3.1 <i>Sinorhizobium meliloti</i> B-399.....	31
3.2 <i>Bradyrhizobium japonicum</i> E-109.....	32
3.3 <i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899.....	34
3.4 <i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144.....	35
3.5 Observación general.....	36
4. Análisis Genómico de las cepas <i>wild type</i> y transformadas.....	37
4.1 Observación General.....	38
5. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.....	38
5.1 Evaluación en placa.....	39
5.1.1 Observación General.....	40
5.2 Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa.....	40
5.2.1 Observación General.....	41

6. Ensayo en plantas.....	41
6.1 Observación general.....	44
<b>Conclusiones y líneas futuras de trabajo.....</b>	<b>45</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>46</b>

# **INTRODUCCIÓN**

## **1. Fijación biológica del nitrógeno**

El nitrógeno es un constituyente esencial de moléculas fundamentales de todos los seres vivos: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, vitaminas, etcétera. La atmósfera contiene alrededor de  $10^{15}$  toneladas de gas  $N_2$ , y el ciclo del nitrógeno involucra la transformación de unas  $3 \times 10^9$  toneladas de  $N_2$  por año. Para que el  $N_2$  atmosférico pueda ser asimilado, es necesario que sea reducido (o fijado). Los únicos seres vivos capaces de realizar esta reacción son las *Eubacteria* y *Archaea*, por el proceso denominado fijación biológica de nitrógeno (FBN), (Baca y col., 2000). La fijación biológica de nitrógeno es un proceso clave en la biosfera, por el cual los microorganismos portadores de la enzima nitrogenasa convierten el nitrógeno gaseoso en nitrógeno combinado (Wang y col., 2001). La fijación del nitrógeno funciona en bacterias adaptadas en ambientes ecológicos y estilos de vida muy diversos (Baca y col., 2000).

Las transformaciones del nitrógeno atmosférico en formas asimilables no son exclusivamente biológicas: las radiaciones ultravioleta representan el 10% del aporte global; la industria de los fertilizantes aporta un 25%, por lo que la FBN corresponde al 65% aproximadamente. Debido a las exigencias actuales en la agricultura con respecto al rendimiento, se predice que los requerimientos de fertilizantes nitrogenados aumentarán en el futuro; sin embargo, con la tecnología actual de producción de fertilizantes y los métodos de aplicación empleados que resultan poco eficientes, así como el costo y la contaminación ecológica que producen, su uso se hace cada vez más prohibitivo (Baca y col., 2000).



## **2. Rizobios y su destacada simbiosis con las plantas**

El grupo de bacterias al que se conoce colectivamente como rizobios, inducen en las raíces (o en el tallo) de las leguminosas la formación de estructuras especializadas, los nódulos, dentro de los cuales el nitrógeno gaseoso es reducido a amonio. En esta simbiosis, la planta huésped obtiene nutrientes nitrogenados de la bacteria (rizobios) y ofrece a ésta una fuente de carbono y un ambiente favorable para fijar nitrógeno (Wang y col., 2001).

### **2.1 Nodulación**

La nodulación de leguminosas por rizobios es un fenómeno que requiere una serie de interacciones bioquímicas entre la bacteria y su huésped (Figura 1). El inicio de este diálogo molecular se da cuando la bacteria sufre quimiotaxis hacia las raíces de la planta y altera el crecimiento de los pelos epidérmicos en la superficie de las raíces de tal manera que estos se curvan. Posteriormente, la bacteria induce la división celular en las células normales de la corteza interna de la raíz, lo que lleva al establecimiento de un meristema nodular. Las bacterias atrapadas en el pelo radicular curvado inducen la formación de un canal de infección que penetra las células mientras las bacterias proliferan dentro. Mientras el nódulo se desarrolla, el canal de infección se ramifica y penetra en células blanco individuales. Las bacterias quedan rodeadas por una membrana de origen vegetal y luego son liberadas en el citoplasma de estas células. Una vez libres, las bacterias se diferencian en formas morfológicamente alteradas denominadas bacteroides y comienzan a sintetizar la enzima nitrogenasa y otras proteínas requeridas para la fijación de nitrógeno. Las células vegetales también se diferencian y expresan un número de proteínas específicas de nódulos, tales como leghemoglobina. La interacción simbiótica da como resultado la reducción del nitrógeno atmosférico por los bacteroides, que es luego utilizado por la planta huésped que provee compuestos carbonados al rizobio (González y Marketon, 2003).

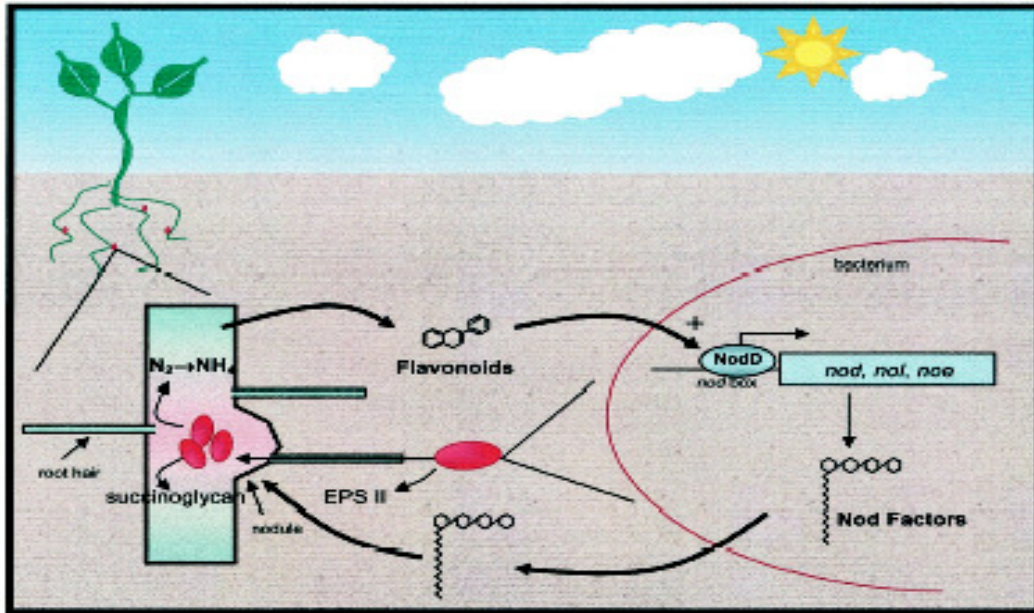


Figura 1.- Etapas del diálogo molecular entre los rizobios y las leguminosas, (González y Marketon, 2003).

## 2.2 Factores y genes *nod*

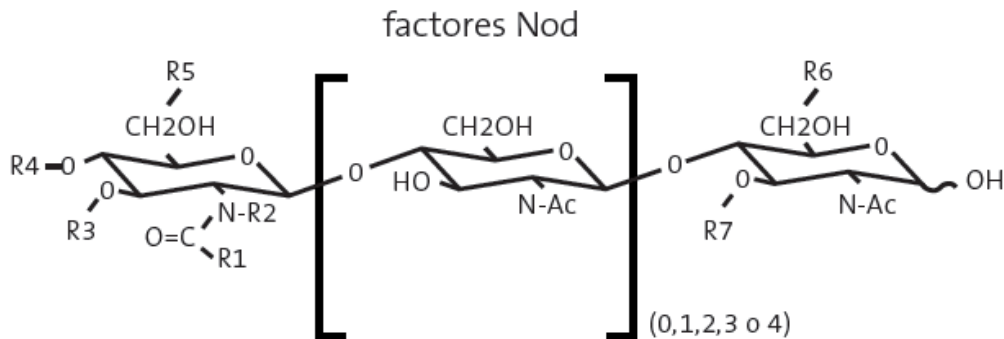
Varios genes bacterianos son esenciales para la simbiosis. Entre estos se encuentran los genes de nodulación, designados como genes *nod* y *nol*. La organización de estos genes en operones es bastante similar en *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* spp. En las especies de crecimiento rápido de *Rhizobium*, los genes *nod* se ubican en el plásmido Sym mientras que en *Bradyrhizobium* y *Azorhizobium* spp. se ubican en el cromosoma. Los genes *nod* comunes comprenden a *nodA*, *-B*, *-C*, *-I*, y *-J*, todos localizados en un operón, de los cuales *nodABC* son esenciales para la nodulación. Otro gen esencial es *nodD*, que se comporta como un gen *nod* común en algunas plantas huéspedes mientras que en otros casos representa un importante determinante de especificidad con su huésped (Schlaman y col., 1992).

Las proteínas codificadas por los genes de nodulación rizobianos (*nod*, *nol* y *noe*) están involucradas en la síntesis y secreción de los factores Nod. La expresión de estos genes es inducida cuando las bacterias perciben moléculas específicas (en general flavonoides) que son secretadas por la raíz de la planta. Los flavonoides activan la transcripción del regulador transcripcional NodD que a su vez, induce la transcripción de otros genes de nodulación de la bacteria involucrados en la síntesis de los factores Nod (Geurts y

Bisseling, 2002). La estructura básica de los factores Nod (Figura 2) producidos por diferentes especies rizobianas es bastante similar. La mayoría de los factores Nod descritos hasta la fecha consisten en un esqueleto básico de 3, 4 o 5 residuos de N-acetil-D-glucosamina, unidos por enlaces  $\beta$ -1,4, modificados (“decorados”) químicamente, dependiendo de cada especie de rizobio (Downie, 1998; Quinto y Cárdenas, 2007).

Las diferencias en la estructura de los factores Nod sintetizados por especies rizobianas diferentes están determinadas por la presencia de genes de nodulación especie específicos o por variaciones alélicas que resultan en una diferente actividad de las enzimas codificadas. En general, las sustituciones en los residuos terminales y la estructura de la cadena acilada tienen un rol en la habilidad de la bacteria para interactuar con su planta huésped. Por ejemplo, la decoración con un grupo sulfato del factor Nod de *S. meliloti* es el determinante más importante de especificidad con el huésped ya que es requerido para la inducción de casi todas las respuestas simbióticas. A su vez, el grupo O-acetato tanto como la estructura de la cadena acilada es especialmente requerida para una infección eficiente (Geurts y Bisseling, 2002). Sin embargo, la estructura básica requiere solamente de la acción de tres productos de genes: NodA, NodB y NodC. Este último es una N-acetilglucosaminil transferasa que produce el esqueleto de quitina desde UDP-N-acetilglucosamina. NodB remueve un grupo acetilo del residuo terminal del oligómero de quitina, y NodA cataliza la transferencia de una cadena de un ácido graso en el grupo amino libre resultante (Hirsch y col., 2001).

Los factores Nod inducen respuestas en sus huéspedes a concentraciones picomolares. Por tanto, usualmente se sugiere que los factores Nod son reconocidos por receptores de alta afinidad (Geurts y Bisseling, 2002).



**Figura 2.- Estructura general de los factores Nod producidos por los rizobios.**

Los factores Nod purificados son capaces de inducir en la planta reacciones similares a las que producen los rizobios. De modo significativo, son capaces de inducir la división en células ya diferenciadas del cortex de la planta. Es por ello que a los factores Nod se les llama morfógenos y se ha sugerido que su estructura podría imitar señales u hormonas de la propia planta, aún no identificadas (van Rhijn y Vanderleyden, 1995; López-Lara 2004).

### **3. Quorum sensing**

#### **3.1.- Conceptos Generales**

El *quorum sensing* es un proceso basado en la producción de moléculas que sirven como señales, cuya concentración depende de la densidad del organismo que la produce. Una vez que estas moléculas o autoinductores alcanzan el umbral de detección, inducen diferentes fenómenos en la célula (Colón-González y Membrillo-Hernández, 2004). El *quorum sensing* es ampliamente utilizado por una variedad de especies bacterianas gram-positivas y gram-negativas para coordinar el comportamiento comunitario. Usualmente involucra la regulación de genes específicos en respuesta a la densidad celular. Esta expresión de genes coordinada es lograda por la producción, liberación y detección de pequeñas moléculas señal denominadas autoinductores. A baja densidad poblacional, los niveles basales de expresión del gen que codifica la síntesis del autoinductor conducen a la producción de bajos niveles de moléculas señal autoinductoras, que al difundir fuera de la célula, son inmediatamente diluidas por el medioambiente que lo rodea. Un aumento en la población bacteriana resulta en una acumulación de autoinductores dentro y fuera de la célula. El autoinductor activa específicamente un regulador transcripcional proteico mediante su unión al mismo. Los reguladores activados actúan entonces con secuencias de ADN específicas y aumentan o inhiben la transcripción de los genes regulados por *quorum sensing*, resultando en la activación sincrónica de ciertos fenotipos en las poblaciones bacterianas. Las bacterias utilizan el mecanismo de *quorum sensing* para regular una variedad de fenotipos, tales como la formación de un biofilm, la producción de toxinas, la producción de polisacáridos, la producción de factores de virulencia y la motilidad, que son esenciales para establecer una relación simbiótica o patogénica con su respectivo huésped eucariótico (González y Keshavan, 2006). El mecanismo de quórum-sensing

mejor caracterizado se encuentra en bacterias gram-negativas e involucra el uso de acil-homoserina lactonas (AHLs) como moléculas señal (González y Marketon, 2003).

### 3.2.- *Quorum sensing* en *Rhizobium*

Además de las moléculas señal involucradas en el proceso de nodulación (flavonoides, factores Nod y exopolisacáridos, etc.), dentro de la lista de señales simbióticas pueden considerarse ahora las acil-homoserina lactonas (AHLs). Varios fenómenos han sido asociados recientemente al *quorum sensing* (Tabla 1), entre ellos: eficiencia y establecimiento en la nodulación, desarrollo del simbiosoma, producción de exopolisacárido (EPS) y fijación de nitrógeno, siendo todos estos importantes en el establecimiento del simbiosoma (González y Marketon, 2003, Sánchez-Contreras y col., 2007).

<b>Tabla 1: Fenómenos regulados por acil-homoserina lactonas en distintas cepas rizobianas.</b>		
<b>Organismo</b>	<b>AHLs</b>	<b>Fenómenos Regulados</b>
<i>Rhizobium leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i>	3-OH-C <sub>14:1</sub> -HSL C6-HSL, C7-HSL, C8-HSL 3-oxo-C8-HSL, C8-HSL	Inhibición del crecimiento Eficiencia de nodulación. Transferencia de plásmido.
<i>Rhizobium etli</i> CNPAF512	3-OH-(slc)-HSL	Fijación de nitrógeno, desarrollo del simbiosoma, inhibición del crecimiento.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> Rm1021	3-oxo-C14-HSL, C16:1-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL, 3-oxo-C16-HSL, C18-HSL, C12-HSL	Producción de EPS.
<i>Rhizobium</i> sp. NGR234	3-oxo-C8-HSL	Transferencia de plásmido, inhibición del crecimiento.
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> USDA110	Bradioxetina	Control de los genes <i>nod</i>

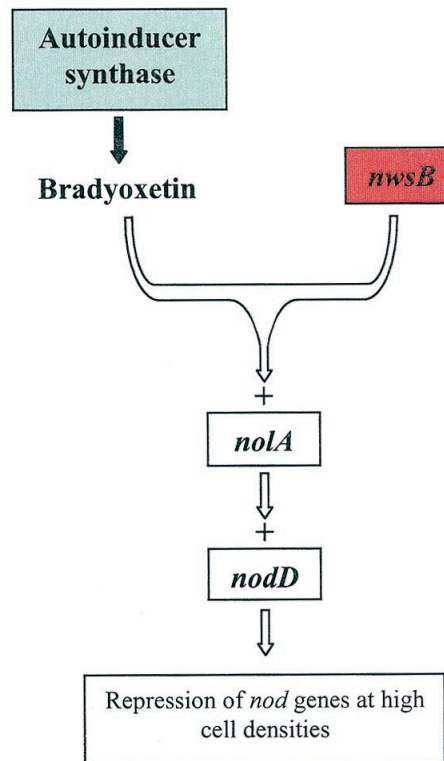
Una de las características centrales del *quorum sensing* en *Rhizobium* es la diversidad, dado que no hay dos cepas analizadas en detalle que tengan el mismo complemento de sistemas de *quorum sensing*, aún cuando esas comparaciones estén limitadas a dos aislamientos diferentes dentro de una misma especie. La diversidad sugiere que puede que no haya un paradigma unificador en cuanto a qué aspectos son controlados por *quorum sensing* en los rizobios. Hay reguladores de *quorum sensing* y AHL sintetas claramente conservadas entre distintas especies y géneros, pero aún en estos casos resulta que grupos diferentes de genes pueden ser controlados de manera diferente por sintetas y reguladores ortólogos en diferentes especies. El rango de genes regulados está comenzando a ser identificado en los rizobios cultivables, pero se conoce muy poco sobre el rango de genes rizobianos regulados en los ambientes del suelo, la rizósfera o la planta (Sánchez-Contreras y col., 2007).

### **3.2.1 *Bradyrhizobium japonicum* y bradióxetina**

Al estudiar el fenómeno de *quorum sensing*, se destaca el caso de *Bradyrhizobium japonicum* (*B. japonicum*). Estudios recientes muestran que tanto la eficiencia en la nodulación como la velocidad de aparición de los nódulos se ven reguladas por mecanismos de *quorum sensing* (Jitackorn y Sadowsky, 2008). Si bien los primeros estudios indicaron que los genes *nod* eran reprimidos a densidades celulares altas, no se pudo evidenciar la intervención de acil-homoserina lactonas en esta respuesta. Sin embargo, se encontró que este control dependiente de la densidad poblacional se encontraba ligado a la producción de una molécula señal extracelular denominada CDF (de la sigla en inglés “cell density factor”) o bradióxetina. Su síntesis se encontraba regulada por el hierro, siendo máxima su producción en ausencia del mismo (González y Marketon, 2003).

En *B. japonicum* y otros rizobios, la nodulación requiere la expresión coordinada de varios genes *nod* (*nod*, *nol* y *noe*) para producir los factores Nod. La regulación de la expresión de los genes *nod* en bradirizobios es compleja y ocurre a través de tres vías regulatorias que involucran los genes *nodD*, *nodVW* y *nolA*. *B. japonicum* produce dos proteínas NodD (NodD1 y NodD2) con diferentes funciones. NodD1 es un activador transcripcional positivo y responde a isoflavonas secretadas por la planta, como genistéina y daidzeína, mientras que NodD2 actúa como represor de la expresión de *nodD1* (Jitackorn y Sadowsky, 2008).

La bradióxetina es parte de un sistema de dos componentes junto con la proteína NwsB. Este sistema induce el gen *nolA*, que a su vez induce a *nodD2*, lo que conduce a la represión de los genes *nod* (Figura 3).



**Figura 3.- Mecanismo de regulación de los genes *nod* en *B. japonicum* (González y Marketon, 2003).**

### 3.2.2 *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

De los rizobios fijadores de nitrógeno, el fenómeno de *quorum sensing* se encuentra mejor caracterizado en *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (*R. leguminosarum* bv. *viciae*). Varios sistemas de *quorum sensing* (*rai*, *rhi*, *cin* y *tra*) han sido identificados y se encuentran interrelacionados en una compleja red regulatoria. Los primeros trabajos realizados se concentraron en el sistema *rhi*, compuesto por *rhiR* (un homólogo de *luxR*), *rhiI* (un homólogo de *luxI*), y el operon *rhiABC*, todos localizados en el plásmido simbiótico pRL1JI. Se demostró que *rhiABC* era controlado por *RhiR* y que los flavonoides reprimían la expresión tanto de *rhiR* como de *rhiABC*. Aunque se desconoce la función de *rhiABC*, se demostró que *rhiA* es altamente expresado en la rizósfera pero no en

los bacteroides. Además, las mutaciones tanto en *rhiA* como en *rhiR* llevan a una disminución en el número de nódulos, pero sólo en combinación con un mutante *nodFE*, llevando a formular la hipótesis de que el operon *rhi* debe tener un rol en las etapas tempranas del proceso simbiótico, así como los genes *nod*. Investigaciones recientes identificaron el gen *rhiI* y mostraron que éste era responsable de la síntesis de varias acil-homoserina lactonas de cadena corta, incluyendo C6-HSL, C8-HSL, y otro compuesto comigrante con C7-HSL (González y Marketon, 2003).

### 3.2.3 *Sinorhizobium meliloti*

La regulación por *quorum sensing* ha sido examinada en dos cepas diferentes de *Sinorhizobium meliloti* (*S. meliloti*), pero ha sido analizado más extensamente en la cepa 1021, cuyo genoma ha sido secuenciado, que en la otra (Rm41/AK631). El producto del gen *sinI* produce varias acil-homoserina lactonas de cadena larga incluyendo C12-HSL, C14-HSL, 3-oxo-C14-HSL, C16-HSL, C16:1-HSL, 3-oxo-C16-HSL, 3-oxo-C16:1-HSL y C18-HSL, cuya mezcla varía según el medio de cultivo utilizado. Hasta ahora, SinI parece ser la única sintasa de la cepa 1021. Una mutación de *sinI* conduce a cambios en la acumulación de 35 proteínas diferentes y la expresión de alrededor de 100 genes en cultivos de laboratorio. Fenotípicamente, los mutantes de *sinI* mostraron:

- Deficiencia en la producción de mucosidad.
- Reducción significativa en la velocidad y eficiencia de la iniciación de la nodulación.
- Incapacidad de aglutinarse en placas con agar.

El gen *sinR* es adyacente a *sinI* en el cromosoma, y SinR induce la expresión de *sinI* en respuesta a las acil-homoserina lactonas sintetizadas por SinI, aumentando entonces la producción de acil-homoserina lactonas de 3 a 10 veces en experiencias in vitro. La mutación en *sinR* produce un leve retraso de la nodulación.

En la cepa 1021, el gen *expR* que codifica un regulador del tipo LuxR es interrumpido por una secuencia nativa de inserción. La escisión espontánea de la secuencia de inserción genera un ExpR funcional que regula la expresión de varios genes, incluyendo aquellos en el operón *exp* requeridos para la síntesis de EPSII. Éste es uno de los tres polisacáridos de *S. meliloti* capaces de inducir respuestas en el huésped que permiten la infección. Aunque el mutante *expR* no tiene un fenotipo nodulatorio, tiene niveles significativamente alterados de casi 50 proteínas y de la expresión de más de 80 genes en los cultivos de laboratorio.



Estos genes y proteínas regulan un amplio rango de funciones incluyendo el metabolismo central y la regulación, transporte, transposasas, motilidad y comportamientos simbióticos relacionados (Sánchez Contreras y col., 2007).

#### **4. Transformación de rizobios por conjugación biparental**

La construcción de cepas rizobianas transformadas con fusiones del tipo *nod::lacZ* se puede realizar por conjugación biparental (Ditta y col., 1980), electroporación (Gard y col., 1999) o por la técnica de freezing (Vincze y Bowra, 2006).

La conjugación bacteriana es un proceso de transferencia genética que requiere contacto célula a célula. La conjugación es un mecanismo que está codificado en un plásmido. Un plásmido conjugativo usa este mecanismo para transferir una copia de sí mismo al nuevo hospedador.

La construcción de cepas transformadas con fusiones *nod::lacZ* ha sido utilizada en muchos trabajos para estudiar el nivel de expresión de los genes involucrados en la nodulación bajo determinadas condiciones (Mulligan y Long, 1985; Djordjevic y col., 1987).

#### **5. REP-PCR como herramienta para diferenciar cepas**

La técnica de REP-PCR para analizar fingerprints de rizobios fue descrita por primera vez por De Bruijn (De Bruijn, 1992).

La REP-PCR es una técnica de tipificación en la que se utilizan cebadores que hibridan con elementos bien definidos dentro del ADN que se repiten frecuentemente dentro del genoma (secuencias rep). Estos elementos repetitivos son comunes entre los organismos procariontes y se encuentran altamente conservados en cada generación. Con esta técnica se amplifican las regiones que separan las secuencias rep, por lo que el polimorfismo resulta de la variabilidad en la repetición de dichas secuencias y de la distancia entre copias contiguas causadas por inserciones o deleciones de ADN (Fernández-Cuenca, 2004). Se

pueden utilizar cebadores selectivos para unirse y amplificar estos elementos repetitivos, que luego de la electroforesis forman un patrón de bandas único para cada especie y cepa de bacterias (Versalovic y col., 1991). Estos patrones se denominan comúnmente *fingerprints* o huellas dactilares.

La técnica de REP-PCR se caracteriza por su simplicidad (no requiere el uso de enzimas de restricción, ni técnicas electroforéticas especiales), rapidez (menos de 24 h) y su relativo bajo costo, una vez que se dispone de un termociclador.

Los cebadores utilizados, según su secuencia se denominan ERIC, REP y BOX. La amplificación de secuencias por REP-PCR es utilizada frecuentemente para estudiar la relación clonal en diversas bacterias gramnegativas y su resolución permite obtener patrones de bandas diferentes para distintas cepas, en una misma especie. Comparados con las secuencias REP, las ERIC son un grupo distinto de elementos repetitivos aunque puede que ambos tengan la misma función en el genoma bacteriano. Los patrones de ADN que se obtienen con la ERIC-PCR suelen ser menos complejos que los generados mediante REP-PCR y más complejos que los BOX-PCR (Fernández-Cuenca, 2004).

## HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo de tesina se enmarca en un proyecto de investigación que estudia la influencia del *quorum sensing* sobre la regulación de los genes de nodulación en distintas cepas de rizobios.

Las hipótesis planteadas en el siguiente trabajo de tesina son:

- La construcción de cepas rizobianas transformadas con una fusión *nodY::lacZ* es posible mediante la técnica de conjugación biparental.
- Las cepas transformadas podrán ser utilizadas para evaluar en un futuro el nivel de expresión de los genes *nod*, ya que no mostrarán diferencias con las cepas parentales en cuanto a sus características simbióticas, cinéticas y genómicas.

Los objetivos del presente trabajo son:

- Construir, desarrollar y conservar cepas mutantes con una fusión *nodY::lacZ*, simbioses de diferentes leguminosas, para, en un futuro, realizar estudios que permitan definir cuáles son las condiciones que afectan al sistema de *quorum sensing*.
- Caracterizar las cepas mutantes junto con las parentales, con el fin de evaluar la factibilidad de su uso en posteriores estudios; para comparar el crecimiento, la capacidad de nodulación, los *fingerprints* de DNA y el nivel de expresión de la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Microorganismos

Los microorganismos utilizados en el trabajo se detallan en la Tabla 2.

Las cepas *Bradyrhizobium japonicum* E-109, *Sinorhizobium meliloti* B-399 y *Sinorhizobium fredii* USDA 205 fueron cedidas gentilmente por el Ingeniero Alejandro Peticari (INTA-IMYZA Castelar), mientras que las cepas *Bradyrhizobium* sp. SEMIA 6144 y *Rhizobium tropici* CIAT 899 fueron cedidas gentilmente por el Dr. Jorge Angelini de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

<b>Tabla 2: Características y procedencia de los microorganismos utilizados en el trabajo.</b>			
<b>MICROORGANISMO</b>	<b>ABREVIATURA</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>	<b>PROCEDENCIA</b>
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E-109	E-109 wt		INTA Castelar
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E-109 str <sup>R</sup>	E-109 str <sup>R</sup>	Resistencia a estreptomina	Este trabajo
<i>Bradyrhizobium japonicum</i> E-109 V1	E-109 V1	Portadora del plásmido TCD900, resistencia a estreptomina	Este trabajo
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B-399	B-399 wt		INTA Castelar
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B-399 str <sup>R</sup>	B-399 str <sup>R</sup>	Resistencia a estreptomina	Este trabajo
<i>Sinorhizobium meliloti</i> B-399 V2	B-399 V2	Portadora del plásmido TCD900, resistencia a estreptomina	Este trabajo
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899	CIAT wt		Universidad Nacional de Río Cuarto
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 spc <sup>R</sup>	CIAT spc <sup>R</sup>	Resistencia a espectinomicina	Este trabajo
<i>Rhizobium tropici</i> CIAT 899 V3	CIAT V3	Portadora del plásmido TCD900, resistencia a espectinomicina	Este trabajo

<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144	SEMIA wt		Universidad Nacional de Río Cuarto
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 str <sup>R</sup>	SEMIA str <sup>R</sup>	Resistencia a estreptomycin	Este trabajo
<i>Bradyrhizobium</i> sp. SEMIA 6144 V4	SEMIA V4	Portadora del plásmido TCD900, resistencia a estreptomycin	Este trabajo
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	TAL1000	Resistencia a tetraciclina, fusión <i>nodA::lacZ</i>	Universidad Nacional de Río Cuarto
<i>Bradyrhizobium</i> sp.	NT1	Resistencia a tetraciclina, fusión <i>nodA::lacZ</i>	Universidad Nacional de Río Cuarto
<i>Escherichia Coli</i> DH5 $\alpha$			Universidad Nacional de Río Cuarto
<i>Escherichia Coli</i> TCD900		Portadora del plásmido TCD900.	Dr Gary Stacey, Missouri

El plásmido TCD900 contiene un gen de resistencia a tetraciclina y es portadora de la fusión *nodY::lacZ*.

## **2. Conservación de cepas *wild type* y transformadas**

En función de la programación de los ensayos, se necesitó contar con cultivos viables de las cepas estudiadas. Para ello se realizó una conservación de las mismas, a corto y a largo plazo.

### **2.1 Conservación a corto plazo**

Para conservar las cepas a corto plazo se realizaron tubos con agar inclinado, conteniendo medio YEM (Vincent, 1970) y se mantuvieron a 4°C en la heladera cubriendo el tapón con film plástico para evitar la deshidratación del medio. El medio YEM se encuentra descrito en la Tabla 3.

## 2.2 Conservación a largo plazo

Para conservar las cepas a largo plazo se transfirieron asépticamente 600 µl de cultivo a un eppendorf estéril conteniendo 400 µl de glicerol y se homogeneizó en un vórtex. Los eppendorf se mantuvieron a -20°C en el freezer.

## 3. Medios de Cultivo

Para la determinación de la cinética de crecimiento se utilizaron los medios de cultivo mínimos M9 (Sambrook et al., 1989) y MSM (Brown y Dilworth, 1975), con distintas fuentes de carbono para el desarrollo de las cepas, mientras que para realizar los recuentos en placa se utilizó el medio YEM. Los medios M9 y MSM se encuentran descritos en las Tablas 4 y 5 respectivamente.

En la obtención de las cepas transformadas, se utilizó el medio LB glucosado (Miller, 1972) para el crecimiento de *E. coli* y el medio 20E para el crecimiento de rizobios (Werner, 1975). La formulación de los medios de cultivo se encuentra en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

Todos los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121° C durante 20 minutos luego de ajustar el pH en 6.8-7.0.

<b>TABLA 3.-Composición del medio de cultivo YEM</b>	
Componente	Concentración (g/l)
Manitol	10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.1
Levadura	0.4
Agar	15
Rojo congo	10 ml/l

<b>TABLA 4.- Composición del medio mínimo de cultivo M9</b>	
Componente	Concentración (g/l)
Solución de sales 5X	200 ml/l
MgSO <sub>4</sub>	0.493
CaCl <sub>2</sub>	0.015
Fuente de C	20 ml de una Sc. al 20%

Solución de sales 5X	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	64
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15
NaCl	2.5
NH <sub>4</sub> Cl	5

<b>TABLA 5.- Composición del medio mínimo de cultivo MSM</b>	
Solución Stock	Cantidad por litro de Sc.
1-. Solución de sales	50 ml
2-. Fe EDTA	500 µl
3-. Vitaminas y Minerales	500 µl
4-. Buffer HEPES	4.766 g
5-. Fuente de N	2 ml
6-. Fuente de C	20 ml

1-. Solución de sales	
MgSO <sub>4</sub>	5 g
NaCl	4
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.4
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1

2-. Fe EDTA	
Fe EDTA	15

3-. Vitaminas y Minerales	
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.23
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.25
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.14
CaCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.001
Tiamina.HCl	1
Pantotenato de Ca	2

Biotina	0.001
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.02
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.16

4-. Buffer	
HEPES	20mM (pH 7)

5-. Fuente de N	
Sc. de NH <sub>4</sub> Cl 5M pH 5.5-6.5	

6-. Fuente de Carbono	
Glucosa, manitol o glicerol	10 mM

<b>TABLA 6.- Composición del medio de Cultivo LB glucosado</b>	
Componente	Concentración (g/l)
Glucosa	1
NaCl	5
Triptona	10
Ext. de Levadura	5
Agar	15

<b>TABLA 7.- Composición del medio de cultivo 20E</b>	
Componente	Concentración (g/l)
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.0860
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0870
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.370
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.0735
KNO <sub>3</sub>	0.506
FeSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0.00695
EDTA	0.00930
NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.00484
Glicerol	4.6 ml
Manitol	1.82
Ext. Levadura	2.00



### 3.1 Medios de cultivo con antibióticos

En el caso que fue necesario, los medios se suplementaron con antibióticos en las concentraciones que se indican en la Tabla 8.

La adición de antibióticos a los medios de cultivo se realizó a partir de soluciones concentradas de los mismos en agua deionizada y posterior esterilización con unidades de filtración Minisart® NML (Sartorius) de 0,2 µm de tamaño de poro. En el caso de las soluciones de tetraciclina se empleó una mezcla hidroalcohólica etanol:agua 1:1 para disolver el antibiótico.

<b>Antibiótico</b>	<b>Concentración (µg/ml)</b>	
	<b>Rizobios</b>	<b><i>E. coli</i></b>
Cloruro de espectinomicina (Spc)	400	-
Sulfato de estreptomycinina (Str)	400	-
Cloruro de tetraciclina (Tc)	150	10.0

## 4. Determinación del crecimiento celular

El crecimiento celular se siguió por determinación de la densidad óptica y mediante recuento de células viables en placas con medio agarizado (Somasegaran y Hoben, 1994). Se realizó un registro del pH para controlar la evolución del crecimiento.

### 4.1 Determinación de la densidad óptica

La densidad óptica se determinó en un espectrofotómetro Metrolab 1700 ultravioleta-visible, haz simple a una longitud de onda de 550 nm utilizando como blanco agua destilada.

#### **4.2 Recuento de células viables en placa**

Para realizar el recuento en placa se hicieron las diluciones correspondientes y se sembraron las placas conteniendo medio YEM. Las placas se mantuvieron a 29°C hasta observarse colonias (el tiempo de cultivo varía para cada microorganismo). Se contaron aquellas placas que tenían entre 30 y 300 colonias.

### **5. Aislamiento de mutantes espontáneos de resistencia a antibióticos**

Se aislaron mutantes espontáneos para estreptomicina (str) y para espectinomicina (spc) en *B. japonicum* E-109, *S. meliloti* B-399, *R. tropici* CIAT 899 y *B. sp.* usando el protocolo descrito por Somasegaran et al (1994).

Se sembraron 0.1 ml de cada cultivo en medio de cultivo 20E en placas conteniendo: medio YEM y estreptomicina (400µg/ml), YEM y espectinomicina (400 µg/ml) y YEM sin antibióticos. Se incubaron las placas a 25-30°C durante 5-9 días (de acuerdo a la velocidad de crecimiento de cada microorganismo). Las colonias resistentes obtenidas se plaquearon en medio YEM con rojo congo suplementado con antibióticos; las colonias aisladas blanco-rosadas obtenidas en este medio, se utilizaron para posteriores experimentos y para conservarlas como stock para el desarrollo de futuros trabajos.

### **6. Transformación de células de rizobios**

La transformación de células rizobianas se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Ditta et al. (1980).

#### **6.1 Preparación de células competentes de *E. coli***

Para la preparación de células competentes de *E. coli* se cultivó *E. coli* DH5α, durante 12-15 h en medio LB y se inoculó 1 ml en 20 ml de medio LB. Se incubó a 37 °C hasta que el

cultivo alcanzó una  $DO_{550}$  de 0,4-0,6 (fase exponencial de crecimiento). Se detuvo el crecimiento colocando el cultivo en hielo durante 15 minutos. Se sedimentaron las células mediante centrifugación (6.000 r.p.m., 6 minutos, 4°C) y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 10 ml de  $MgCl_2$  100 mM, estéril y preenfriado a 4°C. Se incubó en hielo durante 15 minutos. Luego se centrifugó a 6.000 r.p.m. durante 6 minutos y el pellet se resuspendió en 10 ml de solución  $CaCl_2$  100 mM, estéril y preenfriada a 4°C y se incubó durante 30 minutos. Se centrifugó a 6.000 r.p.m. durante 6 minutos y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 1,7 ml de  $CaCl_2$  100 mM y 0.3 ml de glicerol 20%. Finalmente, se repartió la suspensión en alícuotas de 100  $\mu$ l en tubos eppendorf preenfriados a 4°C que fueron conservados a -20°C.

### **6.2 Transformación de células competentes de *E. coli***

Para la transformación de células competentes con ADN plasmídico (TCD 900: *nodY::lacZ*,  $Tc^R$ ), se siguió la técnica descrita por Mulligan (1985) modificada como se indica a continuación.

Se descongelaron las alícuotas de 100  $\mu$ l de células competentes manteniéndolas en hielo durante 15-20 minutos, se adicionaron 1, 3 y 5  $\mu$ L del ADN plasmídico que se empleó para transformar. Luego se calentó a 42 °C durante 90s. Se dejó en hielo 2 minutos y se adicionó medio LB hasta un volumen final de 1 ml. Se incubó a 37 °C durante 1 h, agitando suavemente cada 20 minutos. Se centrifugó y resuspendió en 200  $\mu$ L de LB.

Finalmente, para seleccionar las transconjugantes, las células transformadas se sembraron en placas de petri con medio LB suplementado con los correspondientes antibióticos. Se incubaron a 37 °C durante una noche y las colonias obtenidas se utilizaron como dadoras para la conjugación posterior.

### **6.3 Transformación de células de rizobios mediante conjugación biparental**

La transferencia de ADN plasmídico a los rizobios se realizó mediante conjugación biparental y se utilizó como cepa donadora *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con el plásmido a transferir (TCD 900: *nodY::lacZ*,  $Tc^R$ ).

Se centrifugó 1 ml de cultivo de la cepa donadora en fase exponencial de crecimiento y de la cepa receptora en fase exponencial tardía. Ambos pellets fueron mezclados y centrifugados y el sedimento se resuspendió en 20 $\mu$ l de medio 20E.

Se agregó la suspensión de *E. Coli* al tubo que contenía los rizobios, se centrifugó y resuspendió el sedimento en 20 µl de 20E.

La mezcla resultante se depositó en un filtro estéril de nitrocelulosa, previamente colocado sobre placas de petri que contenían también medio 20E. Tras una incubación durante 48-72 horas a 30°C (dependiendo de la velocidad de crecimiento del rizobio), las mezclas de conjugación se resuspendieron en 1 ml de medio 20E con 30% de glicerol. Se sembraron en placas de petri con medio 20E suplementado con los antibióticos adecuados para la selección de los transconjugantes.

## **7. Análisis genómico de cepas parentales, de mutantes espontáneas resistentes a antibióticos y de transconjugantes**

Para realizar este análisis, en un primer paso se realizó la extracción del ADN genómico de las bacterias, luego el ensayo de amplificación y finalmente se realizó una corrida electroforética en geles de agarosa, analizándose los patrones de banda obtenidos.

### **7.1 Extracción de ADN a partir de colonias bacterianas**

Se utilizó la técnica descrita por Walsh et al. (1991).

Entre 3-5 colonias del cultivo se resuspendieron en 300 µl de NaCl 1M. Se homogeneizó con vortex durante 1-2 minutos y se centrifugó durante 3 minutos a 21000 rpm. Se lavó el pellet en 300 µl de agua bidestilada estéril y se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente. Se agregaron 150 µl de suspensión acuosa de resina (6% p/v) (Chelex 100, BIO-RAD) en agitación y se incubó durante 20 minutos a 56°C y posteriormente, 8 minutos a 99°C.

El ADN fue conservado a -20°C hasta su utilización.

## **7.2 Obtención de perfiles de fingerprints de ADN**

El protocolo de REP-PCR utilizado es básicamente el descrito por de Bruijn (1992).

Se utilizaron los primers ERIC sintetizados por Fagos/Ruralex, Argentina, cuyas sus secuencias se muestran a continuación:

ERIC 1R: 5'-ATgTAAgCTCCTggggATTAC-3'

ERIC 2: 5'-AAgTAAgTgACTggggTgAgCg-3'

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 10  $\mu$ l conteniendo: 1,5  $\mu$ M de cada primer, 200  $\mu$ M de cada dNTP (dATP, dGTP, dTTP y dCTP), 2,5  $\mu$ l de ADN, buffer de polimerasa 10 mM Tris-HCl pH:9, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,55 U de Taq DNA polimerasa. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático (MJ Research PTC-100) con un ciclo de desnaturalización inicial de 5 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización (94 °C, 1 min), annealing (52 °C, 1 min) y polimerización (65°C, 8 minutos) y una extensión final a 65 °C por 16 minutos.

Los microtubos con los productos de reacción se almacenaron a -20 °C hasta su posterior análisis.

Los productos de reacción se separaron mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5 % en buffer TAE 1x (Tris base 89 mM, ácido bórico 89 mM y EDTA 20 mM, pH 8,3) conteniendo 3  $\mu$ l (1 mg/ml) de bromuro de etidio. La corrida se desarrolló a 5 V/cm (constante).

Los geles se observaron con un transiluminador de luz UV y se registraron utilizando una cámara digital. Los *fingerprints* obtenidos por ERIC-PCR fueron analizados mediante inspección visual.

## **8. Evaluación de producción de $\beta$ -galactosidasa**

### **8.1 Evaluación en placa**

Para evaluar la presencia del plásmido con la fusión *nodY::lacZ* en los rizobios transconjugantes obtenidas, se sembraron placas de medio YEM que contenían 3.7  $\mu$ M del flavonoide específico para el rizobio (Tabla 9), 100  $\mu$ g/ml de antibiótico tetraciclina y 40  $\mu$ g/ml de X-gal. Se incubaron las placas 4-8 días, según la cepa y se evaluó la presencia de colonias azules (Sambrook et al., 1989).

<b>TABLA 9.- Relación específica flavonoide-rizobio para cada cepa.</b>	
<b>Microorganismo</b>	<b>Flavonoide</b>
<i>S. meliloti</i> B-399	Luteolina
<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	Genisteína
<i>B. japonicum</i> E-109	Genisteína
<i>R. tropici</i> CIAT 899	Naringenina

## 8.2 Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa

Para la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se siguió el protocolo descrito por Banfalvi et al. (1988). Se partió de cultivos de las cepas estudiadas (*B. japonicum* E-109 wt y V1, *S. meliloti* B-399 wt y V2, *R. tropici* CIAT 899 wt y V3, *B. sp.* SEMIA 6144 wt y V4) en medio de cultivo líquido 20E con una densidad óptica a 550 nm (DO<sub>550</sub>) de 0,8, tomando como controles positivos las cepas NT1 y TAL1000 (Tabla 2). Se realizaron los tratamientos descritos en la Tabla 10 para cada cepa y se incubaron los tubos toda la noche a 28°C hasta que las muestras alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0.2 a 0.4 a una longitud de onda de 600 nm. Luego, en cada tratamiento, se tomaron 400  $\mu$ l de cada tubo, se transfirieron a un eppendorf y se les adicionaron 400  $\mu$ l de buffer Z (Tabla 11) mantenido a 28°C, 50  $\mu$ l de cloroformo y 100  $\mu$ l de SDS 0.1% estéril. Se agitó durante 1 minuto y se agregó 150  $\mu$ l de orto nitro fenil galactósido (ONPG) como sustrato enzimático (4 mg/ml). Se dejó de 10 a 15 minutos hasta la aparición de color amarillo y se detuvo la reacción adicionando 400 ml de carbonato de sodio 1M. Se centrifugaron las muestras a 14000 rpm y se midió la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro Metrolab 1700. También se midió la DO del cultivo inicial.

La actividad  $\beta$ -galactosidasa se expresa en unidades de Miller. Estas se obtienen por el siguiente cálculo (Miller, 1972):

$$\text{UNIDADES MILLER: } \frac{\text{DO}_{420} * 1000}{\text{t. VOL. DO}_{600}}$$

$$\text{UNIDADES } \beta\text{-galactosidasa: } \frac{1000 (\text{DO}_{420} - 1.75 \text{DO}_{550})}{\text{t. VOL. DO}_{600}}$$

donde

DO<sub>420</sub>: Densidad óptica a 420 nm.

DO<sub>550</sub>: Densidad óptica a 550 nm.

DO<sub>600</sub>: Densidad óptica a 600 nm.

VOL: Volumen de cultivo en mililitros.

t: Tiempo de incubación en minutos.

En todos los casos se realizaron cinco réplicas.

Para cada caso se incluyó un tratamiento control, sin el flavonoide específico, un tratamiento denominado metanol, con metanol en lugar del flavonoide (por ser el solvente que se utilizaba para disolverlo) y un blanco que no contenía el cultivo del microorganismo a analizar.

	<b>Medio Mínimo + Antibiótico</b>	<b>Flavonoide</b>	<b>Cultivo</b>	<b>Agua</b>	<b>Metanol</b>
<b>Control</b>	3 ml		30 µl	3 µl	
<b>Blanco</b>	3 ml	3 µl		30 µl	
<b>Metanol</b>	3 ml		30 µl		3 µl
<b>Muestra</b>	3 ml	3 µl	30 µl		

Componente	Concentración (g/l)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	16.1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.5
KCl	0.75
MgSO <sub>4</sub>	0.246

## **9. Ensayo en plantas**

Los ensayos en plantas fueron realizados siguiendo los protocolos descritos por Somasegaran et al. (1994). Se realizaron ensayos en macetas o en tubos de acuerdo al desarrollo radicular de las plantas y a la posibilidad de desarrollo de los nódulos en los mismos (ver más adelante).

### **9.1 Semillas**

Se trabajó con semillas de alfalfa, maní, soja y poroto siguiendo el protocolo descrito por Somasegaran et al. (1994). La Tabla 12 muestra la cepa específica de cada leguminosa.

<b>Planta</b>	<b>Microorganismo</b>
<i>Medicago Sativa</i> (alfalfa)	<i>S. meliloti</i> B-399
<i>Arachis hypogaea</i> (maní)	<i>B. sp.</i> SEMIA 6144
<i>Glycine max</i> (soja)	<i>B. japonicum</i> E-109
<i>Phaseolus vulgaris</i> (poroto)	<i>R. tropici</i> CIAT 899

### **9.2 Esterilización de semillas y pre-germinación**

Se colocaron las semillas en un vaso estéril y se lavaron durante 10 segundos en etanol al 95%. Se descartó el alcohol y se agregó la solución esterilizante (hipoclorito de sodio comercial al 2.5% v/v), en cantidad suficiente para cubrir las semillas, luego se agitó suavemente durante 3-5 minutos y se descartó nuevamente la solución. Seguidamente, las semillas debieron ser lavadas al menos 6 veces con cantidad suficiente de agua estéril, y se las preparó para la pregerminación.

Las semillas estériles se colocaron en un pliego de papel secante previamente esterilizado por autoclavado a 121°C y 1 atm de sobrepresión durante 20 minutos. El papel debió ser previamente humedecido con agua estéril. Se colocó en cuarto estufa a 29°C durante dos días, tiempo suficiente para obtener una raicilla de aproximadamente 1,5 cm.



Se eligieron semillas de tamaño uniforme y alta viabilidad, bien germinadas, de similar tamaño y longitud radical.

### 9.3 Ensayo en tubos

Las semillas pregerminadas fueron sembradas en tubos con 30 ml de medio Jensen (Somasegaran y Hoben, 1994) procurando introducir la raicilla en el medio agarizado. El medio Jensen se describe en la tabla 13.

Luego de 24 horas, los tubos fueron inoculados con 1 ml de cultivo en medio 20E de los microorganismos correspondientes. En el caso de las cepas transformadas el cultivo debió realizarse en medio sin antibiótico, ya que experiencias preliminares mostraron que las plantas se veían afectadas por la presencia de los mismos, produciendo su muerte. El cultivo de las plantas se realizó en una cámara bajo un régimen de luz:oscuridad de 12:12 hs.

En los casos de soja, maní y poroto, el ensayo se levantó cuando se observó la aparición del primer nódulo ya que el desarrollo ulterior de la planta se iba a ver condicionado por el tamaño del tubo y la disponibilidad de nutrientes.

En el caso de la alfalfa el ensayo se levantó cuando la planta hubo completado su desarrollo, observándose en este caso la aparición de más de un nódulo.

En todas las experiencias, los nódulos fueron registrados con cámara digital.

<b>TABLA 13.-Composición del medio Jensen</b>	
Componente	Concentración (g/l)
CaHPO <sub>4</sub>	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.2
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.2
NaCl	0.2
FeCl <sub>3</sub>	0.1
Sc. Elementos Traza	1 ml

La solución de elementos traza es la misma que para la solución de riego Faharaeus descrita en la tabla 14.

#### 9.4 Ensayo en macetas

Se utilizaron tubos plásticos de aproximadamente 25 cm de largo por 3 cm de diámetro; previamente a su utilización se lavaron con agua y lavandina y luego se enjuagaron nuevamente con agua estéril. Para el armado de cada una de las macetas se utilizó una bandeja de plástico transparente y se cubrió la base del tubo con un cuadrado rectangular de tela de tul, sujeto mediante una goma elástica.

Como material soporte para esta experiencia se utilizó vermiculita esterilizada en tres ciclos consecutivos de 1 hora en autoclave a 121°C y 1 atm de sobrepresión. En cada ciclo se procedió a remover la vermiculita para lograr una esterilización homogénea.

Como paso previo a la siembra de las semillas de soja se procedió a impregnar la vermiculita con agua estéril el día anterior para tener la humedad adecuada, poder realizar los hoyos et alocar las semillas esterilizadas y pregerminadas. Se realizaron tres hoyos y se colocaron tres semillas pregerminadas por maceta, se regaron nuevamente con agua estéril y se colocaron para cultivarlas en invernadero. Para el riego posterior de las plantas, se utilizó la solución de riego o medio Faharaeus libre de nitrógeno, descrito por Somasegaran et al., 1994 (Tabla 14).

Luego de aproximadamente 5 días se procedió a ralea 1 planta por maceta dejando solamente dos para completar el ensayo.

Las plantas se observaron y regaron de acuerdo a las necesidades diarias y se controlaron para prevenir la posible presencia de insectos. Al cabo de 45 días se levantó el ensayo. Se realizó el registro de presencia o ausencia de nódulos. Para ello se lavaron las raíces para remover la vermiculita.

Componente	Concentración (g/l)
CaCl <sub>2</sub>	0.1
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.12
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub>	0.15
ClF <sub>3</sub>	0.0017
Solución stock de micronutrientes	1 ml

Micronutrientes	Concentración (g/l)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.86

MnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	2.03
ZnSO <sub>4</sub> ,7H <sub>2</sub> O	0.22
CuSO <sub>4</sub> ,5H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.14

## **10. Análisis Estadístico**

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante un test de ANOVA de una vía, confeccionando una tabla de ANOVA en una planilla de Excel y comparando los valores F obtenidos, con el estadístico F de tabla suministrado por el mismo programa. También fueron rechazados aquellos valores cuyo valor de p fuera menor que 0.05.

# **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## **1. Selección de los medios de cultivo**

Cada una de las cepas fue cultivada en distintos medios mínimos (MSM y M9) con distintas fuentes de carbono: glicerol, manitol, sacarosa y glucosa, seleccionándose aquellos en los que se alcanzó más rápidamente la concentración de  $5 \times 10^8$  UFC/ml. Los medios seleccionados para los microorganismos utilizados en el trabajo se detallan en la Tabla 15.

<b>Tabla 15: Medios mínimos de cultivo utilizados.</b>	
<b>Microorganismo</b>	<b>Medio de cultivo - Fuente de carbono</b>
<i>B. japonicum</i> E-109	MSM manitol
<i>S. meliloti</i> B-399	M9 sacarosa
<i>R. tropici</i> CIAT 899	M9 manitol
<i>B. sp.</i> SEMIA 6144	MSM glucosa

## **2. Obtención de cepas transformadas**

Con la finalidad de obtener cepas de rizobios con la fusión *nodY::lacZ* como reportera de la activación de los genes *nod*, se transformaron con los plásmidos prmM57 y TCD900 previamente introducidos en la cepa dadora de *E.coli* DH5 $\alpha$ .

## **2.1 Selección de cepas resistentes a antibióticos**

Para poder seleccionar los transconjugantes fue necesario partir de rizobios resistentes a antibióticos, por lo que para cada especie se seleccionaron mutantes resistentes a estreptomomicina o espectinomicina (ver Tabla 2, Materiales y Métodos).

En cada caso, la resistencia seleccionada dependió de que la velocidad de aparición de las colonias resistentes tuviera la menor diferencia posible con la de las *wild type*. En el caso de *R. tropici* CIAT 899, se seleccionó la cepa resistente a espectinomicina debido a que la cepa parental es resistente natural a estreptomomicina. Todas las cepas tuvieron tasas de mutación espontáneas del orden de  $1 \times 10^{-6}$ .

## **2.2 Transconjugación**

Las cepas resistentes a antibióticos de cada estirpe rizobiana fueron sometidas a transformación mediante el proceso de conjugación biparental descrito en Materiales y Métodos. En todos los casos, se seleccionaron las transconjugantes portadoras del plásmido TCD900, ya que cuando se realizó la transformación con *E. coli* DH5 $\alpha$  portadora del plásmido prmM57, no se obtuvieron transconjugantes.

Se seleccionó una colonia transformada de cada especie rizobiana y se procedió a su comparación en cuanto a sus características fisiológicas, cinéticas y genéticas con las cepas parentales.

## **3. Curva de crecimiento**

Con la finalidad de realizar la comparación entre cepas *wild type* y transformadas en cuanto a la cinética de crecimiento, se cultivaron las cepas parentales en medio mínimo y las cepas transformadas en medio mínimo suplementado con antibióticos correspondientes (ver Materiales y Métodos). Se tomaron alícuotas a distintos tiempos y se realizó el recuento celular correspondiente. La comparación de las características cinéticas de las cepas *wild type* y las transformadas se realizó por comparación de dos puntos en la curva de crecimiento mediante un test ANOVA de una vía (con un  $n=4$ ).

### 3.1 *Sinorhizobium meliloti* B-399

Los resultados obtenidos para *S. meliloti* B-399 se muestran en la Tabla 16 y Figura 4.

B-399 <i>wild type</i>			B-399 V2		
TIEMP O (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA	TIEMP O (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA
22	3.20E+07	5.23E+07	22	1.20E+05	3.56E+05
	4.30E+07			3.70E+05	
	5.43E+07			5.32E+05	
	8.00E+07			4.00E+05	
43	7.30E+08	4.75E+08	43	4.50E+06	3.50E+06
	7.80E+08			3.30E+06	
	9.00E+07			2.70E+06	
	3.00E+08			4.30E+06	

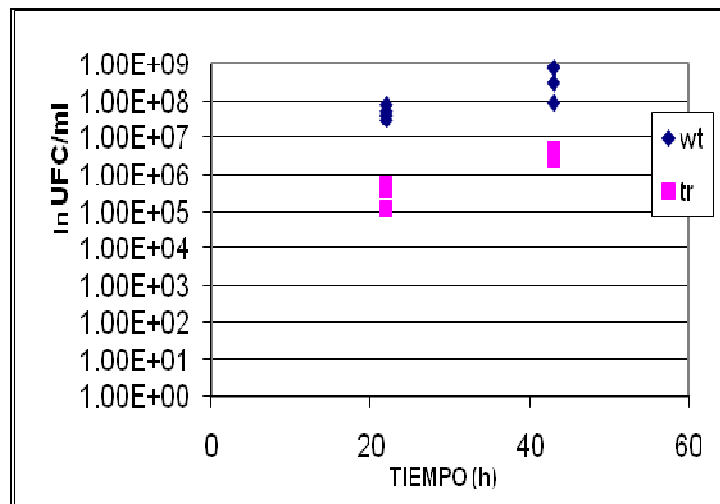


Figura 4.- Crecimiento de cepas parentales (rombos) y transformadas con el plásmido TCD900 (cuadrados) de *S. meliloti* B-399. En la figura se muestran los dos puntos que se tomaron para realizar el test estadístico correspondiente.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de los datos se muestran en la Tabla 17.

<b>Tabla 17.- Tabla de ANOVA de los datos de crecimiento celular <i>S. meliloti</i> B-399.</b>					
	<b>SS</b>	<b>df</b>	<b>MS</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
<b>R</b>	19.501561	1	19.501561	47.1819994	1.7253E-05
<b>C</b>	92.9848895	1	92.9848895	224.967273	3.8897E-09
<b>I</b>	0.23993864	1	0.23993864	0.58050659	0.46082689
<b>E</b>	4.95991554	12	0.4133263		
<b>T</b>	117.686305	15			

Donde

SS: Suma de cuadrados.

df: Grados de libertad.

MS: Cuadrado medio.

F: Valor estadístico F.

p: Valor estadístico p.

R: Varianza entre filas.

C: Varianza entre columnas.

I: Varianza intra series.

E: Varianza entre series.

T: Varianza total.

Para las repeticiones realizadas, corresponde un valor F de 4.74722128. Los valores de F obtenidos para los residuos y los cuadrados son mayores que el de tabla en todos los casos, lo que indica que las cepas de *S. meliloti* B-399 *wild type* y las transformadas tienen diferencias significativas en cuanto a sus parámetros de crecimiento. Lo mismo se comprueba al observar los valores de p, cuyos valores son en ambos casos (para los residuos y los cuadrados) menores a 0.05.

### **3.2 *Bradyrhizobium japonicum* E-109**

Los datos obtenidos para *B. japonicum* E-109 se muestran en la Tabla 18 y Figura 5.

<b>Tabla 18: Crecimiento de <i>B. japonicum</i> E-109 wt y V1.</b>					
E-109 <i>wild type</i>			E-109 V1		
TIEMPO (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA	TIEMPO (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA
23	7.08E+06	6.54E+06	23	2.24E+05	1.98E+05
	6.10E+06			2.30E+05	
	6.43E+06			1.40E+05	
	7.30E+06			3.00E+05	
47	1.28E+07	1.27E+07	47	4.98E+05	4.97E+05
	1.70E+07			5.14E+05	
	8.30E+06			4.80E+05	
	2.83E+07			6.84E+05	

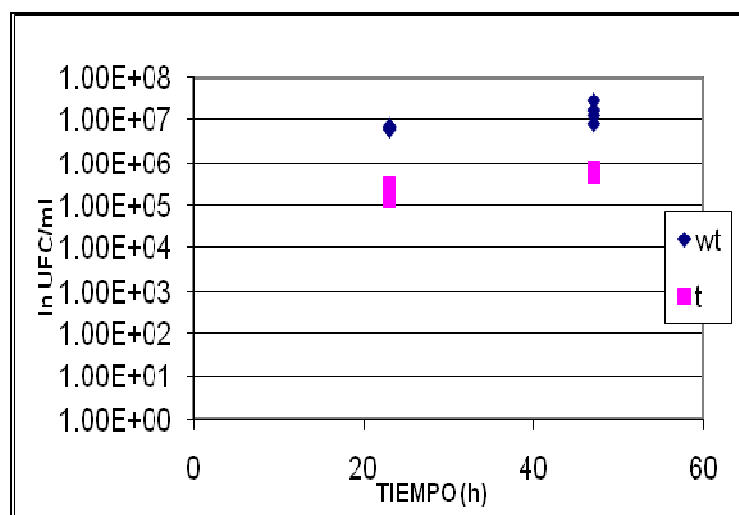


Figura 5.- Crecimiento de cepas parentales (rombos) y transformadas con el plásmido TCD900 (cuadrados) de *B. japonicum* E-109. En la figura se muestran los dos puntos que se tomaron para realizar el test estadístico correspondiente.

Los resultados obtenidos del análisis estadístico de los datos se muestran en la Tabla 19.

<b>Tabla 19.- Tabla de ANOVA de los datos de crecimiento celular de <i>B. japonicum</i> E-109.</b>					
	SS	df	MS	F	p
<b>R</b>	2.96423486	1	2.96423486	29.7710745	0.00014618
<b>C</b>	45.7940214	1	45.7940214	459.928882	6.1649E-11
<b>I</b>	0.01166685	1	0.01166685	0.11717518	0.73803948
<b>E</b>	1.19481137	12	0.09956761		
<b>T</b>	49.9647345	15			



Para las repeticiones realizadas, corresponde un valor F de 4.74722128. Los valores de F obtenidos para los residuos y los cuadrados son mayores que los de tabla en todos los casos, lo que indica que las cepas *B japonicum wild type* y las transformadas tienen diferencias significativas en cuanto a sus parámetros de crecimiento. Lo mismo se comprueba al observar los valores de p, cuyos valores son en ambos casos (para los residuos y los cuadrados) menores a 0.05.

### 3.3 *Rhizobium tropici* CIAT 899

Los datos obtenidos para *R. tropici* CIAT 899 se muestran en la Tabla 20 y Figura 6.

<b>Tabla 20: Crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT 899 wt y V3.</b>					
CIAT <i>wild type</i>			CIAT V3		
TIEMPO (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA	TIEMPO (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA
23	3.00E+07	2.44E+07	23	1.23E+06	2.84E+06
	2.45E+07			2.42E+06	
	3.12E+07			3.70E+06	
	1.20E+07			4.00E+06	
47	2.00E+08	1.85E+08	47	2.30E+07	2.21E+07
	2.12E+08			1.13E+07	
	1.43E+08			3.20E+07	
	2.42E+08			2.93E+07	

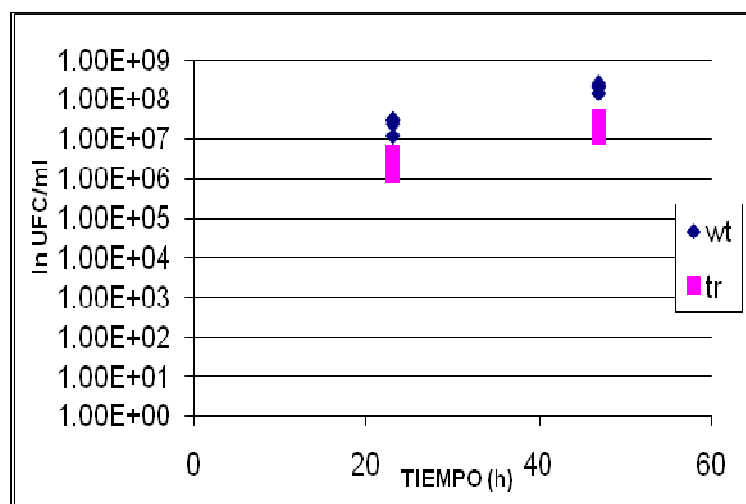


Figura 6.- Crecimiento de cepas parentales (rombos) y transformadas con el plásmido TCD900 (cuadrados) de *R. tropici* CIAT 899. En la figura se muestran los dos puntos que se tomaron para realizar el test estadístico correspondiente.

Los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico de los datos se muestran en la Tabla 21.

	SS	df	MS	F	p
<b>R</b>	18.4893598	1	18.4893598	97.1316442	4.1901E-07
<b>C</b>	19.0158178	1	19.0158178	99.8973288	3.6013E-07
<b>I</b>	8.4276E-05	1	8.4276E-05	0.00044273	0.98355861
<b>E</b>	2.2842434	12	0.19035362		
<b>T</b>	39.7895053	15			

Para las repeticiones realizadas, corresponde un valor F de 4.74722128. Los valores de F obtenidos para los residuos y los cuadrados son mayores que el de tabla en todos los casos, lo que indica que las cepas de *R. tropici* CIAT 899 *wild type* y las transformadas tienen diferencias significativas en cuanto a sus parámetros de crecimiento. Lo mismo se comprueba al observar los valores de p, cuyos valores son en ambos casos (para los residuos y los cuadrados) menores a 0.05.

### 3.4 *Bradyrhizobium sp.* SEMIA 6144

Los datos obtenidos para *Bradyrhizobium. sp* SEMIA 6144 se muestran en la Tabla 22 y Figura 7.

SEMIA <i>wild type</i>			SEMIA V4		
TIEMPO (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA	TIEMPO (h)	Concentración celular (UFC/ML)	MEDIA
23	2.95E+06	3.45E+06	23	1.68E+05	2.37E+05
	3.20E+06			3.24E+05	
	4.20E+06			2.20E+05	
	3.50E+06			2.45E+05	
47	5.30E+06	5.77E+06	47	3.70E+05	4.30E+05
	6.20E+06			4.30E+05	
	5.80E+06			4.90E+05	
	5.70E+06			4.10E+05	

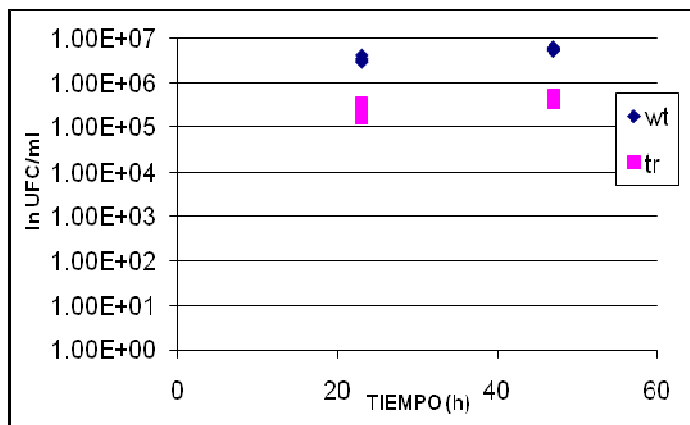


Figura 7.- Crecimiento de cepas parentales (rombos) y transformadas con el plásmido TCD900 (cuadrados) de *B. sp.* SEMIA 6144. En la figura se muestran los dos puntos que se tomaron para realizar el test estadístico correspondiente.

Los resultados obtenidos al realizar el análisis estadístico de los datos se muestran en la Tabla 23.

**Tabla 23.- Tabla de ANOVA de los datos de crecimiento de *B. sp.* SEMIA 6144.**

	SS	Df	MS	F	P
<b>R</b>	1.23545128	1	1.23545128	43.133956	2.6601E-05
<b>C</b>	28.0846523	1	28.0846523	980.534137	7.0825E-13
<b>I</b>	0.0068261	1	0.0068261	0.23832308	0.63421848
<b>E</b>	0.34370637	12	0.0286422		
<b>T</b>	29.670636	15			

Para las repeticiones realizadas, corresponde un valor F de 4.74722128. Los valores de F obtenidos para los residuos y los cuadrados son mayores que el de tabla en todos los casos, lo que indica que las cepas de *B. sp.* SEMIA 6144 *wild type* y las transformadas tienen diferencias significativas en cuanto a sus parámetros de crecimiento. Lo mismo se comprueba al observar los valores de p, cuyos valores son en ambos casos (para los residuos y los cuadrados) menores a 0.05.

### 3.5 Observación general

El análisis de los resultados obtenidos indica, en todos los casos, que ha habido un retardo en el crecimiento de las cepas transformadas con respecto a las parentales. Estos resultados son esperables, dado que las cepas transformadas deben expresar un mecanismo de

resistencia a antibióticos para poder crecer, lo que retrasa el inicio de la fase exponencial (por extenderse la fase *lag*) y por ende, produce un desfase en el crecimiento de las mismas con respecto al de las cepas parentales.

#### **4. Análisis genómico de la cepas *wild type* y transformadas**

Con la finalidad de comprobar que luego del proceso de transformación, la cepa obtenida no difería genómicamente de las *wild type*, se realizaron *fingerprints* de las cepas parentales y transformadas mediante la técnica de ERIC-PCR. La comparación de los *fingerprints* se realizó por inspección visual de las bandas obtenidas en un gel de agarosa. Las figuras 8, 9, 10 y 11 muestran los geles obtenidos para las cepas *R. tropici* CIAT 899, *S. meliloti* B-399, *B. japonicum* E-109 y *B. sp.* SEMIA 6144, respectivamente.

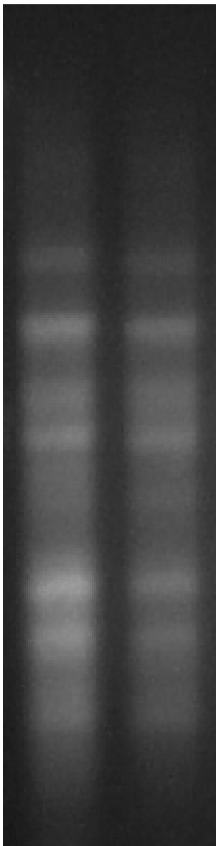


Figura 8.- Perfil de bandas obtenido para *Rhizobium tropici* CIAT wt (izq.) y V3 (der.).

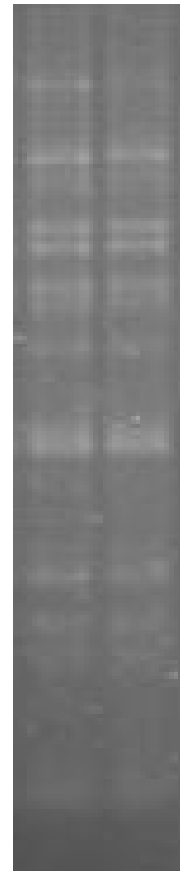


Figura 9.- Perfil de bandas obtenido para *S. meliloti* B-399 wt (izq.) y V2 (der.).

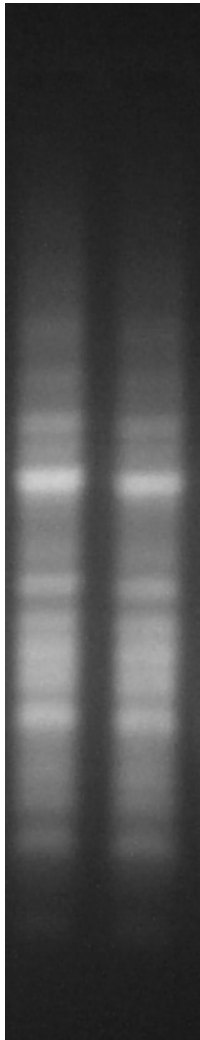


Figura 10.- Perfil de bandas obtenido para *B. japonicum* E-109 *wt* (izq.) y V1 (der.).

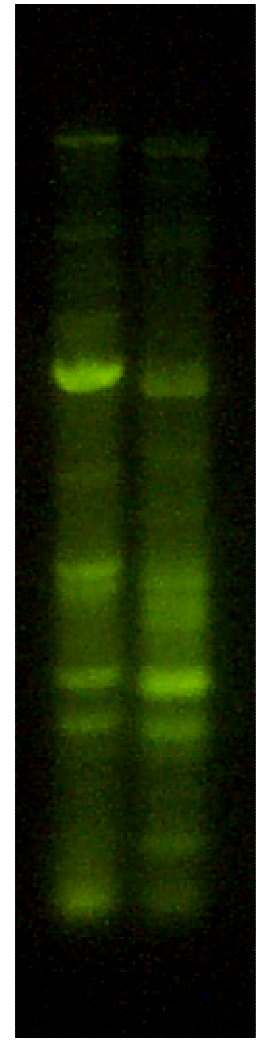


Figura 11.- Perfil de bandas obtenido para *B. sp. SEMIA wt* (izq.) y V4 (der.).

#### 4.1 Observación General

De la inspección visual de los geles se concluye que no se encuentran diferencias entre los patrones de bandas obtenidos para las cepas *wild type* y las transformadas, lo que es esperable dado que la transferencia del plásmido no introduce modificaciones a nivel cromosómico.

### 5. Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa

Con la finalidad de evaluar la presencia de la fusión *nodY::lacZ* en las cepas transformadas se procedió a realizar un ensayo en placa de petri conteniendo medio 20E suplementado

con antibióticos, x-gal y flavonoide específico (ver Materiales y Métodos) y a determinar la actividad  $\beta$ -galactosidasa.

### **5.1 Evaluación en placa**

Las Figuras 12, 13 y 14 muestran las colonias azules obtenidas en las placas con x-gal de las cepas *R. tropici* CIAT 899, *B. japonicum* E-109, *B. sp* SEMIA 6144 y *S. meliloti* B-399 transformadas con el plásmido TCD900.



Figura 12.- Placa con x-gal de la cepa *R. tropici* CIAT 899, transformada con el plásmido TCD900.

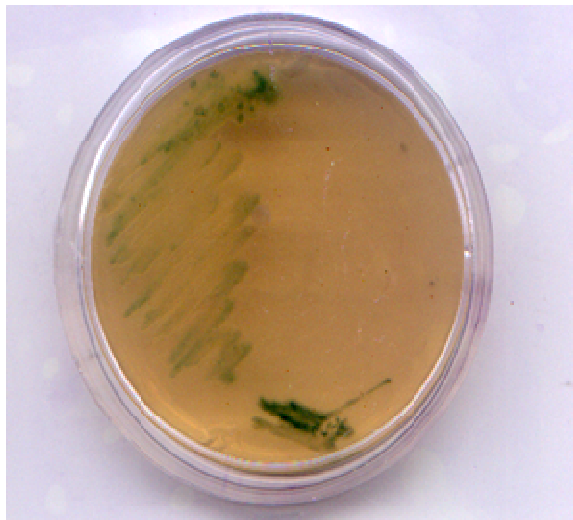


Figura 13.- Placa con x-gal de la cepa *B. japonicum* E-109 (izq.) y *B. sp.* SEMIA 6144 (der.), ambas transformadas con el plásmido TCD900.

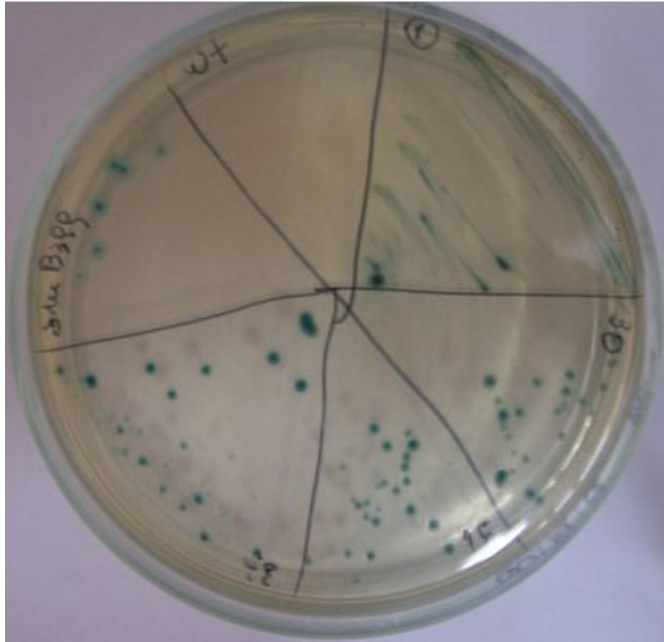


Figura 14.- Placa con x-gal de la cepa *S. meliloti* B-399 transformada con el plásmido TCD900. Se observan también estriados de colonias obtenidas luego del proceso de transformación (coloreados) y el estriado de la cepa *wild type* (no coloreada).

### 5.1.1 Observación General

La presencia de colonias azules indica que el gen de la  $\beta$ -galactosidasa ha sido expresado en las cepas transformadas, al ser inducido en presencia de los flavonoides específicos. En consecuencia, se comprueba que estas cepas son portadoras del plásmido de interés.

### 5.2 Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa

La tabla 24 y Figura 15 muestran la actividad  $\beta$ -galactosidasa (expresada en unidades de Miller) obtenidas para las cepas transformadas, con y sin el agregado de flavonoides, y la relación entre ambas.

<b>Tabla 24.- Actividad <math>\beta</math>-gal de cepas transformadas expresada en Unidades de Miller.</b>			
<b>CEPA</b>	<b>SIN FLAVONOIDE</b>	<b>CON FLAVONOIDE</b>	<b>Relación con flavonoide/sin flavonoide</b>
<i>B. japonicum</i> E-109	110.3 $\pm$ 18.4	1673.6 $\pm$ 18.4	15.1731641
<i>S. meliloti</i> B-399	75.2 $\pm$ 6.8	629 $\pm$ 61.5	8.364361702
<i>R. tropici</i> CIAT 899	66.7 $\pm$ 6.7	682.3 $\pm$ 103.3	10.22938531
<i>B. sp</i> SEMIA 6144	83.4 $\pm$ 7.2	735.3 $\pm$ 73.5	8.816546763

Los valores se expresan como la media  $\pm$  SD, siendo n=5.

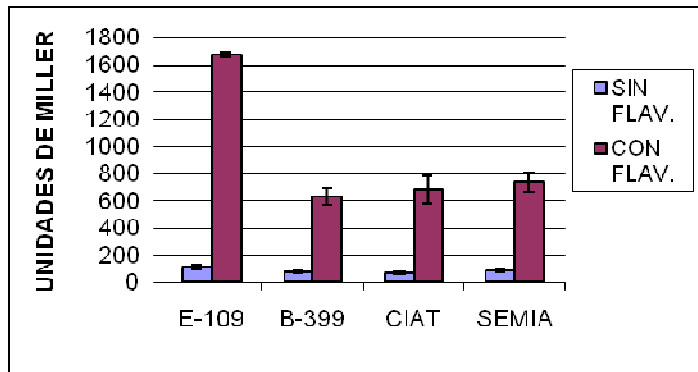


Figura 15.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa para las cepas transformadas medida en medios con y sin flavonoide.

### 5.2.1 Observación General

Se puede observar claramente la diferencia entre el tratamiento con flavonoides y sin flavonoides, lo que confirma la presencia de la fusión *nodY::lacZ* en las cepas transformadas. Esto se debe a que, en el diálogo molecular entre la planta y la bacteria, los flavonoides del huésped inducen la transcripción de genes *nod* bacterianos. En este caso, la presencia de actividad  $\beta$ -galactosidasa inducida por flavonoides indica que la síntesis de la misma se desencadena ante la presencia de los mismos.

## 6. Ensayo en plantas

A fin de determinar si las cepas transformadas conservan sus características simbióticas, se realizó un ensayo en plantas. Las figuras 16 y 17 muestran los nódulos obtenidos en el ensayo de nodulación en tubos para las cepas *S. meliloti* B-399 y *R. tropici* CIAT 899. Como se puede observar, en este ensayo, los nódulos de alfalfa son fácilmente distinguibles; no siendo así en las plantas de los obtenidos para poroto. Lo mismo sucede con los nódulos en las plantas de soja y maní. Esto se debe a que en estos últimos casos, el ensayo se levanta cuando el tamaño de las plántulas y el agotamiento de la solución de soporte impiden su continuidad, resultando este tiempo insuficiente para el desarrollo de nódulos del tamaño apreciable.





Figura 16.- Raíz de alfalfa inoculada con *S. meliloti* B-399 transformada con el plásmido TCD900.



Figura 17.- Raíz de poroto inoculada con *R. tropici* CIAT 899 transformada con el plásmido TCD900.

Por esta razón, se procedió a realizar el ensayo en macetas para poroto, maní y soja. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 18, 19 y 20, donde se pueden distinguir claramente los nódulos.



Figura 18.- Raíz de soja inoculada con *B. japonicum* E-109 transformada con el plásmido TCD900.



Figura 19.- Raíz de maní inoculada con *B. sp.* SEMIA 6144 transformada con el plásmido TCD900.

Figura 20-. Raíz de poroto inoculada con *R. tropici* CIAT 899 transformada con el plásmido TCD900.



### **6.1 Observación general**

Los resultados obtenidos tanto para alfalfa en el ensayo en tubos, como para soja, poroto y maní en los ensayos en macetas, demuestran que la transformación de las células rizobianas no altera su capacidad de nodular las leguminosas específicas.

## **CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS DE TRABAJO**

De los resultados previamente expuestos, se puede concluir que la técnica de conjugación biparental puede ser utilizada para construir cepas rizobianas portadoras de la fusión *nodY::lacZ*.

Las cepas obtenidas mediante esta técnica no muestran diferencias con las cepas parentales en cuanto a sus características genómicas y simbióticas. Sin embargo, los resultados de crecimiento celular muestran diferencias en cuanto a las características cinéticas, debidas probablemente a que las cepas transformadas deben expresar mecanismos de resistencia a antibióticos, lo cual extiende la fase lag, y por ende ocasiona un desfase en el crecimiento con respecto a las cepas parentales.

Los resultados obtenidos en este trabajo permitirán en un futuro realizar estudios orientados a dilucidar la influencia del *quorum sensing* en la regulación de la expresión de los genes *nod* y su implicancia a nivel biotecnológico. Estos estudios se encuentran previstos dentro del proyecto de investigación en el que se enmarca este trabajo de tesina.

## **BIBLIOGRAFIA**

- **Baca BE, Soto Urzúa L y Pardo Ruiz MPA (2000)** Fijación biológica de nitrógeno. Elementos (38): 43-49.
- **Banfalvi Z, Nieuwkoop A, Schell M, Besl L y Stacey G (1988)**. Regulation of nod gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. Mol. Gen. Genet. (214):420–424.
- **Brown CM y Dilworth MJ (1975)** Ammonia assimilation by Rhizobium cultures and bacteroids. J Gen Microbiol (86):39-48.
- **Colón-González M y Membrillo-Hernández J (2004)** Capítulo 4: Comunicación entre bacterias. En Martínez Romero E, Martínez Romero JC (eds) Microbios en línea. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_04](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_04)
- **de Bruijn, FJ (1992)** Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergenic consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology (58):2180-2187.
- **Ditta G, Stanfield S, Corbin D y Helinski D (1980)** Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: Construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (77):7347-7351.
- **Djordjevic MA, Redmond JW, Batley M y Rolfe BG (1987)** Clovers secrete specific phenolic compounds which either stimulate or repress nod gene expression in *Rhizobium trifolii*. The EMBO Journal 6 (5): 1173-1179.
- **Downie JA (1998)** Functions of nodulation genes. H. P. Spaink, A. Kondorosi y P. J. J. Hooykaas (eds.). En: The Rhizobiaceae. Molecular biology of model plant-associated bacteria. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. 387-402.
- **Fernández-Cuenca F (2004)** Aplicaciones de las técnicas de PCR a la epidemiología molecular de las enfermedades infecciosas. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 22 (6): 355-360.

- **Gard B, Dogra RC y Sharma PK (1999)** High-efficiency transformation of *Rhizobium leguminosarum* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* (65): 2802-2804.
- **Geurts R y Bisseling T (2002)** Rhizobium Nod Factor Perception and Signalling. *The Plant Cell* (14): 239–249.
- **González JE y Keshavan ND (2006)** Messing with Bacterial Quorum Sensing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 70 (4): 859–875.
- **González JE y Marketon MM (2003)** Quorum Sensing in Nitrogen-Fixing Rhizobia. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 67 (4): 574–592.
- **Hirsch AM, Lum MR y Downie JA (2001)** What Makes the Rhizobia-Legume Symbiosis So Special? *Plant Physiology* (127): 1484–1492.
- **Jitackorn S y Sadowsky MJ (2008)** Nodulation Gene Regulation and Quorum Sensing Control Density-Dependent Suppression and Restriction of Nodulation in the *Bradyrhizobium japonicum*-Soybean Symbiosis. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* 74 (12): 3749–3756.
- **López-Lara IM (2004)** Capítulo 11: *Rhizobium* y su destacada simbiosis con las leguminosas. Taxonomía de los rizobios. En Martínez Romero E, Martínez Romero JC (eds) *Microbios en línea*. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. [http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO\\_11](http://www.microbiologia.org.mx/microbiosenlinea/CAPITULO_11)
- **Miller, JH (1972)** *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- **Mulligan JT y Long SR (1985)** Induction of *Rhizobium meliloti nodC* expression by plant exudates requires *nodD*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82.
- **Quinto C y Cárdenas L (2007)** Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. *Biotecnología* (14): 273-280.
- **Sambrook J, Fritsch EF y Maniatis T (1989)** *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- **Sanchez-Contreras M, Bauer WD, Gao M, Robinson JB y Downie JA (2007)** Quorum-sensing regulation in rhizobia and its role in symbiotic interactions with legumes. *Phil. Trans. R. Soc. B* 362: 1149–1163.
- **Schlaman HRM, Okker RJH y Lugtenberg BJJ (1992)** Regulation of Nodulation Gene Expression by NodD in Rhizobia. *Journal Of Bacteriology* 174 (16): 5177-5182.

- **Somasegaran P y Hoben HJ (1994)** Handbook for Rhizobia. Methods in Legume-Rhizobium Technology. Bacterial Growth Media and Plant Nutrient Solutions. Springer - Verlag, New York.
- **Van Rhijn P y Vanderleyden J (1995)** The Rhizobium-Plant Symbiosis. Microbiological Reviews 59 (1): 124–142.
- **Versalovic J, Koeuth T y Lupski JR (1991)** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Res. 19 (24): 6823–6831.
- **Vincent, JM (1970)** A manual for the practical study of root nodule bacteria. IBP Handbook n°15. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- **Vincze E y Bowra S (2006)** Transformation of Rhizobia with Broad-Host-Range Plasmids by Using a Freeze-Thaw Method. Appl. And Environm. Microbiol. 72 (3): 2290-2293.
- **Walsh PS, Metzger DA y Higuchi R (1991)** Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. BoiTechniques (10): 506-513.
- **Wang T, Martínez Romero J y López Lara I (2001)** Capítulo 8: Rhizobium y su destacada simbiosis con plantas. En Martínez Romero E, Martínez Romero JC (eds) Microbios en línea. Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, Universidad Nacional Autónoma de México. <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios/Cap8>.
- **Werner D, Wilcockson J y Zimmermann E (1975)** Adsorption and selection of rhizobia by ion exchange papers. Arch Microbiol (105):27-32.