

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

# IMPLICACIONES BASICAS Y APLICADAS DE LA INTERACCIÓN TRIPLE RIZOBIO-PGPR-LEGUMINOSA



JANA ESTEVEZ AMADOR  
TESIS DOCTORAL  
2007



**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



**Implicaciones básicas y aplicadas de la  
interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa**

Memoria que presenta la Licenciada en  
Farmacia Jana Estévez Amador  
para optar al grado de Doctor en  
Farmacia por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2007.



**DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD DE SEVILLA**



## **Implicaciones básicas y aplicadas de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa**

Memoria realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla que presenta la Licenciada en Farmacia Jana Estévez Amador para optar al grado de Doctor en Farmacia.

Los Directores

Fdo.: Marta Susana Dardanelli.

Fdo.: Jana Estévez Amador

Fdo.: Manuel Megías Guijo.

Sevilla, 2007.



**D. MANUEL MEGÍAS GUIJO, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA  
DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD DE  
SEVILLA**

**CERTIFICA:** Que la Tesis Doctoral titulada “Implicaciones básicas y aplicadas de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa”, presentada por la Licenciada en Farmacia D<sup>a</sup>. Jana Estévez Amador para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla bajo la dirección de los Drs. D<sup>a</sup>. Marta Susana Dardanelli y D. Manuel Megías Guijo.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Sevilla, a 24 de Enero de 2007.

Fdo.: Dr. Manuel Megías Guijo.





Parte del trabajo incluido en esta Tesis Doctoral ha dado lugar a los siguientes artículos científicos, todos ellos en proceso de escritura y envío, y a dos capítulos de libros ya publicados:

**Estévez, J., Belloguín, R., Ollero, J., Cubo, T., Sousa, C., Espuny, R., Megías, M. and Dardanelli, M.S.** Physiological characterization of rhizobia-PGPR interactions for bean and soybean inoculants manufacturing. *Applied and Environmental Microbiology*.

**Estévez, J., Soría Díaz, M.E., Fernández, F., Morón, B., Manyani, H., Gil Serrano, A., Thomas-Oates, J., van Brussel, A.A.N., Dardanelli, M.S., Sousa, C. and Megías, M.** Nod factor production of *Rhizobium tropici* CIAT899 is stimulated by sodium ions and osmotic pressure. *Chemistry and Biology*.

**Estévez, J., Dardanelli, M.S., van Brussel, A.N.N., Medina, C., Megías, M. and Rodríguez-Navarro, D.N.** Benefits of co-inoculation on growth of beans and soybean under moderately salt conditions. *Applied and Environmental Microbiology*.

**Estévez, J., Balog, C., Morón, B., Manyani, H., Soría Díaz, M.E., Fernández, F., Gil Serrano, A., Thomas-Oates, J., Sousa, C., Dardanelli, M.S., Hensbergen, P., van Brussel, A.A.N. and Megías, M.** Production of *R. tropici* CIAT899 Nod factors under abiotic stress conditions in absence of flavonoid. *Nature Chemical Biology*.

**Cubo, T., Dardanelli, M.S., Estévez, J., Belloguín, R., Espuny, R., Sousa, C., Megías, M. and Ollero, J.** Flavonoid exudated by *Glycine max* cv. Osumi under abiotic stress and in presence of PGPRs. *Soil Biology and Biochemistry*.

**Dardanelli, M.S., Fernández, F., Estévez, J., Rodríguez Carvajal, M.A., Sousa, C., Gil Serrano, A. and Megías, M.** Flavonoids in legume exudates: modulation by the presence of salt or PGPR. *Molecular Plant-Microbe Interaction*.

**Megías, M., Dardanelli, M.S., Estévez, J., Rodríguez-Navarro, D.N., Camacho, M., Ramos, B., Temprano, F., Sousa, C. and Guitérrez-Mañero, F.J.** 2005. Aplicación de bacterias beneficiosas para una agricultura sostenible y respetuosa con el medioambiente. *In press*. pp.: 1-15. Recife, Brasil.

**Dardanelli, M.S., Fernández de Córdoba, F., Estévez, J., Ojeda, J., Merchán, F., Sousa, C. and Megías, M.** 2006. Producción de exudados de *Phaseolus vulgaris* en condiciones de estrés abiótico. En: *Nuevos retos y oportunidades de las leguminosas en el sector agroalimentario español*. pp.: 133-139. Cuenca, España.

Asimismo, se han generado 11 comunicaciones a congresos nacionales y 12 a congresos internacionales.

A Vicky.  
Conseguiste tu sueño de niña:  
ser un ángel.



¿Por dónde empiezo?, ¿cómo se resume en unas hojas todo lo que tienes que agradecer durante 4 años?, ¿o deberían ser 9?. ¡Dios Mío, tengo que agradecer una década de mi vida en unas escasas líneas!. Me resulta bastante difícil plasmar en papel todas las buenas experiencias que he vivido durante mi “breve” estancia como doctoranda en la Facultad de Farmacia (las no tan buenas ya están en el olvido). Sobre todo porque me asoma la duda de no haberos correspondido como cada uno os merecáis. No obstante, haré un gran esfuerzo por recordar e incluir a todos aquellos que merecen de mi agradecimiento (para que cuando te busques, te encuentres). Aunque sinceramente, no tendré que esforzarme demasiado. Siempre os llevo en la mente y/o el corazón.

En primer lugar quisiera agradecer a todas las instituciones y/o personalidades que han hecho posible en un modo u otro mi formación como Doctora. A los Directores del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia, D. José Manuel Úbeda Ontiveros y D. Manuel Megías Guijo, por permitirme realizar la Tesis Doctoral dentro del mismo. Al Ministerio de Educación y Ciencia, por la concesión de la Beca F.P.U. que ha respaldado mi Doctorado durante estos años. Al Centro de Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de México y al Laboratorio Clusius de la Universidad de Leiden, en especial a los Drs. Isabel M<sup>a</sup> López-Lara, Otto Geiger y Antonius A.N. van Brussel, por permitirme realizar mis estancias doctorales dentro de sus respectivos Grupos de Investigación. Igualmente, he de agradecer al Centro I.F.A.P.A. Las Torres-Tomejil, especialmente a los Drs. Francisco Temprano y Dulce Rodríguez-Navarro, por acogerme temporalmente en su centro de trabajo.

A mi Director de Tesis Doctoral, “segundo padre” y referente de vocación y sacrificio por el trabajo diario. Desde aquel día en que me convenció en la línea 34 del Tussam, decidí inmiscuirme en el maravilloso mundo de la Ciencia. Ambos apostamos fuerte, el uno por el otro, y tengo la convicción de que nos salió bien. De él aprendí a ser fuerte, a sacrificarme por todo aquello que cuesta, a perfeccionar mi estilo de trabajo, a ser crítica, a tener “un poco de picardía” y a crecer como persona. La lista de mis agradecimientos para contigo, JEFE, es mucho más extensa, pero también me enseñaste a ser concisa. Espero, con el corazón en la mano, haber cumplido todas tus expectativas. Bueno, todas menos una, aunque recuerda: siempre nos quedará Palma de Mallorca (je). Muchísimas gracias por todo.

A la Dra. Marta Susana Dardanelli, mi Directora de Tesis, AMIGA, “Ángel de la Guarda”, compañera de alegrías y penas, grandísima trabajadora y encantadora persona. A Vicky. Tengo que agradecerte tu enorme apoyo, tanto científico como personal. Sabes muy bien que sin tu ayuda, la historia de esta Tesis Doctoral hubiese tenido otro final bien distinto. Gracias por tus consejos, tus horas nocturnas y diurnas, tus risas, tus regañinas (¿por qué no?), tus “5 minutos” eternos. De ti aprendí a ser fuerte y perfeccionista con mi trabajo, de manera que prometo no olvidar esas maravillosas cualidades. Gracias, che.

A mi “primera profe”, mi primer (y continuo) hombro en que apoyarme, mi amiga, mi compañera de trabajo, mi Carmela. Te considero una de las personas más fuertes que jamás haya conocido, así que, por favor, no cambies. Admiro tu constancia, tu trabajo, tu esfuerzo por hacer las cosas bien, tu amor por la familia y los amigos, tu forma de ser tan positiva. He de agradecerte todos los minutos que me dedicaste al principio de mi incursión en este peculiar mundo de la Investigación, porque sé que no te sobran y, aún así, me los regalaste, ¡ah!, y por todas las “manos que me has echado”. Me enseñaste mucho más de lo que crees. Y por cierto, ya que tú y yo sabemos que en otra vida fuimos hermanas gemelas, espero que esta conexión tan particular que nos une vaya creciendo con el tiempo. Gracias, rubia.

Al resto de la “Comunidad del Anillo”, mis compañeros del laboratorio. A “Laura María de los Dolores” (lo siento, no pude evitarlo), por compartir conmigo todos estos años de FPUistas y enseñarme a afrontar la vida de otra manera. Es curioso, a pesar de que somos la cara y la cruz de la personalidad de un Escorpio, te admiro en muchos aspectos. A Hamid, por ser tan buena gente (¡porque mira que eres buena gente!), por tus consejos, tus chistes, tu increíble facilidad de convertir un momento nefasto en un maravilloso segundo. Y por recordarme siempre que tengo que añadir el  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  (no lo olvidaré). Quiero que sepas que te estas convirtiendo cada vez más en un pilar básico de nuestro grupo. Cuídalo. A “George”, por ofrecer su confianza a esta “pija fascista” (je). Eres uno de los mejores compañeros de trabajo que se puede tener vayas donde vayas, siempre dispuesto a ayudar, a contagiar risas, a arrimar el hombro sin pedir nada a cambio. Una excelente persona. Gracias por estar a mi lado durante todos estos años. A Fran, por concederme un huequito dentro de su círculo de confianza. Eres una persona fiel y sincera, y en días como éstos, es de agradecer. Gracias nuevamente por los trucos que me has enseñado, tanto en lo

profesional como en lo personal. A Carolina, por aportar una visión crítica en la evolución de mi trabajo, ayudándome en parte a mejorar como investigadora. Gracias por tus consejos, tu tiempo y tu dedicación. A Inma, porque, a pesar de habernos tratado poco tiempo (tiempo, siempre el tiempo...) por solaparse mi salida con tu entrada, he disfrutado de cualidades tuyas que siempre agradan a cualquier persona. Ánimo en esta ardua tarea del Doctorado, y disfrútala, que se pasa volando. A los que se fueron: Clemente (¿te llegaste a ir?), quizá no lo sepas, pero admiro muchísimo la fuerza y el optimismo con que afrontas la vida y sus dificultades; María, te deseo lo mejor en el camino que emprendiste hace ya un año, y te felicito por apostar por aquello que realmente deseas, obviando el “que dirán”; Djamila, espero que hayas alcanzado las metas que te propusiste, y que con tanto empeño y coraje seguro que ya tienes al alcance de la mano.

A los vecinos “Halófilos” y “Palomares”, tanto becarios como profesores, por estar siempre dispuesto a tender una mano cuando la he necesitado. Muchas gracias por vuestra colaboración y simpatía. ¡Que importante y gratificante es trabajar en armonía!

A las secretarias, María del Mar y Toñi, por sacar tiempo de debajo de las piedras para arreglar “nuestros papeleos”, siempre con una sonrisa en la cara.

A los compañeros de proyectos, seminarios, reuniones, congresos, cafés, y charlas varias, de las Facultades de Biología, Química y Las Torres. Gracias a los Drs. Rosario Espuny, Teresa Cubo, Javier Ollero, Ramón Belloguín y futuro Dr. Javi “chico” por las diversas colaboraciones que hemos tenido entre manos. Agradezco muy sinceramente a los Drs. Antonio Gil, Maru Soria y Dr. “en capilla” Fran Fernández por su inestimable ayuda en el análisis de los factores Nod y flavonoides. Perdón por ser excesivamente “cansina” en ciertas ocasiones, pero el trabajo lo requería. Y a todo el personal de Las Torres, doctores y técnicos (María, Marta, Paco, Carmen, Isabel, Manoli, Rocio) por acogerme al inicio de mi etapa de investigación y estar siempre dispuestos a ayudarme con los “maravillosos” ensayos de nodulación. Tengo que agradecer muy especialmente a la Dra. Dulce Rodríguez-Navarro por su inestimable colaboración en la realización de numerosos ensayos allá en Las Torres y en la escritura de comunicaciones diversas. Gracias “Sweety” por la amistad, ayuda y comprensión que me brindaste en numerosas ocasiones sin que fuese necesario pedírtelo.

A los Drs. Isabel M<sup>a</sup> López-Lara, Otto Geiger y Ton van Brussel por su cálido acogimiento en mis estancias doctorales en el extranjero. Isabel y Otto me incluyeron en su Grupo de Investigación como “a una más de la familia” y me hicieron madurar como científica, tanto profesional como personalmente. Ellos, junto con todos mis compañeros de Cuernavaca, Sandra, Ana, Edgardo, Quina, Raúl, Yadira, Miguel, Christian, Alhondra, Iván y Maritza, me acompañaron en la magnífica experiencia de descubrir México. En Holanda, Ton se convirtió en un gran apoyo para mí. Pocas personas he conocido a lo largo de mi corta vida que sean tan atentos, de corazón, con los demás. Al profesor van Brussel tengo que agradecerle la oportunidad que me brindó de trabajar con él y que dio lugar a gran parte de los resultados que expongo en esta Tesis, además de una magnífica amistad. También he de agradecer a muchísimas personas del Laboratorio Clusius de Leiden (Clara, Felipe, Ana, Ton, Joss, Sandra, Gerda, Teun, Ellen, Guido, Ben, Tanya y Esther) por adoptarme como amiga y compañera. Cuando se está fuera de casa, reconforta saber que tienes gente con la que siempre puedes contar. Gracias por todo.

A mis amigos y compañeros de Licenciatura, por interesarse por la marcha de mi Doctorado y alentarme año tras año. Creo que encontraremos pocas ocasiones más a lo largo de la vida de tener un grupo de amigos tan unido como el nuestro, y eso se añora. Gracias a Tere, Judith, Carmen, Maribel, Úrsula, Marió, Ro, Jorge, Alvaro, David, Miguel y, sobre todo, a Inmita por haber compartido junto a mí estos entrañables años de Doctorado animándolos con escapadas de “varios minutos” a la cafetería. Te he echado muchísimo de menos.

A mis amigas, por ayudarme en los momentos bajos y compartir los buenos, por aguantar mis malos ratos y mis negativas para salir, por aconsejarme y animarme. A Alicia, Auxi, Maribel, Corco, y muy especialmente a Mari, porque estás siempre a mi lado sin tener que llamarte. Gracias por estos 20 años de amistad. Gracias a todas.

A mi amigo Antonio “El Tranca”. Estés donde estés, quiero que sepas que intentaré ser una millonésima parte de lo fuerte que fuiste. Me siento con la obligación de guardarte un sitio en los agradecimientos de mi Tesis, por los momentos tan incomprensibles que tiene esta vida. Aún así, muchas gracias por tu amistad, que para mí fue (y será siempre) un regalo.



A Sebas, por su inestimable colaboración informática en los diseños de posters, portadas y figuras. Por simplemente dedicarme tiempo y “megas” cuando lo necesité.

A mi familia. Ellos son el motor y el fin de todo lo que hago. Con el tiempo las cosas importantes se van valorando más, y yo he aprendido a valorarlos a ellos por encima de todo. Día a día, ellos son mi apoyo, mis fuerzas, mis gratificaciones, mi recompensa. Gracias por todo lo que me ofrecéis, por todo lo que me valoráis, por todo lo que nos queda juntos. Me considero realmente afortunada por teneros conmigo, ahí, en casa. Mi madre, mi padre, mi hermana Ale, mi Clau, mi abuela, mi “cuñao”. OS QUIERO.

A “mi” Fran. Resulta esperanzador pensar que lo que buscas con tanto anhelo aparece sin esperártelo. Así, sin más. Yo tuve suerte, porque le encontré sin buscarle, y porque además resultó ser la persona que esperaba. Gracias por quererme, entenderme, apoyarme, respetarme, reprocharme, alentarme, felicitarme, compartirme y esperarme. En definitiva, gracias por hacerme tan feliz.

A Él. Gracias por darme todo lo que tengo, que es mucho. Espero nunca olvidarlo.

¡Ah! Y a Nestlé, por haber “patrocinado” esta Tesis Doctoral. Gracias por las descargas de serotonina que tan necesarias son en los momentos de flaqueza.



RESUMEN



La rizosfera alberga una gran y diversa comunidad de microorganismos procariotas y eucariotas que interactúan y compiten entre sí y con la raíz de la planta. De esta forma, la actividad de un determinado miembro de la comunidad afectará al crecimiento y a la fisiología de los otros, y como consecuencia, a las propiedades físicas y químicas del suelo (Rainey, 1999). De entre todas estas interacciones, gozan de gran importancia aquellas que proporcionan  $N_2$  al ecosistema en que se encuentran, asegurando así aportes suficientes del constituyente fundamental de moléculas esenciales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Sirva como ejemplo la asociación que establecen las leguminosas con el grupo bacteriano conocido como “rizobios”, considerada la interacción fijadora de  $N_2$  más significativa dentro del área agrícola (Burdman *et al.*, 1998).

Dicha relación simbiótica establecida entre los rizobios y sus hospedadores es el resultado de un complejo proceso de intercambio de señales entre ambos (Day *et al.*, 2000). A nivel de la planta, los flavonoides determinarán el rango de simbiontes compatibles, activando la expresión de unos genes bacterianos específicos (genes *nod*) que codifican para la síntesis de una segunda señal, los factores de nodulación (también conocidos como “factores Nod”). Estos serán reconocidos por la planta hospedadora y desencadenarán una serie de respuestas específicas que culminarán en la formación de unas nuevas estructuras denominadas “nódulos”, donde se hallan las formas fijadoras de nitrógeno, los bacteroides (Mergaert *et al.*, 1997b).

Sin embargo, factores bióticos y abióticos, como p. ej. la elevada salinidad del entorno, pueden alterar diversos parámetros críticos tanto de la leguminosa como del rizobio. Estos cambios pueden comprometer la eficacia del diálogo molecular entre ambos, alterándose consecuentemente el desarrollo de la simbiosis. Por esta razón, constituiría una ventaja el hecho de poder seleccionar y utilizar bacterias tolerantes a la sal como inoculantes comerciales, cuyos parámetros claves en el proceso de interacción con su hospedador no se viesen fuertemente afectados por este estrés. De esta forma, se podrían optimizar, en la medida de lo posible, aquellas simbiosis influidas negativamente por el entorno salino en el que se desarrollan, llegando incluso a anular los efectos negativos inducidos por la sal (Zahran, 1999).

En base a los antecedentes comentados, en este trabajo nos propusimos analizar en primer lugar los efectos del estrés salino sobre la producción de los factores de nodulación en simbiontes de judía y soja, dos de las leguminosas consideradas cruciales en el campo de la agricultura y alimentación mundial. Las cepas nodulantes de soja no

registraron cambio alguno en el perfil cromatográfico de sus factores de nodulación como consecuencia del estrés salino, a diferencia de las de judía, donde *R. tropici* CIAT899 entre otras, cepa simbiote de judía que muestra una alta tolerancia a diversos tipos de estrés, mostró cambios significativos en el perfil de sus factores Nod. Por este motivo, se analizó la expresión de sus genes de nodulación, responsables de la síntesis y excreción de los factores Nod, en condiciones control y de estrés salino, observando una mayor expresión de los mismos conforme incrementa la concentración salina del medio, independientemente de la presencia o no de inductor en el medio de ensayo. Estos resultados fueron corroborados al analizar la estructura de los factores Nod mediante técnicas de CCF, HPLC y Espectrometría de Masas, indicando que la salinidad afecta tanto a la cantidad como a la estructura de los mismos, independientemente del gen *nodDI*. Se observaron diferencias significativas entre las estructuras sintetizadas en la condición control y de estrés salino, identificándose 46 moléculas diferentes en esta última, frente a las 29 producidas en la condición control, con la cual sólo comparte 15 de ellas. Resultados similares o contrarios a los indicados para *R. tropici* CIAT899 fueron observados en otras cepas de *Rhizobium* capaces de nodular judía, indicando la especificidad del efecto del estrés salino para cada una de las cepas ensayadas. Asimismo, se discriminó entre el efecto osmótico e iónico que la sal común ejerce sobre el rizobio, mediante el empleo de osmolitos no iónicos, confirmando el componente iónico como el principal responsable del efecto observado, al mismo tiempo que se verificó la especificidad de la respuesta por el ión Na<sup>+</sup>.

Diversos estudios han demostrado que ciertos tipos de estrés abiótico pueden modificar la estructura de los factores Nod producidos por diferentes especies de *Rhizobium* (McKay & Djordjevic, 1993; Morón *et al.*, 2005). Sin embargo, ésta es la primera vez que se describe que la salinidad incrementa la producción de factores Nod por parte de los rizobios, independientemente de la presencia de inductor en el medio empleado para el caso de la cepa *R. tropici* CIAT899.

Seguidamente, se estudió el efecto de la salinidad sobre el hospedador, puesto que se conoce que las leguminosas son más sensibles al estrés salino y/u osmótico que sus propios rizobios nodulantes. Sabemos ciertamente que, frente a una situación de estrés, las plantas activan ciertos mecanismos que les permitirán una futura adaptación al nuevo ambiente (Walker *et al.*, 2003), lo cual conllevará seguramente cambios en la composición de sus exudados. Valorando estos antecedentes, se planteó el estudio de la capacidad inductora de las moléculas presentes en el exudado de judía y soja sobre los

genes de nodulación de sus simbioses (*R. tropici* CIAT899 y *R. etli* ISP42 para judía, y *E. fredii* SMH12 y HH103 para soja), así como su posterior repercusión sobre la síntesis de los factores Nod bajo condiciones control y de estrés salino. A pesar de la heterogeneidad de los resultados obtenidos para cada uno de los rizobios empleados en este estudio, podríamos resumir varios aspectos comunes a todos ellos: disminución de la actividad inductora de los exudados salinos de judía y soja con respecto a los obtenidos en condición control, efecto sumatorio del flavonoide comercial para con los exudados empleados, ausencia de moléculas inhibitorias en los exudados obtenidos de ambas plantas y variación de la capacidad inductora de los mismos con respecto al tiempo. Estudios paralelos de Espectrometría de Masas confirmaron cambios en la naturaleza de los flavonoides presentes en los exudados salinos de judía y soja, así como una disminución en el número de los mismos, con respecto a los obtenidos en la condición control. Este fenómeno podría justificar la disminución en la capacidad inductora de los genes *nod* anteriormente indicada, puesto que, si bien estas modificaciones pueden consistir en la desaparición de un único flavonoide, puede que éste ejerciese un efecto sinérgico sobre los restantes, o bien que su actividad inductora fuese mucho mayor con respecto al resto por la propia cuantía o calidad del flavonoide (Hartwing & Phillips, 1991).

Puesto que los determinantes moleculares de la simbiosis rizobio-leguminosa, flavonoides y factores Nod, se ven modificados como consecuencia del estrés salino, es altamente probable que el propio proceso simbiótico sufra igualmente modificaciones significativas. En este sentido, son numerosos los trabajos que han caracterizado los efectos negativos del estrés salino sobre el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa (Tu, 1981; Singleton *et al.*, 1982; Zahran & Sprent, 1986; Zahran, 1999). Por ese motivo, se llevaron a cabo ensayos de actividad biológica de las cepas *E. fredii* SMH12 y *R. tropici* CIAT899 en plantas de soja y judía, respectivamente, observando como el estrés salino provocaba una disminución en la tasa de nodulación, reducción del desarrollo vegetativo de la planta y retraso en el desarrollo de los nódulos. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la actividad biológica de los factores sintetizados en condiciones de estrés salino con respecto a los sintetizados en la condición control, para ambas cepas, en sus hospedadores correspondientes.

Al mismo tiempo se comprobó que los factores sintetizados por la cepa *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino y ácido, en ausencia de inductor, resultaron ser igual de activos que los inducidos, o incluso que los sintetizados bajo condiciones

control. Esta observación nos conduce a especular acerca de una posible estrategia desarrollada por la bacteria para ampliar su rango de hospedador, bajo condiciones de estrés salino, a plantas que puedan tolerar niveles de sal más elevados que *Phaseolus*. Y es que, a pesar de la existencia de cultivares de judía que toleran niveles altos de NaCl, como los descritas por Bayuelo-Jiménez *et al.* (2002), la mayoría de ellas no toleran valores superiores a 50 mM de NaCl (Saadallah *et al.*, 1998).

Estas modificaciones observadas en la simbiosis rizobio-leguminosa, como consecuencia del estrés salino, podrían ser paliadas, o incluso suprimidas, gracias al empleo de ciertas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs). Se trata de bacterias que, como su propia definición indica, promueven el crecimiento de la planta mediante mecanismos directos o indirectos, bien protegiéndola del ataque de algún patógeno, bien aumentando la cantidad de nutrientes disponibles, o bien, p. ej., protegiéndola de los efectos adversos del estrés abiótico, mecanismo que resulta interesante para el presente trabajo. En primer lugar se estudió la interacción a nivel de crecimiento de las tres PGPRs objeto de estudio (*P. fluorescens* WCS417r, *C. balustinum* Aur9 o *A. brasilense* Sp7) para con los rizobios seleccionados, con el fin de comprobar la ausencia de cualquier interacción negativa, tal y como proponían Cattelan *et al.* (1999). Posteriormente se determinó la repercusión que podría tener la presencia de dichas PGPRs, concretamente *C. balustinum* Aur9, sobre los exudados de las leguminosas hospedadoras, en base a los numerosos estudios que indican cambios en las pautas de exudación de las leguminosas como consecuencia de la presencia de rizobacterias en el medio de ensayo (van Brussel *et al.*, 1990; Dakora *et al.*, 1993b; Shaw *et al.*, 2006). En contra de lo esperado, se observó como la PGPR *C. balustinum* Aur9 no sólo no revertió los efectos negativos de la sal sobre la actividad inductora de los exudados de judía y soja, sino que provocó una nueva disminución de la misma. Estos cambios fueron corroborados mediante estudios por Espectrometría de Masas de los exudados en cuestión, registrando nuevamente una disminución en el número de flavonoides presentes, así como cambios en la naturaleza de los mismos, como consecuencia de la presencia de *C. balustinum* Aur9 durante el proceso de exudación.

Sin embargo, esta disminución en la cantidad de flavonoides presentes en el exudado como consecuencia de la presencia de la PGPR, y la consecuente disminución en la capacidad inductora de los genes *nod*, no se vio reflejada en los posteriores ensayos de actividad biológica. Ciertamente, las plantas de soja inoculadas con su simbionte *E. fredii* SMH12 presentaron el mismo desarrollo vegetativo y el mismo



estado y desarrollo del proceso de nodulación que aquellas plantas inoculadas con la mezcla *E. fredii* SMH12 + *C. balustinum* Aur9, tanto en condiciones control como de estrés salino. Se observó este mismo comportamiento para las plantas de judía inoculadas con la mezcla *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9 bajo condiciones control. Por el contrario, bajo condiciones de estrés salino, la PGPR ensayada si mostró un efecto protector frente a la sal en aquellas plantas de judía que fueron inoculadas con el inóculo doble *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9, las cuales presentaban el mismo desarrollo vegetativo y los mismos parámetros de nodulación que las plantas crecidas en condiciones control. Sin embargo, las plantas inoculadas exclusivamente con *R. tropici* CIAT899 sí mostraron un evidente retraso en los parámetros anteriormente indicados por efecto del estrés salino. Los resultados mostrados nos permiten, por lo tanto, presuponer una posible actividad protectora de la PGPR *C. balustinum* Aur9 frente al estrés salino en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa.

No obstante, estos datos se corroboraron a escalas superiores de experimentación y a tiempos más largos, con el fin de confirmar esta ventajosa cualidad de *C. balustinum* Aur9 en soportes de ensayo empleados en los estudios de nodulación de plantas, donde finalmente se comprobó que los inoculantes dobles son significativamente más efectivos que los simples en plantas de soja que en judía, y aun mejor la combinación *E. fredii* SMH12 + *C. balustinum* Aur9 que *E. fredii* HH103 + *C. balustinum* Aur9, hipótesis corroborada por los estudios de Lucas-García *et al.* (2004a). La promoción del crecimiento por parte de *C. balustinum* Aur9 en plantas de judía sólo fue efectiva durante los primeros días del ensayo, observándose un adelanto del proceso de nodulación, si bien los parámetros de nodulación se equipararon en los últimos días del estudio para los tratamientos simples y dobles.

En base a estos resultados, futuros estudios deberían llevarse a cabo para conocer con certeza los mecanismos empleados por la PGPR *C. balustinum* Aur9 para promover el crecimiento en plantas de soja y judía, puesto que Lucas-García *et al.* (2004a) indican que la variabilidad de las respuestas observadas dependen en gran medida de la fase del proceso que esta PGPR es capaz de modificar: infección, nodulación o fijación de nitrógeno. Al mismo tiempo, se deberían tener en consideración los protocolos de trabajo propuestos por estos mismos autores, para asegurar el efecto sinérgico entre los rizobios y las PGPRs y evitar los efectos negativos derivados de los fenómenos de competición.



The rhizosphere harbours a large and diverse community of prokaryotic and eukaryotic microorganisms that interact and compete with each other and with the plant root. Activity of any member of this community affects the growth and the physiology of the others, and also affects the physical and chemical properties of the soil (Rainey 1999). Among all these interactions, those resulting in symbiotics and nonsymbiotic nitrogen fixation, are considerably important, since they constitute a primary source of one of the major component of essential molecules such as nucleic acids and proteins. In this way, the symbiotic relationship between legumes and rhizobia is considered the most significant symbiotic nitrogen fixation interaction in both supplying food and improving soil health (Burdman *et al.*, 1998).

This symbiotic relationships formed between rhizobia and their legume hosts are the result of a complex signalling network between host and symbiont (Day *et al.*, 2000). Legume flavonoid compounds will determine the compatible symbionts via triggering the expression of rhizobial genes required for nodulation (*nod* genes), which produce a second signal in bacteria, called Nod factors. These signal molecules will be recognized by the plant host, resulting in the formation of nodules, within are found the nitrogen fixing forms, called bacteroides (Mergaert *et al.*, 1997b).

However, biotic and abiotic factors, i.e. increased salinity of soils, can modify critical parameters of both the legume and the rhizobia. These changes may consist in marked differences in the molecular dialogue, with consequences as enhancement or reduction in symbiotic effectiveness. Therefore, optimal performance of the N-fixing symbiosis will be guaranteed upon preselection of both symbiotic partners for adaptation to the target environment (Zahran, 1999).

Taking into account these considerations, the first purpose of this work was to explore the effects of salt stress on the production of Nod factors of common bean and soybean symbionts, since these two legume crops are considered the most used in the nourishment all over the world. Soybean rhizobia showed no changes in their Nod factors production by salt stress, unlike common bean symbionts, which registered significant changes in their Nod factors chromatographic profile, specially *R. tropici* CIAT899.

Expression of *R. tropici* CIAT899 nodulation genes was also studied both under control and salt stress conditions, noting that salt enhanced Nod factor production, high concentrations of sodium giving the highest effects. These results were supported by additional structural Nod factors analysis by TLC, HPLC and MS techniques, which

showed an increase in the number of different Nod factors produced in comparison with the control culture without NaCl, regardless of *nodD1* gene regulation activity. Under salt stress conditions, CIAT899 produced 46 different Nod factors compared to the 29 different Nod factors produced under control conditions. Of all those, only 15 Nod factors were common for both conditions. Some, but not all, other common bean rhizobia also showed salt enhanced Nod factor production, suggesting a specie-specificity of the phenomenon.

We could discriminate as well between the osmotic and the ionic effect of NaCl, by using non-ionic osmolytes, proving that the effect of NaCl on Nod factor production was mainly a sodium ion effect, next to a smaller osmotic one.

Several reports have shown that different types of abiotic stress can modify the Nod factor structure of some rhizobia (McKay & Djordjevic, 1993; Morón *et al.*, 2005). Nevertheless, this is the first report that describes salt stress as a factor increasing Nod factor production by common bean rhizobia, regardless the presence of the inductor in the case of *R. tropici* CIAT899.

The effect of salinity on the host was also studied, since legumes are described to be more sensitive to salt stress than their symbionts. Plants are known to activate several mechanisms to face stress situations, by means of adjustments to the new environmental conditions that may lead to changes in their exudation pattern (Walker *et al.*, 2003). Like so, we attempted to study the *nod* gene induction activity of the exudates of common bean and soybean plants, in *R. tropici* CIAT899 and *R. etli* ISP42 for common bean and *E. fredii* SMH12 and HH103 for soybean, under control and salt stress conditions. Even though the remarkable heterogeneity of the results, some common aspects can be concluded: decreasing of induction activity of salt exudates versus control ones, positive effect of the artificial inductor together with the exudates used, absence of inhibitor molecules in the exudates and oscillations in time of the induction activity of the exudates. Additional MS studies revealed changes forced by salt stress in both the structure and the amount of the flavonoids contained in common bean and soybean exudates. This fact could explain the reduction in the induction capacity of the salty exudates, because, although the change can consist in losing only one flavonoid, it's possible that this one could be performing a synergism effect over the rest, or even that its induction capacity is much more higher than the one of the other flavonoids contained in the exudates (Hartwing & Phillips, 1991).

As the molecular determinants of the rhizobium-legume symbiosis are modified by the salt stress, is quite possible that the symbiotic process changes itself. Indeed, several studies have reported the negative effects of the salt stress in the establishment of this symbiosis (Tu, 1981; Singleton *et al.*, 1982; Zahran & Sprent, 1986; Zahran, 1999). Hence, biological activity assays of *E. fredii* SMH12 and *R. tropici* CIAT899 were carried out on soybean and common bean plants, respectively. Salt stress reduced the nodulation rate, growth and nodule development of both plants. Nevertheless, no significant differences were registered in the biological activity assays of the Nod factors produced under control conditions versus those produced under saline conditions, for both selected partners.

*R. tropici* CIAT899's Nod factors produced under salt or acid stress conditions, with no inductor added, turned out to be as active as those produced after flavonoid induction, as well as those produced under control condition. The biological significance of this observation leads to the hypothesis of a mechanism developed by the bacterium to enlarge its host range to leguminous plants that are much more resistant to NaCl. As a matter of fact, although there are common bean cultivars that tolerate high salt concentrations (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002), the majority of beans are already inhibited in their growth at 50 mM NaCl (Saadallah *et al.*, 1998) and die at concentrations of NaCl required for these new Nod factors to be produced.

All these negative effects of salinity on the rhizobium-legume symbiosis could be diminished or, even suppressed, by using certain plant growth promoting rhizobacteria. This group of bacteria can promote plant growth by either direct or indirect mechanisms like protection against diverse pathogens, increasing nutrient uptake or suppressing negative effects of abiotic stress, mechanism quite interesting for this work. Consequently, we performed growth interaction studies among the four rhizobia strains already used and three PGPRs selected (*P. fluorescens* WCS417r, *C. balustinum* Aur9 and *A. brasilense* Sp7), in order to confirm no negative interaction among them, as Cattelan *et al.* (1999) proposed. On the other hand, several studies have reported changes in the exudates composition of a certain host when rhizobacteria were present in the assay medium (van Brussel *et al.*, 1990; Dakora *et al.*, 1993b; Shaw *et al.*, 2006). For this reason, we characterized the effect of *C. balustinum* Aur9 in the exudates of common bean and soybean, showing again a decreasing of the induction capacity of these exudates, as well as changes in their composition, as a consequence of the PGPR presence during the exudation process.

However, this negative effect on the induction activity of the exudates wasn't correlated with posterior biological activity assays, since plants coinoculated with both the rhizobium and the PGPR did not show any growth delay in contrast with those inoculated with the rhizobium alone, both under control and salt stress conditions. Furthermore, common bean plants coinoculated with *R. tropici* CIAT899 and *C. balustinum* Aur9 under salt stress conditions registered no negative effects, since they developed as well as those plants grown under control conditions. In contrast, the nodulation rate, the growth, and the nodule development of plants inoculated under salt stress condition with the rhizobium alone were seriously affected.

These studies were repeated using different experimental designs in order to confirm the protective effect of *C. balustinum* Aur9 against salt stress. Finally, coinoculation with rhizobia and *C. balustinum* Aur9 turned out to be much more effective in improving plant growth than inoculation with the rhizobia alone, specially in soybean plants coinoculated only with *E. fredii* SMH12 and *C. balustinum* Aur9, as Lucas-García *et al.* (2004a) already reported. Common bean growth promotion was only pronounced during the early stages of cultivation, registering an accelerate nodulation in comparison with plants inoculated with *R. tropici* CIAT899. However, nodulation parameters reached the same levels at the end of the kinetic nodulation assay for both treatments.

Taking into account all these data, future research should be focused in understanding the detailed mechanisms of plant growth promotion used by *C. balustinum* Aur9, given that Lucas-García *et al.* (2004a) proposed that variable results can be provoked by coinoculation with PGPR and rhizobia, depending on the phase of the process the PGPR is able to modify: infection, nodulation or nitrogen fixation. In the mean time, the work protocols used by these authors should be considered to ensure synergism effects among the rhizobia and the PGPR, while avoiding the negative effects derived from competitive interactions.

## **ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS**

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Ac	Grupo acetilo
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
AcN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico cíclico
ADP	Adenosín difosfato
AHLs	<i>N</i> -acil homoserín lactonas
AM	Arbuscular mycorrhiza
Ap <sup>R</sup>	Cepa resistente a la ampicilina
Api	Apigenina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
AU	Unidad de absorbancia
bv.	Biovariedad
°C	Grados centígrados
<sup>14</sup> C	Isótopo radiactivo carbono 14
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcio
Cb	Grupo carbamoilo
CCF	Cromatografía en capa fina
C.C.G.	Centro de Ciencias Genómicas
CH <sub>3</sub> CO	Grupo acetilo
CHS	Enzima chalcona sintetasa
CID	Collision-Induced Dissociation
Cl <sup>-</sup>	Ion cloruro
cm	Centímetro
Cm <sup>R</sup>	Cepa resistente al cloramfenicol
CO <sub>2</sub>	Anhídrido carbónico
CoA	Coenzima A
cv.	Cultivar



c.s.p.	Cantidad suficiente para
cps	Cuentas por segundo
D.O. <sub>600 nm</sub>	Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxi-nucleótidos-trifosfato
DP	Declustering potencial
e <sup>-</sup>	Electrón
ed./eds.	Editor/es
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ENOD	Early nodulins genes
<i>et al.</i>	y colaboradores
ePGPR	Extracellular PGPR
EPS	Exopolisacárido
ESI	Electrospray Ionization
ES-Q-o-Tof-MS	Electrospray-Quadrupole-o-Tof-Mass Spectrometry
FAB-MS	Fast Atomic Bombardment-Mass Spectrometry
FBN	Fijación biológica del nitrógeno
Fe <sup>3+</sup>	Ión férrico
fM	Femtomolar
Fix <sup>-</sup>	No fijador de N <sub>2</sub>
Fuc	Grupo fucosil
g	Gramo
GLCMS	Gas Liquid Chromatography Mass Spectrometry
Gm <sup>R</sup>	Cepa resistente a la gentamicina
Gen	Genisteína
h	Hora
H <sub>2</sub>	Hidrógeno molecular
H <sup>+</sup>	Protón
Ha	Hectárea
Hab	Root hair branching
Hac	Root hair curling

Had	Root hair deformation
HB	Hidrofóbico
HF	Hidrofilico
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>	Agua destilada
HOMOPIPES	Ácido homopiperazina-N-N'-bis-2-[etanosulfónico]
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
hsn	Host-specific <i>nod</i> -gene
I.F.A.P.A.	Instituto Andaluz de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
Inc.	Incorporated (Corporation)
Ini	Increased <i>nod</i> -gene-inducing activity
iPGPR	Intracellular PGPR
ISR	Induced systemic resistance
K <sup>+</sup>	Ion potasio
Kb	Kilobase
KCl	Cloruro potásico
Kg	Kilogramo
Km <sup>R</sup>	Cepa resistente a la kanamicina
KPS	Polisacárido capsular
Kv	Kilovoltio
L	Litro
L.	<i>Linneo</i>
LC/MS/MS	Liquid Chromatography/Mass Spectrometry
LCOs	Lipoquitoligosacáridos
LM	Líquido metabólico
LPS	Lipopolisacárido
M	Molar
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
Man	Grupo manosil
mCi	Milicuries
Me	Grupo metilo

mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMO	Medio mínimo óptimo
mmol	Milimol
MPa	Megapascales
MS	Mass Spectrometry
<i>m/z</i>	Unidad de masa/carga
n	Número de moles
N <sub>2</sub>	Nitrógeno molecular
Na <sup>+</sup>	Ion sodio
NaCl	Cloruro sódico
NAcGlc	<i>N</i> -acetil-D-glucosamina
NaCl	Cloruro sódico
NaOH	Hidróxido sódico
Nal <sup>R</sup>	Cepa resistente al ácido nalidixico
Nar	Naringenina
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sulfato sódico
NFR	Nod factor receptor
ng	Nanogramo
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ion amonio
nm	Nanómetro
NMe	Grupo metilo unido al grupo amino del terminal no reductor
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ion nitrito
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ion nitrato
Nº NOD	Número de nódulos
OH <sup>-</sup>	Ion hidroxilo
OM	Optimal medium
ONPG	O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido
pb	Pares de bases

PBM	Peribacteroidal membrane
PCR	Polimerase chain reaction
PEG6000	Polietilénglicol 6000
PGPR	Plant growth-promoting rhizobacteria
PGPB	Plant growth-promoting bacteria
pH	Logaritmo decimal negativo de la actividad molar de los iones H <sup>+</sup>
P <sub>i</sub>	Fósforo inorgánico
pM	Picomolar
p./pp.	Página/s
psi	Pounds per square inch
PSR	Peso seco de raíz
PSPA	Peso seco de parte aérea
pSym	Plásmido simbiótico
PRs	Proteínas de resistencia
PUNOD	Peso unitario de nódulo
p. ej.	Por ejemplo
Q	Quadropole
QS	Quorum sensing
rpm	Revoluciones por minuto
R	Constante de los gases
RCs	Reguladores del crecimiento
Rif <sup>R</sup>	Cepa resistente a la rifampicina
RMN	Resonancia magnética nuclear
S	Grupo sulfato
SA	Ácido salicílico
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
SAR	Systemic acquired resistance
SDS	Sodio docedil sulfato
seg	Segundo
sp./spp.	Especie/s

Str <sup>R</sup>	Cepa resistente a la estreptomicina
subsp.	Subespecie
T	Temperatura
Tc <sup>R</sup>	Cepa resistente a la tetraciclina
Tm	Tonelada métrica
TM	Trade Mark
Tof	Time of flight
Tsr	Thick and short root
UFC	Unidad formadora de colonia
U.S.A.	United States of America
UV	Ultravioleta
VAM	Vesicular arbuscular mycorrhiza
VBNC	Viable but not culturable
V/v	Volumen
μCi	Microcuries
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrómetro
&	y
π	Presión osmótica
σ	Factor “sigma”
%	Por ciento
©	Copyright
≤	Menor o igual que



## ÍNDICES

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. La rizosfera.....	5
1.2. Interacción rizobio-planta.....	8
1.2.1. La fijación biológica del nitrógeno (N <sub>2</sub> ): FBN.....	8
1.2.2. La simbiosis rizobio-leguminosa.....	10
1.2.3. Los rizobios y sus hospedadores.....	13
1.2.4. Compuestos inductores de los genes <i>nod</i> : los flavonoides.....	15
1.2.5. Los factores de nodulación.....	19
1.2.6. Actividad biológica de los factores Nod.....	23
1.3. Interacciones planta-PGPR.....	27
1.3.1. Concepto de PGPR.....	27
1.3.2. Mecanismos de acción de las PGPRs.....	28
1.3.2.1. Mecanismos directos.....	29
1.3.2.2. Mecanismos indirectos.....	31
1.3.3. Los rizobios como PGPRs.....	32
1.4. Interacción triple rizobio-PGPR-planta.....	34
1.4.1. Coinoculaciones.....	37
1.5. Factores bióticos y abióticos que influyen sobre la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa.....	39
1.5.1. Factores bióticos.....	39
1.5.2. Factores abióticos.....	41
1.5.2.1. Salinidad.....	41
1.5.2.2. Acidez del suelo.....	44
1.5.2.3. Temperaturas extremas.....	44
1.5.2.4. Disponibilidad limitada de N <sub>2</sub> en el suelo.....	45
1.5.3. Aplicaciones de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa en la mejora de los efectos negativos causados por el estrés ambiental.....	45
<b>2. Objetivos</b> .....	49
<b>3. Material y Métodos</b> .....	53
3.1. Material biológico.....	57
3.1.1. Bacterias y plásmidos.....	57



3.1.1. Plantas.....	59
3.2. Antibióticos, enzimas, flavonoides, reactivos, isótopos y oligonucleótidos.....	59
3.3. Medios y condiciones de cultivo de las bacterias.....	61
3.3.1. Medios, condiciones de cultivo y conservación de las bacterias.....	61
3.3.2. Medios de cultivo.....	62
3.3.2.1. Medio TY.....	62
3.3.2.2. Medio mínimo B <sup>-</sup> .....	62
3.3.2.3. Medio mínimo B <sup>-</sup> Glu-cas.....	63
3.3.2.4. Medio mínimo Nfb.....	63
3.3.3. Estudio del crecimiento bacteriano.....	64
3.3.4. Obtención del líquido metabólico (LM) de cultivos bacterianos....	64
3.3.5. Determinación de la tolerancia a la salinidad, estrés osmótico y estrés iónico. Crecimiento en diversas combinaciones de LM.....	65
3.4. Tampones y soluciones de trabajo.....	65
3.4.1. Tampón TE.....	66
3.4.2. Tampón TBE 0,5X.....	66
3.4.3. Buffer Z.....	66
3.4.4. Soluciones tampón para pHs.....	66
3.5. Aislamiento y manipulación del ADN.....	66
3.5.1. Aislamiento del ADN total.....	67
3.5.2. Determinación de la concentración del ADN.....	67
3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	67
3.5.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	68
3.6. Técnicas de análisis de factores de nodulación (factores Nod).....	68
3.6.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	68
3.6.2. Análisis estructural de los factores Nod.....	69
3.7. Ensayos de la actividad β-galactosidasa.....	70
3.8. Manejo de plantas.....	71
3.8.1. Solución nutritiva para el crecimiento de plantas.....	71
3.8.1.1. Solución Rigaud & Puppo.....	72
3.8.1.2. Solución de Fåhraeus.....	72
3.8.2. Desinfección y pregerminación de semillas.....	72
3.8.3. Obtención de exudados radicales.....	73
3.8.4. Técnicas de análisis de exudados de judía y soja.....	74
3.8.5. Ensayos de actividad biológica en plantas.....	74

	<b>Página</b>
3.8.6. Ensayos de nodulación.....	76
3.8.7. Ensayos de cinética de nodulación. ....	77
<b>4. Resultados.....</b>	<b>79</b>
4.1. Efecto del estrés salino sobre el microsimbionte.....	81
4.1.1. Efecto del estrés salino sobre cepas que nodulan plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Glycine max</i> .....	83
4.1.1.1. Estudio de la tolerancia al estrés salino de cepas que nodulan <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> .....	84
4.1.1.2. Efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de los factores Nod de los rizobios que nodulan <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> .....	85
4.1.2. Efecto del estrés salino sobre cepas de <i>Rhizobium</i> que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> .....	89
4.1.2.1. Estudios de tolerancia al estrés salino de cepas de <i>Rhizobium</i> que nodulan <i>P. vulgaris</i> .....	89
4.1.2.2. Efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de los factores Nod de cepas de <i>Rhizobium</i> que nodulan <i>P. vulgaris</i> .....	90
4.1.3. Efecto del estrés salino sobre <i>R. tropici</i> CIAT899.....	92
4.1.3.1. Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	92
4.1.3.2. Efecto del estrés salino sobre la expresión de los genes <i>nod</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	94
4.1.3.3. Efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	96
4.1.3.4. Análisis por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) y Espectrometría de Masas de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899 sintetizados en condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	100
4.1.4. Estudio comparativo de los efectos inducidos por el estrés salino- osmótico sobre la biosíntesis de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	105
4.1.4.1. Efecto del estrés osmótico (manitol-PEG6000) sobre <i>R.</i> <i>tropici</i> CIAT899.....	106
4.1.4.1.1. Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	106

4.1.4.1.2. Efecto del estrés osmótico sobre la expresión genes de nodulación y la biosíntesis de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	108
4.1.4.2. Efectos del estrés iónico (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KCl) sobre <i>R. tropici</i> CIAT899.....	111
4.1.4.2.1. Efecto del estrés iónico sobre la biosíntesis de factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899.....	111
4.1.5. Estudios preliminares de la influencia del estrés salino en la regulación de la biosíntesis de factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899..	113
4.2. Efecto del estrés salino sobre el macrosimbionte (leguminosa) y la simbiosis rizobio-leguminosa.....	119
4.2.1. Efecto del estrés salino sobre la actividad inductora y composición de los exudados de raíces de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> .....	123
4.2.1.1. Estudio de la actividad inductora de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi sobre los genes <i>nod</i> de sus simbiontes correspondientes, en condiciones control y de estrés salino.....	124
4.2.1.2. Estudio de la actividad inductora de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa sobre los genes <i>nod</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899, en condiciones control y de estrés salino.....	129
4.2.1.3. Estudios por HPLC y Espectrometría de Masas de los exudados de raíces de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi, obtenidos en condiciones control y de estrés salino.....	131
4.2.2. Efecto del estrés abiótico sobre los estadios iniciales de la interacción rizobio-leguminosa: estudio de la actividad biológica de los factores Nod de cepas nodulantes de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa y <i>G. max</i> cv. Osumi.....	135
4.2.2.1. Estudio de la actividad biológica de los factores Nod de <i>E. fredii</i> SMH12, obtenidos en condiciones control y de estrés salino, en plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi.....	136
4.2.2.2. Estudio de la actividad biológica de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899, obtenidos en condiciones control y de estrés abiótico, en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa.....	140
4.2.2.3. Estudio de la actividad biológica de las fracciones purificadas de los factores Nod no inducidos de <i>R. tropici</i> CIAT899: determinación de los factores Nod sintetizados en condiciones de estrés abiótico en ausencia de flavonoide.....	148

4.2.2.4. Estudio de la actividad biológica de los factores Nod de <i>R. tropici</i> RSP900 pCV3804, pCV38 y pCV61, obtenidos en condiciones control y de estrés salino, en presencia y ausencia de inductor, en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa.....	154
4.3. Estudio del empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) en la simbiosis rizobio-leguminosa, bajo condiciones control y de estrés salino.....	159
4.3.1. Estudio de la interacción rizobio-PGPR bajo condiciones control de crecimiento.....	163
4.3.1.1. Estudio del crecimiento de cepas que nodulan <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> en presencia del líquido metabólico (LM) de PGPRs y viceversa.....	164
4.3.1.2. Estudio de la expresión de los genes <i>nod</i> y la biosíntesis de los factores Nod de cepas que nodulan <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi, en presencia del LM de las PGPRs seleccionadas.....	167
4.3.2. Estudio de la interacción leguminosa-PGPR en condiciones control y de estrés salino.....	170
4.3.2.1. Estudio de la actividad inductora de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi sobre los genes <i>nod</i> de sus simbiontes correspondientes, obtenidos en presencia de <i>C. balustinum</i> Aur9, en condiciones control y de estrés salino.....	171
4.3.2.2. Estudio por HPLC y Espectrometría de Masas de los exudados de raíces de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi, obtenidos en presencia de <i>C. balustinum</i> Aur9, en condiciones control y de estrés salino.....	176
4.3.3. Estudio de la interacción rizobio-PGPR-leguminosa en condiciones control y de estrés salino.....	180
4.3.3.1. Estudio de la actividad biológica de <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>E. fredii</i> SMH12, en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa y <i>G. max</i> cv. Osumi, preinoculadas con <i>C. balustinum</i> Aur9, bajo condiciones control y de estrés salino.....	180
4.3.3.2. Ensayos de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>E. fredii</i> SMH12 en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi respectivamente, en presencia o ausencia de <i>C. balustinum</i> Aur9, bajo condiciones control y de estrés salino.....	185

	<b>Página</b>
<b>5. Discusión.....</b>	191
5.1. Efecto del estrés salino sobre el microsimbionte.....	195
5.2. Efecto del estrés salino sobre el macrosimbionte (leguminosa) y la simbiosis rizobio-leguminosa.....	210
5.3. Estudio del empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) en la simbiosis rizobio-leguminosa, bajo condiciones control y de estrés salino.....	225
<b>6. Conclusiones.....</b>	237
<b>7. Bibliografía.....</b>	243
<b>8. Apéndice.....</b>	293
8.1. Tablas.....	295
8.2. Figuras.....	303

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1.1. Modelo de los posibles mecanismos de exudación e interacciones rizosféricas activas.....	7
1.2. Ciclo del nitrógeno.....	9
1.3. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	11
1.4. Flavonoides que promueven la germinación de endosporas de micorrizas arbusculares, inducen los genes <i>nod</i> o estimulan el crecimiento de los rizobios.....	17
1.5. Estructura básica de los factores Nod y sus radicales más comunes.....	20
1.6. Instantáneas del proceso de curvatura del pelo radical de <i>Medicago truncatula</i> tras 0, 15, 30, 45 y 60 segundos desde la aplicación de factores Nod purificados.....	24
1.7. Modelo de señalización por factores Nod y factores Myc.....	26
1.8. Estructura básica de las AHLs y moléculas inductores que actúan por mecanismos de QS, de naturaleza distinta de las AHLs.....	35
1.9. Coordinación de la expresión génica durante la colonización del hospedador mediante mecanismos de QS y sistemas reguladores de dos componentes.....	36
1.10. Modelo de vías de señalización sistémicas inducidas en plantas por rizobacterias patogénicas y no patogénicas.....	40
1.11. Distribución de suelos salinos en el mundo.....	42
3.1. Sistema de recogida de exudados a gran escala de judía en soporte de rejilla.....	73
3.2. Sistema de tubo empleado en los ensayos de actividad biológica.....	75
3.3. Plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL crecidas en sistemas de macetas de arena de cuarzo estéril.....	77
3.4. Sistemas empleados en los ensayos de cinética de nodulación.....	78
4.1. Tolerancia al estrés salino de cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> .....	85

4.2. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> , bajo condiciones de crecimiento control.....	86
4.3. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> , bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	87
4.4. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> , bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	91
4.5. Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 crecida en medio mínimo B <sup>-</sup> bajo condiciones control y de estrés salino.....	93
4.6. Actividad β-galactosidasa de <i>R. tropici</i> RSP3051 crecida en medio mínimo B <sup>-</sup> control y de estrés salino.....	95
4.7. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	98
4.8. Cromatogramas de HPLC de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899 obtenidos en condiciones de crecimiento control y de estrés salino, inducidos por apigenina 1 μM.....	101
4.9. Cromatogramas de HPLC de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899 obtenidos en condiciones de crecimiento control y de estrés salino, en ausencia y presencia de apigenina 1 μM.....	102
4.10. Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 crecida en medio mínimo B <sup>-</sup> bajo condiciones control y de estrés osmótico.....	107
4.11. Efecto del estrés osmótico sobre la expresión de los genes de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones de crecimiento control y de estrés osmótico.....	110
4.12. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones de crecimiento control y de estrés salino por Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KCl y NaCl.....	112
4.13. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP900 pCV3804, pCV38 y pCV61, en condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	115

4.14. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por las cepas <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP82 en condiciones de crecimiento control y de estrés salino (300 mM de NaCl).....	117
4.15. Efecto de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), sobre <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. etli</i> ISP42.....	126
4.16. Efecto de los exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), sobre <i>E. fredii</i> SMH12 y HH103.....	128
4.17. Actividad $\beta$ -galactosidasa de la cepa <i>R. leguminosarum</i> RBL5280 inducida con exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa obtenidos en condiciones control y de estrés salino (0, 25, 35 y 50 mM de NaCl).....	130
4.18. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 crecida en medio mínimo B <sup>-</sup> o en exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa obtenidos a los 4 y 7 días.....	131
4.19. Cromatograma por HPLC de los flavonoides empleados como patrones de ensayo en el estudio de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi.....	132
4.20. Estudio de actividad biológica de la estirpe <i>E. fredii</i> SMH12 sobre plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi.....	137
4.21. Estudio comparativo del desarrollo nodular de <i>E. fredii</i> SMH12 inoculada en plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi, bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	138
4.22. Estudio comparativo de la actividad biológica de los factores Nod sintetizados por <i>E. fredii</i> SMH12 bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl), en plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi.....	139
4.23. Estudio de actividad biológica de la estirpe <i>R. tropici</i> CIAT899 sobre plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa.....	141



4.24. Estudio comparativo del desarrollo nodular de <i>R. tropici</i> CIAT899 inoculada en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa, bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	142
4.25. Nódulos y primordios nodulares tras inocular plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa con factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones control y de estrés salino (300 mM de NaCl).....	144
4.26. Raíz de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculada con factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899 obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl).....	146
4.27. Nódulos y primordios nodulares tras inocular plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa con factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones de estrés ácido (pH 4,5).....	147
4.28. Primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con diversas fracciones procedentes del HPLC de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899, sintetizados en condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y en ausencia de inductor.....	150
4.29. Cromatograma de HPLC del segundo análisis de la fracción obtenida en el minuto 20 del HPLC de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899, bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y ausencia de inductor.....	151
4.30. Nódulos y primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con factores Nod sintetizados bajo condiciones control por las cepas <i>R. tropici</i> RSP900 pCV61, pCV38 y pCV3804.....	156
4.31. Nódulos y primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con las cepas <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP900 pCV3804.....	157
4.32. Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	305
4.33. Curvas de crecimiento de <i>R. etli</i> ISP42 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	306

4.34. Curvas de crecimiento de <i>E. fredii</i> SMH12 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	307
4.35. Curvas de crecimiento de <i>E. fredii</i> HH103 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	308
4.36. Curvas de crecimiento de <i>P. fluorescens</i> WCS417r en distintas proporciones de los LM de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	309
4.37. Curvas de crecimiento de <i>C. balustinum</i> Aur9 en distintas proporciones de los LM de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	310
4.38. Curvas de crecimiento de <i>A. brasilense</i> Sp7 en distintas proporciones de los LM de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	311
4.39. Efecto de los LM de las PGPRs <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 y <i>A. brasilense</i> Sp7 sobre la expresión de los genes de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	168
4.40. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> , en presencia de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 y <i>A. brasilense</i> Sp7.....	170
4.41. Efecto de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL, obtenidos bajo condiciones control y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de <i>C. balustinum</i> Aur9, sobre <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. etli</i> ISP42.....	173
4.42. Efecto de los exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi, obtenidos bajo condiciones control y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de <i>C. balustinum</i> Aur9, sobre <i>E. fredii</i> SMH12 y HH103.....	175
4.43. Desarrollo vegetativo de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con <i>R. tropici</i> CIAT899 + <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>R. tropici</i> CIAT899, bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl.....	182

4.44. Detalle de raíz y nódulos y/o primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con <i>R. tropici</i> CIAT899 + <i>C. balustinum</i> Aur9 o con <i>R. tropici</i> CIAT899, ambas bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl.....	183
4.45. Desarrollo vegetativo de plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi inoculadas con <i>E. fredii</i> SMH12 + <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>E. fredii</i> SMH12, bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl.....	184
4.46. Plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL crecidas bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	186
4.47. Estudio de la cinética de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899 en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL, en ausencia o presencia de la PGPR <i>C. balustinum</i> Aur9, bajo condiciones control y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	190
5.1. Plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa, crecidas en condiciones control y de estrés salino (25 y 50 mM de NaCl), en sistemas de recogida de exudados y tubos de ensayo de actividad biológica.....	217

## ÍNDICE DE TABLAS

Página

### Tabla

I.1. Mecanismos directos empleados por las PGPRs.....	30
I.2. Mecanismos indirectos empleados por las PGPRs.....	32
III.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	57
III.2. Plásmidos usados en este trabajo.....	58
III.3. Antibióticos utilizados en este trabajo.....	60
III.4. Secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	61
III.5. Medios de cultivo óptimos utilizados para el crecimiento bacteriano.....	61
IV.1. Parámetros de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones control y de estrés salino (300 mM de NaCl).....	94
IV.2. Factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones control y de estrés salino (300 mM de NaCl), inducida por apigenina 1 µM.....	297
IV.3. Factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl), en ausencia de apigenina.....	299
IV.4. Flavonoides identificados en exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL obtenidos en condiciones control y de estrés salino (50 mM de NaCl).....	133
IV.5. Flavonoides identificados en exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl).....	134
IV.6. Factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina.....	300
IV.7. Factores de nodulación biológicamente activos sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y ausencia de apigenina. Segundo análisis.....	152
IV.8. Factores de nodulación biológicamente activos sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,5) y ausencia de apigenina. Segundo análisis.....	153
IV.9. Factores de nodulación no activos biológicamente sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones control de estrés salino (300 mM de NaCl) y ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina.....	154

<b>IV.10.</b> Estudio comparativo de los factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina. Segundo análisis.....	300
<b>IV.11.</b> Flavonoides identificados en exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL obtenidos en condiciones control y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia de <i>C. balustinum</i> Aur9.....	178
<b>IV.12.</b> Flavonoides identificados en exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi obtenidos en condiciones control y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia de <i>C. balustinum</i> Aur9.....	179
<b>IV.13.</b> Parámetros de nodulación de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL en condiciones control y de estrés salino (25 mM de NaCl), con inóculos simples ( <i>R. tropici</i> CIAT899 o <i>R. etli</i> ISP42) o dobles ( <i>R. tropici</i> CIAT899 o <i>R. etli</i> ISP42 + <i>C. balustinum</i> Aur9).....	187
<b>IV.14.</b> Parámetros de nodulación de <i>G. max</i> cv. Osumi en condiciones control y de estrés salino (25 mM de NaCl), con inóculos simples ( <i>E. fredii</i> SMH12 o HH103) y dobles ( <i>E. fredii</i> SMH12 o HH103 + <i>C. balustinum</i> Aur9).....	188



## INTRODUCCIÓN





## **1. Introducción.**

- 1.1. La rizosfera.
- 1.2. Interacción rizobio-planta.
- 1.3. Interacciones planta-PGPR.
- 1.4. Interacción triple rizobio-PGPR-planta.
- 1.5. Factores bióticos y abióticos que influyen sobre la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa.

## ÍNDICE DE FIGURAS DE LA INTRODUCCIÓN

	<b>Página</b>
1.1. Modelo de los posibles mecanismos de exudación e interacciones rizosféricas activas.....	7
1.2. Ciclo del nitrógeno.....	9
1.3. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.....	11
1.4. Flavonoides que promueven la germinación de endosporas de micorrizas arbusculares, inducen los genes <i>nod</i> o estimulan el crecimiento de los rizobios.....	17
1.5. Estructura básica de los factores Nod y sus radicales más comunes.....	20
1.6. Instantáneas del proceso de curvatura del pelo radical de <i>Medicago truncatula</i> tras 0, 15, 30, 45 y 60 segundos desde la aplicación de factores Nod purificados.....	24
1.7. Modelo de señalización por factores Nod y factores Myc.....	26
1.8. Estructura básica de las AHLs y moléculas inductores que actúan por mecanismos de QS, de naturaleza distinta de las AHLs.....	35
1.9. Coordinación de la expresión génica durante la colonización del hospedador mediante mecanismos de QS y sistemas reguladores de dos componentes.....	36
1.10. Modelo de vías de señalización sistémicas inducidas en plantas por rizobacterias patogénicas y no patogénicas.....	40
1.11. Distribución de suelos salinos en el mundo.....	42

## ÍNDICE DE TABLAS DE LA INTRODUCCIÓN

I.1. Mecanismos directos empleados por las PGPRs.....	30
I.2. Mecanismos indirectos empleados por las PGPRs.....	32

## 1.1. La rizosfera.

El suelo constituye un ambiente heterogéneo con numerosos parámetros fluctuantes que pueden afectar al crecimiento y la supervivencia de las bacterias que se encuentran en el mismo (Paul & Clark, 1988). Igualmente, la porción del suelo circundante a la raíz de una planta es de crucial importancia para la salud y nutrición de la misma (Marschner, 1995). Fue el agrónomo alemán L. Hiltner quién, en 1904, englobó ambos aspectos en un único término, la rizosfera, refiriéndose al mismo como el efecto de las raíces de leguminosas sobre el suelo que las rodea, donde se hace patente una mayor actividad microbiana por la liberación de materia orgánica desde las raíces. Sin embargo, este concepto ha ido sufriendo modificaciones a lo largo de los años hasta incluir tanto el volumen de suelo influido por la raíz como los tejidos radicales colonizados por microorganismos presentes en el suelo (Pinton *et al.*, 2001).

La rizosfera alberga una gran y diversa comunidad de microorganismos procariotas y eucariotas que interactúan y compiten entre sí y con la raíz de la planta. Aproximadamente,  $10^9$ - $10^{12}$  células/g de suelo pueden encontrarse en el entorno próximo a una raíz, del cual sólo entre el 7 y el 15% ocupa la superficie radical (Foster *et al.*, 1983; Pinton *et al.*, 2001). De esta forma, la actividad de un determinado miembro de la comunidad afectará al crecimiento y a la fisiología de los otros, y, como consecuencia, a las propiedades físicas y químicas del suelo (Rainey, 1999). Por consiguiente, la consideración de la interacción planta-suelo-microorganismo (Lynch, 1990) será imprescindible a la hora de estudiar la rizosfera de una determinada planta, puesto que los cambios que sufra cualquiera de los tres integrantes del conjunto repercutirá en el resto del mismo.

Dentro de este sistema de interacciones triple, la relación microorganismo-planta ha recibido gran atención a lo largo de los últimos años. La comunicación entre ambos componentes está basada en la exudación radical de compuestos orgánicos que reciben el nombre de rizodeposiciones (Somers *et al.*, 2004). Su naturaleza química es muy diversa y entre ellos se pueden encontrar azúcares sencillos, polisacáridos, aminoácidos, ácidos orgánicos, ácidos grasos, esteroides, factores de crecimiento, enzimas, flavonoides, vitaminas, etc. Según la naturaleza y forma de liberación, éstos pueden clasificarse en exudados radicales (compuestos solubles en agua de bajo peso molecular y que se liberan de forma pasiva, Bowen & Rovira, 1999), secreciones (compuestos de

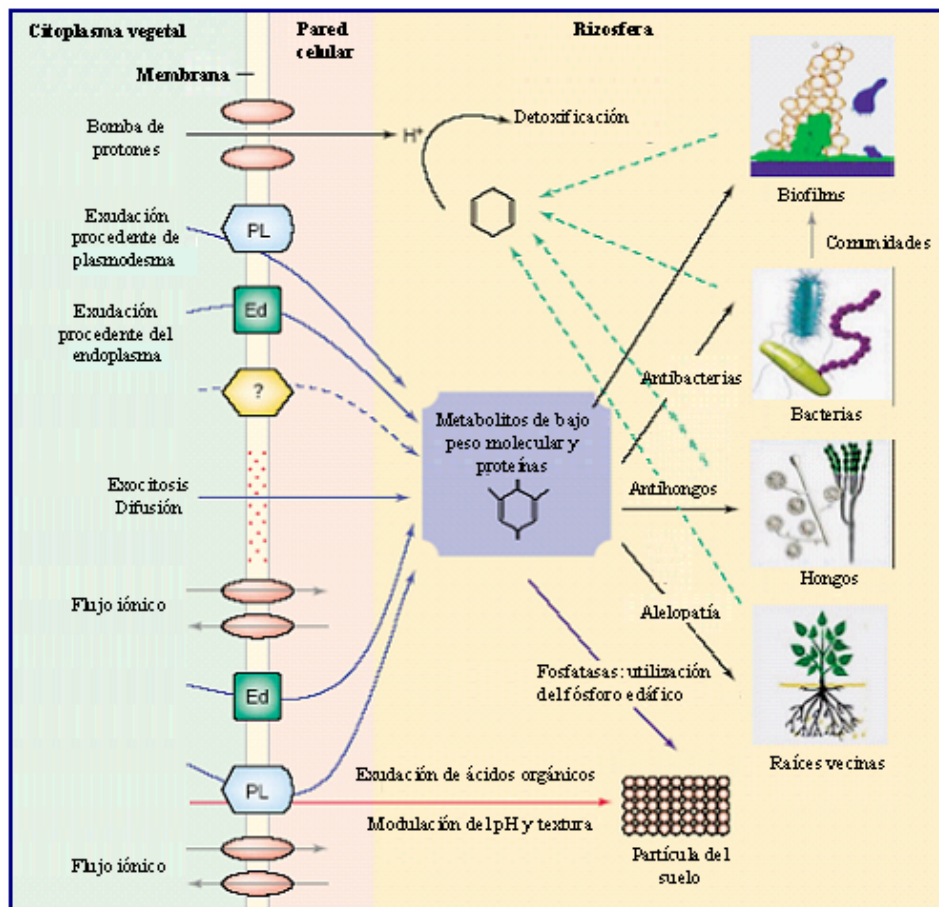
alto peso molecular que se liberan al medio de forma activa, Hale *et al.*, 1978); lisados (compuestos liberados por las células tras procesos de lisis, Whipps, 1990), gases (dióxido de carbono, etileno y ácido cianhídrico) y mucílagos (formados fundamentalmente por polisacáridos capaces de retener gran cantidad de agua formando mucigeles que protegen ciertas zonas de la raíz, Watt *et al.*, 1993; Traore *et al.*, 2000).

Los factores que influyen en la liberación de estos compuestos son numerosos, los cuales afectarán al mismo tiempo a la rizosfera, debido a la estrecha interconexión planta-suelo-microorganismo. Así, una determinada especie vegetal será capaz de liberar compuestos diferentes en función de las características del medioambiente que la rodee. Entre estos factores, se pueden destacar la especie estudiada, la edad y el estado de desarrollo de la planta, las características nutricionales del suelo, la disponibilidad de agua, el pH y la salinidad del suelo, la temperatura del entorno, la intensidad de luz que reciba, la concentración atmosférica de CO<sub>2</sub> y el tipo de microorganismos presentes en la rizosfera (Jones *et al.*, 2004).

La liberación de compuestos orgánicos vía exudación condiciona la comunidad microbiana propia de la rizosfera de cada planta. De hecho, las rizobacterias responden en cuanto a su diversidad, composición y actividad a la abundancia y diversidad de los exudados vegetales, por lo que, teniendo en cuenta la presión selectiva que la planta ejerce sobre la comunidad microbiana colindante, ciertos autores han planteado la existencia de microfloras específicas de cada planta (Lucas-García *et al.*, 2001; Kowalchuk *et al.*, 2002). Este fenómeno refleja una estrategia adaptativa de los vegetales, quienes, a cambio de proporcionar materia orgánica para el crecimiento de las rizobacterias (coste), reciben determinados nutrientes y/o beneficios varios de éstas últimas (beneficio). A la postre, la relación “coste-beneficio” que implica el proceso de exudación será netamente positiva para la planta (Grayston *et al.*, 1998; Pinton *et al.*, 2001). La existencia de respuestas por parte de las rizobacterias a la exudación de la planta, y de cambios en el proceso de exudación por la presencia de los microorganismos sugieren cierto grado de co-evolución entre las plantas y los microorganismos del suelo (Atkinson & Watson, 2000).

Conjuntamente con la selección de microorganismos, los exudados radicales tienen otras funciones específicas como son la protección contra patógenos, reducción de la competencia y establecimiento de relaciones simbióticas entre otras (Dakora & Phillips, 2002). La figura 1.1. muestra un conjunto de las numerosas interacciones que tienen lugar en la rizosfera y que están mediadas por numerosas señales químicas

sintetizadas por los diferentes organismos y que pueden verse afectadas por diferentes situaciones.



**Figura 1.1.** Modelo de los posibles mecanismos de exudación e interacciones rizosféricas activas (Bais *et al.*, 2004). PL: exudación derivada de plasmodesma, Ed: exudación derivada del endoplasma.

Estas interacciones constituyen hoy en día el objeto de estudio de numerosas técnicas dedicadas a la caracterización de la interacción planta-suelo-microorganismo, ya que la modulación artificial de las mismas puede influir en el crecimiento y desarrollo de la planta, alterando p. ej. parámetros como la dinámica de los nutrientes requeridos o la susceptibilidad a situaciones de estrés. Muchos de los obstáculos que se plantean en estos trabajos son puramente metodológicos (Morgan & Whipps, 2001). Sin embargo, la aparición de nuevas técnicas moleculares están incrementando afortunadamente día a día nuestro conocimiento de estos sistemas interactuantes (Barea *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005).

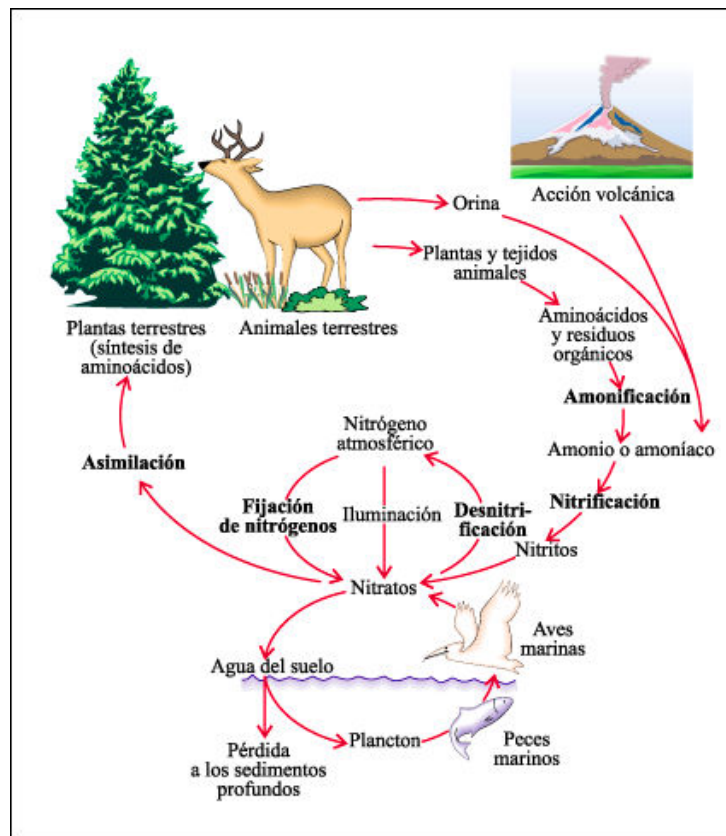
## 1.2. Interacción rizobio-planta.

### 1.2.1. La fijación biológica del nitrógeno (N<sub>2</sub>): FBN.

Gran parte de las interacciones que tienen lugar en la rizosfera constituyen un punto clave dentro del aspecto económico de la agricultura mundial, puesto que son consideradas piezas claves en la función y mantenimiento de muchos ecosistemas (Abbott & Murphy, 2004). De entre todas las interacciones anteriormente indicadas, gozan de gran importancia aquellas que proporcionan N<sub>2</sub> al ecosistema en que se encuentran, asegurando así aportes suficientes del constituyente fundamental de moléculas esenciales como las proteínas y los ácidos nucleicos (Madigan *et al.*, 2004). Ciertamente, una producción agrícola de alta calidad y rica en proteínas depende fundamentalmente de la disponibilidad del N<sub>2</sub> (Ladha & Peoples, 1995).

La población mundial de la última década, en torno a 6 billones de personas, consumen una cantidad aproximada de 11 g de N<sub>2</sub> por persona y día, valor que equivale a un total de 24 millones de Tm anuales (Frink *et al.*, 1999). Sin embargo, el nitrógeno no es un elemento de fácil disposición en la naturaleza. Las formas más fácilmente asimilables para las plantas y bacterias son amonio (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y nitrito (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) (Taiz & Zeiger, 1991), las cuales representan sólo un pequeño porcentaje del total del nitrógeno terrestre. Dentro de la biosfera, la mayor parte del mismo se encuentra en forma inorgánica, principalmente en forma de di-nitrógeno atmosférico (N<sub>2</sub>) (alrededor de 1.015 Tm de gas N<sub>2</sub>, representando el 79,1% de la atmósfera), aunque también se encuentra en menor proporción en la litosfera, combinado formando parte de compuestos bastante estables en las rocas que son inaccesibles para los seres vivos (Zahran, 1999).

Por estos motivos, el nitrógeno constituye un grave factor limitante de la producción agrícola mundial, junto con la luz y el agua (Graham & Vance, 2000), puesto que su asimilación por la planta depende de una conversión previa del N<sub>2</sub> atmosférico a nitrato, nitrito o amonio. Este proceso, denominado "fijación del nitrógeno", se lleva a cabo mediante métodos industriales, naturales y biológicos (figura 1.2.).



**Figura 1.2.** Ciclo del nitrógeno.

Artificialmente, se suele recurrir al empleo de abonos nitrogenados elaborados químicamente gracias al proceso industrial denominado “reacción de Haber”, el cual tiene un elevado coste tanto económico como ecológico debido a su enorme potencial de contaminación ambiental. Por otro lado, los procesos naturales de la fijación del nitrógeno como, por ejemplo, los derivados de la acción de la luz solar sobre el  $N_2$  atmosférico, tampoco constituyen una provechosa alternativa, ya que únicamente aportan el 10% del total del nitrógeno fijado.

Sin embargo, la fijación biológica del nitrógeno (FBN), realizada por diferentes microorganismos, resulta ser una excelente medida en la aportación de este elemento al suelo, la cual constituye el 90% del total del nitrógeno fijado. Asimismo, su disfrute permitirá la preservación y desarrollo de la denominada “agricultura sostenible”, entendiendo por tal aquella que intenta manejar y conservar de manera más eficiente los recursos de los que se dispone, manteniendo un ambiente favorable para la evolución de todas las especies (Vance, 1998). De esta forma, los aportes de  $N_2$  al suelo mediante el proceso de la FBN favorecerán la implantación y el perfeccionamiento de prácticas

agrícolas económicamente viables y medioambientalmente prudentes (Graham & Vance, 2000).

Las interacciones establecidas entre las plantas y microorganismos fijadores de nitrógeno, tanto simbióticos como no, se han usado mundialmente durante décadas con el fin de incrementar la productividad de los cultivos y optimizar la salud del suelo (van Veen *et al.*, 1997), hasta concentrar hoy en día aproximadamente el 65% del N<sub>2</sub> fijado (180 millones de Tm/año). De entre todas las interacciones empleadas en este proceso de FBN, la asociación que establecen las leguminosas con el grupo bacteriano conocido como “rizobios” es la más significativa dentro del área agrícola (Burdman *et al.*, 1998). Esta interacción microorganismo-planta es efectivamente la que participa en mayor grado en el aporte de N<sub>2</sub> a las cosechas (Zahran, 1999), proporcionando entre el 25 y el 35% de las proteínas que se consumen a nivel mundial (Vance *et al.*, 2000). Asimismo, la asociación simbiótica entre leguminosas y rizobios en prácticas agrícolas como, por ejemplo, la rotación de cultivos, o el empleo de cultivos mixtos, permite extender los beneficios de la fijación del nitrógeno a otras plantas que no sean leguminosas.

### **1.2.2. La simbiosis rizobio-leguminosa.**

La relación simbiótica establecida entre los rizobios y sus hospedadores es el resultado de un complejo proceso de intercambio de señales entre ambos, que da lugar a la formación de unas nuevas estructuras denominadas “nódulos”, donde se hallan las formas fijadoras de nitrógeno, los bacteroides. En este epígrafe proporcionaremos una visión global del proceso simbiótico, resumido en la figura 1.3., si bien posteriormente se desarrollarán con mayor amplitud algunas de las materias que se describen a continuación.

La infección de las leguminosas conlleva en primer lugar un proceso de quimiotaxis de la bacteria hacia los distintos compuestos que la planta exuda como ácidos orgánicos, aminoácidos, azúcares y flavonoides. A continuación, tendrá lugar la adhesión del rizobio al pelo radical, proceso en el que moléculas como los lipopolisacáridos (LPS), exopolisacáridos (EPS), polisacáridos capsulares (KPS) y adhesinas juegan un papel crucial (Smit *et al.*, 1989; Kannenberg *et al.*, 1998).



Paralelamente, los flavonoides liberados por la planta activan la expresión de unos genes rizobianos imprescindibles en el proceso de nodulación, comúnmente conocidos como “genes *nod*” y que engloba a los genes *nod*, *nol* y *noe*.

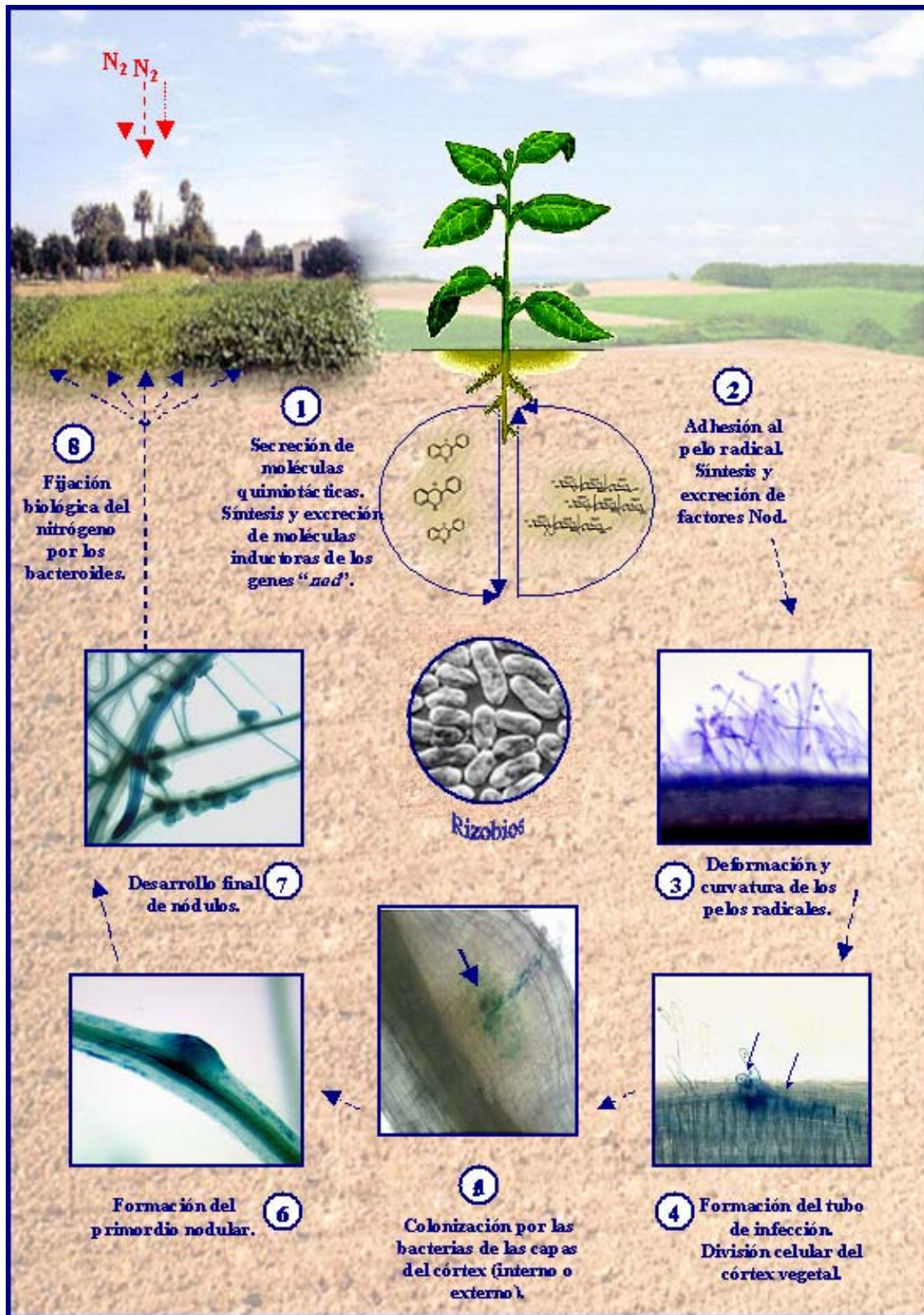


Figura 1.3. Establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa.

Este proceso está regulado principalmente por proteínas de la familia LysR, las NodDs (Schell, 1993), encargadas de activar o reprimir el proceso de expresión génica. Se trata de reguladores transcripcionales que se han de unir a unas regiones del ADN bacteriano altamente conservadas denominadas “cajas de nodulación” (“*nod box*”, Fisher *et al.*, 1988), situadas en las regiones promotoras de los genes *nod*. La expresión de estos genes de nodulación desencadenará la síntesis de una segunda señal, los factores de nodulación (también conocidos como “factores Nod”), que serán reconocidos por la planta hospedadora.

Los factores Nod consisten en un esqueleto oligomérico de 2 a 6 unidades de *N*-acetil-D-glucosamina aciladas (NAcGlu), unidas por un enlace  $\beta$ -1, 4 con ciertas modificaciones que determinan el rango de hospedador (Spaink, 2000). Actúan a concentraciones muy bajas (nano, pico y femtomolar), induciendo cambios en el flujo de iones, despolarización transitoria de la membrana, curvatura y deformación característica de los pelos radicales, expresión de genes de la planta denominados “nodulinas tempranas” y formación del primordio nodular. La bacteria queda finalmente atrapada por la curvatura del pelo, e induce la formación del tubo de infección a partir de tejido vegetal, el cual penetra a través de las células vegetales mientras que la bacteria comienza a multiplicarse y a penetrar en la zona de la dermis (Downie & Walker, 1999; D'Haese & Holsters, 2002; Riely *et al.*, 2004). Simultáneamente a la formación del cordón de infección, se produce la división de las células del córtex que darán lugar a la aparición de los primordios nodulares. La localización del primordio nodular en el córtex de la raíz depende del tipo de nódulo que forma cada planta en concreto (Newcomb, 1981). En general, en leguminosas de climas templados tales como el guisante o la alfalfa, el primordio se forma en el córtex interno (Dudley *et al.*, 1987), dando lugar a los denominados “nódulos indeterminados”, de forma cilíndrica y con un meristemo apical persistente (Newcomb, 1976). La actividad continua del meristemo asegura el alargamiento del nódulo, ya que constantemente se van añadiendo nuevas células en el extremo distal del mismo. Por otro lado, la mayoría de las plantas tropicales, como la soja y la judía, siguen un modelo de crecimiento determinado, originándose nódulos de forma esférica (Newcomb *et al.*, 1979). El meristemo se divide en la zona externa del córtex de la raíz y las bacterias se liberan en las células meristemáticas que se están dividiendo (Oke & Long, 1999).

Las bacterias que han penetrado hasta capas interiores del tejido del hospedador, se liberan y quedan envueltas en una membrana de origen vegetal, denominada

membrana peribacteroidal (PBM, del inglés “**peribacteroidal membrane**”), la cual facilita la división y diferenciación de estas bacterias a unas nuevas estructuras denominadas bacteroides. Este nuevo orgánulo formado por la PBM y el propio bacteroide es conocido como simbiosoma (Roth *et al.*, 1988), y se trata de la unidad básica fijadora del nitrógeno en el nódulo. Las membranas peribacteroidal y bacteroidal serán las encargadas de controlar el tráfico de nutrientes entre la planta y el bacteroide, como por ejemplo el flujo de carbono reducido en forma de ácidos dicarboxílicos de la planta al bacteroide y de nitrógeno fijado en sentido contrario, el cual será transportado posteriormente a otras partes de la planta en forma de amidas o ureidos (Udvardi & Day, 1997). No obstante, existen muchos otros metabolitos que también son intercambiables, sobre todo en aquellos casos en que los bacteroides están implicados en el ciclo de los aminoácidos (Lodwig *et al.*, 2003; Prell & Poole, 2006).

Los bacteroides reducen el N<sub>2</sub> a amonio gracias a la acción de la enzima nitrogenasa mediante el proceso altamente energético que sigue la ecuación propuesta por Werner (1992):  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$

El complejo enzimático de la nitrogenasa está formado por dos proteínas, y su síntesis y actividad requieren un preciso mecanismo de control de la disponibilidad de oxígeno, de modo que éste llega a los bacteroides transportado por una hemoglobina, la leghemoglobina, la cual representa el componente principal del citoplasma bacteroidal (Halbleib & Ludden, 2000; Burris, 2001; Brewin, 2002).

### **1.2.3. Los rizobios y sus hospedadores.**

Como ya se ha adelantado en el epígrafe anterior, los rizobios son bacterias que se encuentran normalmente dentro de cualquier población microbiana que constituya una rizosfera, y se caracterizan por su exclusiva habilidad de formar unas estructuras fijadoras de nitrógeno (nódulos) en determinados hospedadores. Actualmente hay reconocidas unas 57 especies de rizobio, si bien el número aumenta constantemente conforme se van caracterizando nuevos aislamientos. Estas 57 especies se agrupan en 12 géneros, concretamente *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Capriavidus*, *Devosia*, *Ensifer* (sinónimo homotipo de *Sinorhizobium*), *Herbaspirillum*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* y *Rhizobium* (Weir, 2006). Antaño, todos los rizobios se agrupaban en una única familia, la

*Rhizobiaceae* (Jordan, 1984), sin embargo, en la actualidad el número ha aumentado hasta 6: *Bradyrhizobiaceae*, *Burkholderiaceae*, *Hyphomicrobiaceae*, *Methylobacteriaceae*, *Phyllobacteriaceae* y *Rhizobiaceae*, las cuales se encuadran, a su vez, en dos órdenes, *Burkholderiales* y *Rhizobiales*, pertenecientes a las subdivisiones  $\alpha$  y  $\beta$  de las proteobacterias, respectivamente (Sawada *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2005).

Con la única excepción del género *Parasponia* (familia *Ulmaceae*, Werner, 1992), todas las plantas hospedadoras de los rizobios son leguminosas (familia *Fabaceae*), de las cuales se estima que la mayoría (unas 18.000 especies) establecen simbiosis con los rizobios (Sprent, 2001). Dicha familia engloba aproximadamente unos 700 géneros, distribuidos en las 40 tribus que conforman la familia (Broughton *et al.*, 2003).

Las leguminosas son mucho más ricas en proteínas que cualquier otra familia de plantas gracias a las copiosas cantidades de nitrógeno que proceden de la relación simbiótica que establecen con los rizobios, aportando de esta manera proteínas esenciales para la alimentación humana. Además, presentan un elevado porcentaje de carbohidratos solubles (50-70%), fibra (8%), hierro y calcio, y un bajo contenido en grasas (1-2%), por lo que se las ha considerado siempre como un eficaz instrumento en la nutrición humana y en la mejora de la salud del suelo (Graham & Vance, 2000; Gray & Smith, 2005). Además del uso tradicional de las leguminosas grano en la alimentación humana y animal, hoy en día existen otras aplicaciones en diversas ramas de la industria para estos cultivos. Su potencial terapéutico como sustitutivo hormonal esta en pleno auge (Dixon & Summer, 2003), si bien también se emplean con fines industriales mucho más diversos como la fabricación de plásticos o harinas (Morris, 1997) o como biocombustibles (Mushrush *et al.*, 2006).

De entre todas las leguminosas, dos especies abarcan los primeros puestos en producción de legumbres en distintos países del mundo: la judía (*Phaseolus vulgaris* L.) y la soja (*Glycine max* L.) (Bai *et al.*, 2003; Broughton *et al.*, 2003).

La judía es la leguminosa más extensamente cultivada a lo largo del planeta (Martínez-Romero, 2003), en países como Brasil, China, India, Ecuador, México y U.S.A., donde la producción anual del 2003 varió desde 1,65 tonelada/Ha en U.S.A., a 0,7 tonelada/Ha en Brasil y 0,56 tonelada/Ha en México (<http://apps.fao.org>), país en el que representa la principal fuente proteica para la población (SAGARPA, 2003). Dado que la carencia de nitrógeno suele darse en suelos desnudos y sin abonar, las leguminosas noduladas ofrecen una ventaja selectiva en tales condiciones, ya que pueden crecer bien en zonas donde no lo harían otras plantas. Es por ello que

leguminosas arbustivas y arbóreas se emplean como plantas pioneras en la reforestación de zonas áridas y semiáridas (Zahran, 2001; Boumouch *et al.*, 2005), por lo que la mejora de su capacidad fijadora de nitrógeno es un imperioso objetivo que alcanzar. Se conoce que la capacidad de fijar nitrógeno es variable entre los distintos genotipos de judía, oscilando entre el 4 y 59% del nitrógeno atmosférico (Hardarson *et al.*, 1993; Peña-Cabriales *et al.*, 1993), de manera que las estrategias de alimentación que tienen por objetivo incrementar la fijación de nitrógeno y la productividad de la judía están basados en esta variabilidad. Sin embargo, la productividad alcanzada por cultivos de judía inoculados con especies seleccionadas de rizobios es desafortunadamente baja en la mayoría de los ensayos, debido frecuentemente a la alta competitividad frente a los rizobios nativos. En este sentido, numerosas técnicas agrícolas están intentando desarrollar mejoras del rendimiento de los cultivos de judía.

Por otro lado, *G. max* (soja) está reconocida como la leguminosa de mayor contenido proteico, además de tener otras muchas propiedades diferentes como anticancerígena, suplemento dietético y sustitutivo hormonal (Messina *et al.*, 2006; Escudero & González-Sánchez, 2006; Carroll, 2006). Efectivamente, la soja contiene un elevado porcentaje de proteínas (casi 37%) de alta calidad, con casi todos los aminoácidos esenciales menos uno, la metionina. A igual peso, la soja contiene el doble de proteínas que la carne, cuatro veces las proteínas de los huevos y doce veces las proteínas de la leche. También posee un 18% de grasas no saturadas, vitaminas A, E, F y grupo B (tiamina, riboflavina y niacina) y minerales como fósforo, calcio, magnesio, hierro y cobre. Es también una de las fuentes más ricas en lecitina, imprescindible para las células vivas, ya que emulsiona el colesterol y ayuda la asimilación de las vitaminas, e isoflavonas, lo cual le confiere la calidad de sustitutivo hormonal. En 2004, la soja constituyó aproximadamente el 58% de la producción de aceite mundial, encabezada por U.S.A. con un 40% y seguida de Brasil y Argentina con un 24 y 18% respectivamente (SoyStats American Soybean Association, <http://www.soystats.com/2005>). En los países de Europa occidental su producción y consumo van en aumento igualmente, sin embargo, no es equiparable al de los países orientales, donde constituyen una pieza clave en la alimentación humana desde hace más de tres mil años.

#### **1.2.4. Compuestos inductores de los genes *nod*: los flavonoides.**

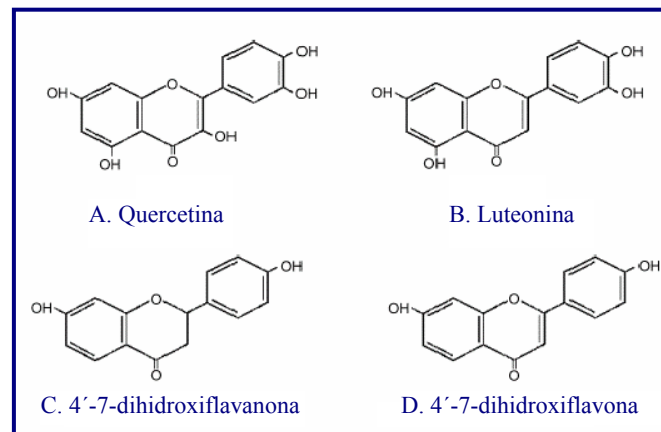
Las leguminosas detectan señales bacterianas conocidas como factores Nod, que son sintetizados en respuesta a moléculas inductoras presentes en los exudados de la planta. Los más potentes de estos inductores pertenecen al grupo de los flavonoides (Schlaman *et al.*, 1998). Sin embargo, existen otras moléculas como las betaínas (p. ej. trigonelina y estaquidrina), algunos fenoles simples (p. ej. vanillina y alcohol coniferil) (Bassam *et al.*, 1988; Gagnon & Ibrahim, 1998; Kape *et al.*, 1991) y los ácidos aldónicos (p. ej. ácido eritrónico y tetrónico) (Brencic & Winans, 2005) que también pueden actuar como inductores en determinadas especies de rizobios a concentraciones más elevadas que las empleadas por los flavonoides (Gagnon & Ibrahim, 1998).

Los flavonoides están considerados como un grupo químicamente muy diverso y biológicamente muy versátil, que se subdivide en varios grupos incluyendo antocianidinas, flavonoles, flavonas, flavanoles, flavanonas, chalconas, dihidrochalconas, dihidroflavonoles, isoflavonoides y pterocarpenos. Se consideran moléculas del metabolismo secundario de la planta, y provienen de la condensación de 4-cumaril-CoA, derivado de la fenilalanina, y tres moléculas de malonil-CoA, por la acción de la enzima chalcona sintetasa (CHS). Dentro del amplio número de las fitoalexinas fenólicas, los isoflavonoides, fenilpropanoides y fenoles simples son los grupos mayormente caracterizados (Harborne, 1994), mientras que flavonoides como aquellos que actúan de mediadores de respuesta defensiva son poco conocidos, exceptuando la catequinas y las proantocianidinas (Feucht & Treutter, 1999).

Los flavonoides poseen un amplio rango de actividades biológicas. Muchos de ellos son principios activos de plantas medicinales y sus efectos farmacológicos están científicamente probados (Yilmaz & Toledo, 2004), fenómeno que ha provocado el aumento de estudios sobre ellos en los diez últimos años (Parr & Bolwell, 2000). También son beneficiosos para la propia planta como compuestos fisiológicamente activos, agentes protectores frente al estrés, quimiotácticos, y en general, por su papel altamente significativo en los fenómenos de resistencia de la planta. Pueden incluso actuar como atrayentes de microorganismos patogénicos como *Agrobacterium tumefaciens* o *Pseudomonas syringae*, e incluso actuar como inductor de sus genes de virulencia (Mo *et al.*, 1995).

Sin embargo, ha sido su función como moléculas de comunicación entre la planta y su entorno la que ha cosechado mayor interés a nivel agrícola, especialmente en el proceso simbiótico rizobio-leguminosa, donde son responsables de la inducción de los genes de nodulación. En este caso, los flavonoides interaccionan con la proteína NodD,

principal encargada de regular la transcripción de los genes *nod*, para dar lugar a la posterior síntesis y excreción de los factores Nod (Hungria & Stacey, 1997; Broughton *et al.*, 2003; Mathesius, 2003; Kobayashi *et al.*, 2004; Cooper, 2004). La figura 1.4. muestra la estructura química de varios compuestos inductores de los genes de nodulación, además de incluir otros de funciones diversas.



**Figura 1.4.** Flavonoides que promueven la germinación de endosporas de micorrizas arbusculares (AM) (A, C y D), inducen los genes *nod* (B, C y D) o estimulan el crecimiento de los rizobios (A) (Dakora, 2003).

Existe cierta correlación entre el espectro de flavonoides capaces de interactuar con una proteína NodD, y la amplitud del rango de hospedador de la planta. No obstante, dependiendo de la cepa rizobiana considerada, un mismo compuesto puede actuar como inductor, inhibidor o ser inefectivo en la activación de los genes de nodulación. Por ejemplo, los isoflavonoides son inductores de la expresión de los genes *nod* en cepas que nodulan soja (*Bradyrhizobium japonicum* y *Ensifer fredii*), pero antagonistas de estos genes cuando nos referimos a estirpes como *Ensifer meliloti* y *Rhizobium leguminosarum* (Vance, 2002). Igualmente, también se han descritos moléculas que presentan gran similitud estructural a la de los inductores, pero que carecen de efecto inductor, pudiendo inhibir competitivamente a los primeros, o, por el contrario, ejercer un efecto sinérgico sobre los mismos (Treutter, 2006).

La planta sintetiza los flavonoides empleando la benzopirona como precursor de los mismos, para, posteriormente, almacenarlos como compuestos insolubles en vacuolas en forma de heterósidos, unidos a uno o más azúcares. Mayoritariamente, el heterósido es hidrolizado antes de ser excretado por la planta, si bien la forma conjugada también se encuentra en la rizosfera (Hartwig & Phillips, 1991).

Generalmente ambas formas tienen actividad inductora de los genes *nod*, aunque existen excepciones como es el caso de la luteolina, que es excretada como heterósido inactivo e hidrolizada posteriormente convirtiéndose en la forma activa (Phillips, 2000).

En cuanto a la concentración requerida de las moléculas inductoras para ejercer su acción, ésta depende de la capacidad inductora de los mismos, condicionada en gran medida por la naturaleza química del compuesto. Los flavonoides son sustancias lipofílicas, poco solubles en agua y, por ello, activos a muy bajas concentraciones, mientras que las betaínas y los ácidos aldónicos son compuestos hidrofílicos, por lo que quedarán inmovilizados por las partículas del suelo, no estando accesibles para ejercer su acción (Phillips, 2000). Por regla general, se considera a un inductor potente cuando es activo a concentraciones inferiores a  $10^{-6}$  M (van Rhijn & Vanderleyden, 1995). No obstante, este parámetro puede variar en función del resto de los compuestos presentes en ese exudado, ya que los exudados de las leguminosas contienen una mezcla de inductores débiles y fuertes, inhibidores y compuestos inefectivos (Schultze *et al.*, 1994), siendo todos ellos responsables del efecto final del mismo.

Ya en el apartado 1.1. indicábamos que existen varios factores que modifican la naturaleza y cantidad de los compuestos exudados, como por ejemplo las condiciones medioambientales, nutricionales y de desarrollo de las plantas (Phillips, 1992). En este sentido, se ha demostrado que la limitación de nitrógeno produce en *Medicago sativa* un incremento en la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de flavonoides (Schultze *et al.*, 1994). Ciertamente, se ha postulado que durante la evolución los rizobios podrían haber empezado a utilizar este incremento en la producción de flavonoides como una señal para interactuar con la planta sometida a limitación de nitrógeno (Coronado *et al.*, 1995).

Igualmente, la pauta de exudación de la planta cambia con la adición de bacterias. Recourt *et al.* (1992) informaron que la inoculación de raíces de *Viciae sativa* subsp. *nigra* con *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* originaba un incremento de los niveles de ARNm de la enzima CHS, fenómeno que no se observaba cuando se inoculaba con un mutante de la misma cepa deficiente en la nodulación. Por otro lado, autores como van Brussel *et al.* (1990) y Phillips *et al.* (1994) describieron que la presencia en las raíces de los rizobios *R. leguminosarum* bv. *viciae* y *Mesorhizobium loti*, respectivamente, ocasionaba un aumento en los niveles de la actividad inductora de los exudados de sus plantas hospedadoras (efecto Ini, del inglés “increased *nod*-gene-inducing activity”). Se ha especulado ampliamente sobre la similitud del efecto Ini y la



respuesta que la planta desarrolla frente al ataque de un patógeno, donde los niveles de fitoalexinas incrementan. El motivo es la existencia de precursores comunes de los compuestos inductores de los genes *nod* y las fitoalexinas, lo cual hace presuponer que el proceso simbiótico rizobio-planta haya podido evolucionar a partir de una relación patogénica. Estudios como los realizados por Schmidt *et al.* (1992) y Phillips *et al.* (1994), quienes demostraron la producción de fitoalexinas tras la inoculación con *E. meliloti* o *B. japonicum*, apoyan esta teoría.

Existen otras interacciones entre plantas no leguminosas y ciertos microorganismos rizosféricos donde los flavonoides también constituyen señales importantes en el proceso de comunicación. Este es el caso de la simbiosis planta-micorriza arbuscular (AM, del inglés “arbuscular mycorrhizal”), donde parece existir cierta comunicación vía flavonoides, puesto que en determinadas ocasiones se ha observado un incremento en la biosíntesis de los mismos por parte de la AM en respuesta a un estímulo de la planta. Desafortunadamente, el papel que los flavonoides juegan en esta interacción no está aún esclarecido del todo (Ponce *et al.*, 2004).

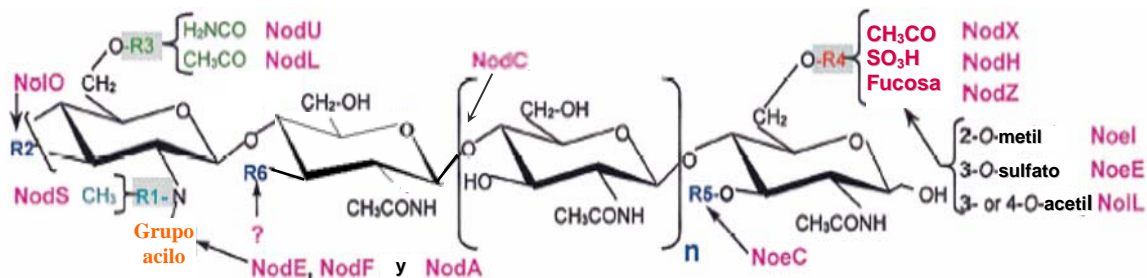
### **1.2.5. Los factores de nodulación.**

La interacción rizobio-leguminosa está caracterizada por el intercambio de señales químicas entre ambas partes (Day *et al.*, 2000) que constituye la base química del complejo diálogo molecular establecido entre los reinos procariota y eucariota. Mientras que a nivel de la planta los flavonoides determinaban el rango de simbiontes compatibles, los principales determinantes de la especificidad bacteriana son los factores Nod, señales que seguidamente iniciarán el programa de nodulación en dicho hospedador (Mergaert *et al.*, 1997b). Todos los factores de nodulación caracterizados hasta la fecha tienen una estructura básica común consistente en un oligómero de 2 a 6 unidades de NAcGlu unidas por un enlace  $\beta$ -1,4, que lleva unido un ácido graso al nitrógeno del extremo no reductor (Spaink, 2000). Debido a la semejanza estructural de este oligosacárido con la quitina, polímero  $\beta$ -1,4 de glucosamina típico de hongos y del exoesqueleto de insectos, a los factores Nod también se les llama LCOs (del inglés “lipo-chitin oligosaccharides”).

Esta estructura básica suele ir modificada por distintos radicales de naturaleza variada. Los grupos que más comúnmente se encuentran modificando el esqueleto

oligosacárido son *N*-metil, *O*-acetil, y *O*-carbamoil en el extremo no reductor, y fucosil, 2-*O*-Me-fucosil, 4-*O*-Ac-fucosil, acetil y sulfato en el extremo reductor (Broughton *et al.*, 2000; Perret *et al.*, 2000). Estas variaciones en la naturaleza del radical incorporado junto con el tipo de ácido graso presente en el extremo no reductor, y la longitud del esqueleto oligosacárido, son los determinantes mayores de la especificidad de hospedador (Daeze & Holsters, 2002). Un ejemplo bien estudiado de una modificación que determina el rango de hospedador es el grupo sulfato de los factores de nodulación de *E. meliloti*, puesto que cepas mutantes de *E. meliloti* que sintetizan factores Nod sin el grupo sulfato ya no son capaces de nodular en alfalfa (Schultze *et al.*, 1992), del mismo modo que la eliminación del grupo fucosil en *E. fredii* disminuye el rango de hospedador de dicha cepa (Lamrabort *et al.*, 1999).

La figura 1.5. muestra la estructura básica de estos factores Nod, así como los radicales más comunes que pueden llevar incorporados. No obstante, existen ciertos factores Nod que difieren de la estructura comentada porque presentan otros tipos de esqueletos moleculares y/o sustituyentes diferentes de los comentados (Bec-Ferté *et al.*, 1996; Folch-Mallol *et al.*, 1996; Soria-Díaz *et al.*, 2003).



**Figura 1.5.** Estructura básica de los factores Nod y sus radicales más comunes. Las siglas R1, 2, 3, 4, 5 y 6 indican las posiciones de unión de los radicales. Las enzimas que sintetizan o acoplan cada uno de estos sustituyentes están indicadas en color rosa y a la derecha de cada radical en cuestión (Perret *et al.*, 2000).

La figura 1.5. nos muestra igualmente las proteínas encargadas de la síntesis de cada substituyente, codificadas todas ellas por los genes comúnmente conocidos como genes *nod*, y que incluyen los genes *nod*, *nol*, y *noe*. Algunas de estas proteínas han sido objeto de minuciosos y complejos estudios que han permitido dilucidar su función y posición dentro de la ruta de biosíntesis de los factores Nod (Spaink, 1996; Downie, 1998). Las proteínas NodA, NodB y NodC juegan un papel central en la síntesis del esqueleto de glucosamina, por su función como chitín oligosacárido sintetasa, chitín oligosacárido desacetilasa, y acil transferasa, respectivamente (Röhrig *et al.*, 1994; John

*et al.*, 1993; Geremia *et al.*, 1994). Los genes que las codifican, *nodABC*, se definieron en un principio como comunes a todos los rizobios, puesto que se pensó que se podían intercambiar entre especies sin que se alterase las propiedades simbióticas de la bacteria (Dénarié *et al.*, 1996). Sin embargo, estudios alternativos contradicen esta teoría puesto que han demostrado que NodA varía en su especificidad por diferentes ácidos grasos (Debellé *et al.*, 1996), mientras que NodC determina la longitud del esqueleto (Kamst *et al.*, 1995).

Por otro lado podemos describir las enzimas que vienen codificadas por los denominados “genes de nodulación específicos de hospedador” o “hsn”, del inglés “**h**ost-**s**pecific *nod* genes”, y que son las responsables de la síntesis de los distintos radicales que “decoran” el esqueleto glucosamínico, por lo que serán necesarios para la nodulación en cada planta en concreto (Kondorosi *et al.*, 1984; Sanjuán *et al.*, 1992; Cárdenas *et al.*, 2003). Por ejemplo, los genes *nodHPQ* de *Rhizobium tropici* codifican enzimas encargadas de la sulfatación de los factores Nod (Folch-Mallol *et al.*, 1996), mientras que las enzimas codificadas por *nodZ* sintetizan y/o incorporan grupos fucosil al esqueleto glucosamínico de los factores Nod de *E. fredii* HH103 (Lamrabet *et al.*, 1999). El trabajo publicado por Perret *et al.* (2000) recopila una detallada información acerca de los distintos genes *nod* específicos de hospedador. Se ha observado que, en la mayoría de los rizobios, los genes implicados en la nodulación se localizan en un plásmido de gran tamaño que recibe el nombre de plásmido simbiótico (pSym). Sin embargo existen excepciones, como las bacterias del género *Bradyrhizobium* y en *M. loti*, entre otros, en las que estos genes se encuentran en el cromosoma (Hungria, 1994; Stacey, 1995).

Anteriormente se indicó que el proceso de síntesis de los factores Nod era específico de la estructura de los flavonoides liberados por la planta. La especificidad de este proceso está mediada por la proteína NodD, la cual es un regulador transcripcional positivo que pertenece a la familia LysR y que se encuentra en todos los géneros rizobianos (Spaink *et al.*, 1987; Schlaman *et al.*, 2006). Se han descrito múltiples copias de los genes *nodD* en numerosas especies rizobianas (Sousa *et al.*, 1993), las cuales han desarrollado respuestas específicas frente a diferentes grupos de flavonoides. Por este motivo, se especula que esta divergencia de los genes *nodD* puede constituir un proceso evolutivo por parte de la bacteria para adaptar la estructura de sus factores Nod e interaccionar con múltiples hospedadores que secreten flavonoides distintos (Demont *et al.*, 1994). La regulación transcripcional de NodD en ciertas especies de rizobios es

bastante complicada debido a la actuación conjunta de uno o más miembros de la familia LysR, denominados genes *symM*, los cuales corregulan la síntesis de los factores Nod aparentemente de forma independiente de los flavonoides (Barnett *et al.*, 1998). Resulta interesante que estos genes también formen parte del proceso de síntesis de polisacáridos extracelulares, quienes, al igual que los factores Nod, también están considerados como moléculas cruciales en el establecimiento de la simbiosis rizobio-planta (Etzler *et al.*, 1999).

Adicionalmente, existen otras proteínas codificadas por los genes *nod* implicadas en el proceso de regulación de síntesis de los factores de nodulación. Así, en *B. japonicum*, las proteínas NodV y NodW, pertenecientes al grupo de proteínas reguladoras de dos componentes, reconocen el isoflavonoide genisteína (Loh *et al.*, 1997). La síntesis de factores Nod en *B. japonicum* también está regulada por el gen *nolA* (Loh *et al.*, 1999), el cual codifica para tres proteínas funcionalmente distintas, y que probablemente medien en la especificidad hacia determinados genotipos de soja vía regulación del gen *nodD2* (García *et al.*, 1996).

Además de los reguladores positivos, también existen los conocidos como reguladores negativos. En los géneros *Ensifer* y *Rhizobium* se ha identificado el gen represor *nolR*, el cual se une a secuencias “diana” situadas en los promotores de los genes implicados en la síntesis de los factores Nod, impidiendo la transcripción de los mismos (Kiss *et al.*, 1998). Igualmente, se han descrito fenómenos de regulación de la producción de factores Nod a nivel postranscripcional, como es el caso del gen *nodX*, encargado de acetilar el esqueleto glucosamínico en la posición R4 (figura 1.5.) y cuya actividad es dependiente de la temperatura de crecimiento de la bacteria (Olsthoorn *et al.*, 2000). Poco se conoce acerca de la regulación del proceso de síntesis de los factores de nodulación en el suelo o en la planta tras los pasos iniciales del proceso de infección. Aunque se ha demostrado que los genes *nod* esenciales en la síntesis de los factores Nod son reprimidos en las etapas tardías de la simbiosis, no existe información esclarecedora acerca de los mecanismos implicados en este proceso de regulación negativa (Schlaman *et al.*, 1991).

Los factores Nod en la simbiosis rizobio-planta son imprescindibles en la organogénesis de los nódulos, así como en muchas respuestas relacionadas con el proceso de infección en la planta (D’Haeze *et al.*, 1998). El mecanismo de reconocimiento de los factores de nodulación contiene aún muchas lagunas, aunque existen numerosos trabajos que comienzan a elucidar el funcionamiento del mismo. En

este sentido, se está aceptando ampliamente la teoría de la existencia de dos receptores de factores Nod, uno altamente específico que media la entrada de la bacteria en el pelo radical, y otro menos restrictivo que inicia los procesos siguientes de infección y desarrollo nodular (Ardourel *et al.*, 1994; Riely *et al.*, 2004; Geurts *et al.*, 2005). Todas estas respuestas mediadas por los factores Nod en su hospedador, junto con la peculiaridad de cada proceso, serán desarrolladas ampliamente en el epígrafe próximo de esta Introducción.

### **1.2.6. Actividad biológica de los factores Nod.**

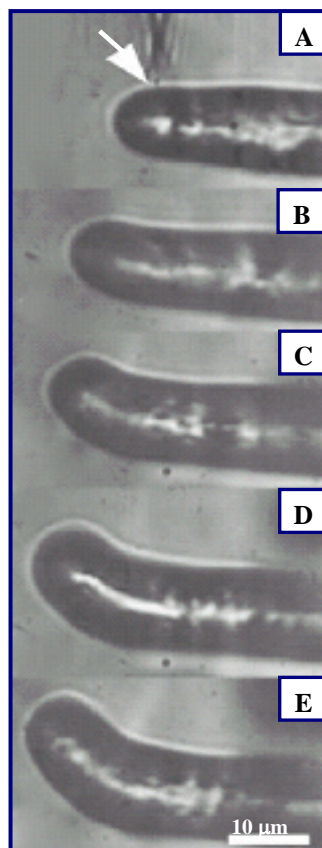
A la unión de la bacteria a la superficie del pelo radical le sigue la deformación y curvatura de éste, de manera que los rizobios quedan englobados en una especie de bolsillo. Esta deformación es consecuencia de la producción de factores Nod compatibles por parte de la bacteria, y como respuesta a la señal química excretada por la planta (de Ruijter *et al.*, 1998; Sieberer *et al.*, 2002).

Para que estas deformaciones sucedan, previamente se han tenido que desarrollar cambios notables en la fisiología de los pelos radicales, tales como las continuas y variadas alteraciones en el flujo iónico. Aproximadamente al minuto del contacto de los factores Nod con la raíz, se produce una entrada de iones  $\text{Ca}^{2+}$  acompañada de una salida de iones  $\text{Cl}^-$ , que será contrarrestada al mismo tiempo con una rápida salida de iones  $\text{K}^+$  (Felle *et al.*, 1998, 1999). Seguidamente, se produce una alcalinización intra- y extracelular, cuya duración en el tiempo nos indicará la vía funcional adoptada por la planta frente a este fenómeno: si es duradera, se generará una respuesta defensiva de la planta frente a un posible patógeno, mientras que si es transitoria se iniciará el proceso simbiótico rizobio-leguminosa. Estos cambios originarán, en su conjunto, una despolarización de la membrana (Ehrhardt *et al.*, 1992).

Pasados 10 minutos del contacto de los factores Nod, a concentraciones hasta  $\mu\text{M}$  o  $\text{fM}$ , es cuando se empiezan a observar la producción de pulsos de calcio en la punta del pelo radical y proximidades del núcleo (Wais *et al.*, 2000). Estas oscilaciones de calcio, conocidas como “calcio spiking”, disparan una cascada de señalización mediada por proteínas G monoméricas y heterotriméricas, implicadas en numerosas respuestas en la planta como por ejemplo la organización del citoesqueleto de actinas (Cárdenas *et al.*, 1998), control del tráfico de vesículas y proteínas entre los orgánulos y la membrana plasmática, y regulación del crecimiento celular. A diferencia de los procesos anteriores

de fluctuación iónica y despolarización de la membrana, donde la adición del esqueleto de quitina induce efectos similares a los provocados por los factores Nod (Felle *et al.*, 2000), la fluctuación en las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de las células epidérmicas es muy específica desde el punto de vista estructural.

El trabajo publicado por Oldroyd y Downie (2004) recoge una información detallada de estos primeros pasos inducidos por los factores Nod. El conjunto de estas modificaciones originará alteraciones en la estructura de los pelos radicales, cambios que actualmente están considerados como la actividad biológica mejor caracterizada tras la aplicación de factores Nod purificados. Existen diversos fenómenos de deformación de los pelos radicales, como son los fenotipos “Hab” (del inglés “**r**oot **h**air **b**ranching”, Fähræus, 1957), “Hac” (del inglés “**r**oot **h**air **c**urling”) y formación del cayado de pastor (Reliç *et al.*, 1993), respuestas que ocurren en presencia de concentraciones extremadamente bajas, que oscilan entre  $10^{-9}$ - $10^{-15}$  M (Dénarié *et al.*, 1992). La figura 1.6. nos muestra la secuencia de deformación de un pelo radical tras aplicársele factores Nod purificados.



**Figura 1.6.** Instantáneas del proceso de curvatura del pelo radical de *Medicago truncatula* tras 0 (panel A), 15 (panel B), 30 (panel C), 45 (panel D) y 60 segundos (panel E) desde la aplicación de factores Nod purificados en el sitio indicado con una flecha (Esseling & Emons, 2004).

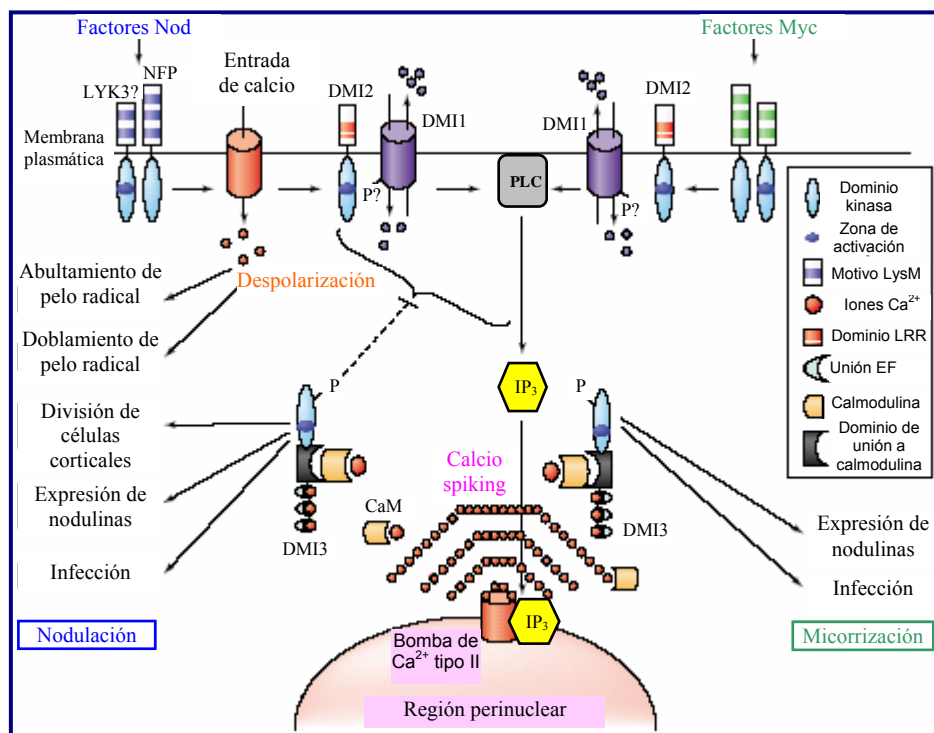
Numerosos ensayos basados en el principio de la deformación de los pelos radicales han sido empleados en la evaluación de la especificidad de los factores Nod frente a un determinado hospedador (Ardourel *et al.*, 1994; Catoira *et al.*, 2000), en estudios del crecimiento de la punta radical (Miller *et al.*, 1999, 2000; Sieberer & Emons, 2000) y la inducción de la polaridad de las células de la raíz (van Brussel *et al.*, 1992), por lo que están considerados como el principio inductor de la deformación de los pelos radicales dependiente de la bacteria (Emons & Mulder, 2000).

Una de las últimas respuestas que la planta desarrolla frente a la presencia de factores Nod es la expresión de genes específicos del proceso simbiótico, denominados nodulinas tempranas (ENODs, del inglés “early-**n**odulin genes”, Pichon *et al.*, 1992; Compaan *et al.*, 2001). La duración de su expresión oscila aproximadamente entre 1 y varias horas tras la aplicación de los factores Nod, dependiendo de la nodulina en cuestión. El gen *enod2* es uno de los más ampliamente estudiado, junto con el *enod40* (Sousa *et al.*, 2001), aislado de una librería de ADNc de nódulos de guisante (Scheres *et al.*, 1990), y cuya fusión con genes reporteros como la glucuronidasa ha proporcionado datos muy valiosos en el estudio de respuestas en la planta dependientes de los factores Nod (Journet *et al.*, 2001).

El factor Nod induce igualmente la transcripción de anexina (fosfolípido ácido) en la periferia del núcleo de las células corticales. Por lo tanto, se trata del primer marcador de preinfección en las células corticales. Efectivamente, se ha observado que tras el tratamiento de raíces de *Vicia* con el factor Nod de *R. leguminosarum* bv. *viciae* se induce la formación del cordón de preinfección en esta planta (van Brussel *et al.*, 1992). También se ha demostrado la inducción de las nodulinas que codifican para el cordón de infección en presencia del factor Nod purificado de la bacteria huésped (Journet *et al.*, 1994), los cuales incluso llegan a inducir a concentraciones relativamente altas la división celular en plantas como alfalfa y judía, desarrollando nódulos anatómicamente e histológicamente semejantes a los que se forman en presencia de la bacteria productora (Truchet *et al.*, 1991; López-Lara *et al.*, 1995). Sin embargo, se sigue considerando imprescindible la presencia de la bacteria para la formación de un cordón de infección de estructura normal (Limpens *et al.*, 2003).

El gran reto científico en estos momentos radica en la identificación de los receptores de los factores Nod en la planta y la caracterización de la cascada de señalización a través de la cual actúan. Una de las líneas de trabajo que está arrojando mayor cantidad de información al respecto se basa en el empleo de mutantes de

determinados genes de la planta que inhiben en proceso de nodulación en distintos pasos. De este modo, se han descrito varios receptores de naturaleza kinasa, pertenecientes a la familia proteica LysM, con un dominio extracelular que probablemente represente la zona de unión del factor Nod (figura 1.7.). Entre ellos encontramos varios ejemplos como los genes *nfr1* y *nfr5*, receptores kinasas de *M. truncatula* y *Lotus japonicum*, respectivamente (Madsen *et al.*, 2003; Radutoiu *et al.*, 2003), quienes participan en despolarización de la membrana, deformación del pelo radical e inducción de nodulinas tempranas; los genes *lyk3* y *lyk4* de *M. truncatula*, ortólogos de *sym2* de *Pisum sativa* (Limpens *et al.*, 2003), los cuales participan en la reducción de la nodulación y alteran el establecimiento del cordón de infección, y los genes *dmi1*, *dmi2* y *dmi3* de *M. truncatula* (Ané *et al.*, 2004), donde *dmi3* ha demostrado ser una kinasa dependiente de calcio y calmodulina, que fosforila efectores de forma semejante a las cascadas de señalización de mamíferos (Mitra *et al.*, 2004), y cuya desregulación desemboca en una nodulación espontánea independiente del rizobio (Gleason *et al.*, 2006; Tirichine *et al.*, 2006). Asimismo, se ha demostrado que es punto de encuentro entre las vías de señalización de rizobios y AM, observación que apoya la hipótesis sobre la existencia de vías comunes de señalización para ambos tipos de simbioses.



**Figura 1.7.** Modelo de señalización por factores Nod y factores Myc propuesto por Riely *et al.* (2004). IP3, fosfoinositol trifosfato; PLC, fosfolipasa C; CaM, calmodulina; P, fosforilación y LYK3, NFR, DMI1-2-3, receptores de membrana.



## 1.3. Interacciones PGPR-planta.

### 1.3.1. Concepto de PGPR.

Si bien la simbiosis rizobio-leguminosa es una de las interacciones que más atención ha recibido de toda la rizosfera, existen otras muchas que gozan igualmente de gran importancia a distintos niveles (agrícola, ecológico, económico), como lo son las interacciones PGPR-planta.

Se consideran bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, del inglés “**plant-growth promoting rizobacteria**”) aquellas bacterias que se desarrollan en el ecosistema rizosférico y que estimulan el crecimiento de las plantas, término que fue introducido por Kloepper y Schroth en 1978. Actualmente se considera demostrado que la planta selecciona en su propio beneficio las bacterias más próximas a la superficie de las raíces a través de la exudación radical (Lucas-García *et al.*, 2001), resultado de una coadaptación evolutiva (Wiehe & Höflich, 1995a). Puesto que las bacterias rizosféricas seleccionadas juegan un papel crucial en el mantenimiento de la salud y el normal funcionamiento de la planta, se están desarrollando métodos biotecnológicos consistentes en el empleo de bacterias aisladas de la rizosfera para conseguir reducir el empleo de productos químicos y mantener o mejorar la productividad de un determinado cultivo (Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004).

Hoy en día no existe una clasificación incuestionable establecida para poder englobar a las PGPR dentro de un grupo u otro. Vessey (2003) y Gray y Smith (2005) propusieron una clasificación relativamente lógica en base a dos simples términos: PGPR intracelulares (iPGPR), que agrupa a todas aquellas bacterias que residen dentro de las células de las plantas y que se localizan en estructuras especializadas como son los nódulos, y PGPR extracelulares (ePGPR), que son aquellas bacterias que viven fuera de las células de la planta y no originan estructuras especializadas, pero que igualmente promueven el crecimiento de la planta mediante mecanismos varios. Al mismo tiempo las ePGPR pueden ser divididas en tres tipos según el grado de asociación con las raíces: bacterias que viven en suelo cercano a la raíz pero no establecen contacto con ella y utilizan para crecer productos de la exudación, bacterias capaces de colonizar la superficie de la raíz (rizoplano), y bacterias que residen en los tejidos de la raíz, habitando en los espacios intercelulares de células corticales.

El campo de aplicación de las PGPRs es considerablemente amplio, abarcando diversas metodologías y formas de trabajo en función del objetivo a conseguir. Así, nos encontramos por un lado PGPRs cuyo efecto se manifiesta sobre el crecimiento de la planta tras afectar a la fisiología de la misma, bien mediante mecanismos hormonales o bien por la producción de metabolitos que mejoren la nutrición de la planta. En este campo podemos destacar los trabajos realizados por Kloepper *et al.* (1988), Glick *et al.* (1999), Gutiérrez-Mañero *et al.* (2001) y Vázquez *et al.* (2000).

Conjuntamente, se encuentran aquellas PGPRs dedicadas a ejercer un efecto protector frente a plagas, evitando o previniendo los efectos perjudiciales causados por los organismos patógenos. Sobre este aspecto existen dos mecanismos posibles de acción. En primer lugar podemos describir los conocidos mecanismos de biocontrol, donde la bacteria ejerce su efecto ocupando el mismo nicho que el agente patógeno y desplazándolo, o bien evitando que éste prolifere fácilmente en el terreno ocupado por la planta. Normalmente se trata de un efecto mediado por antibióticos, sideróforos o enzimas que afectan a la integridad del patógeno (Paulitz & Bélanger, 2001).

Como alternativa a los mecanismos de biocontrol encontramos aquellos que inducen una resistencia sistémica en la planta (ISR, del inglés “induced systemic resistance”, van Loon *et al.*, 1998), consistente en la estimulación del metabolismo implicado en procesos de defensa antes de que se produzca contacto con el agente patógeno, de manera que la planta adquiere capacidad de resistencia frente a futuros ataques.

### **1.3.2. Mecanismos de acción de las PGPRs.**

Para poder manipular el sistema rizosférico optimizando los procesos que se producen en el mismo, es fundamental el conocimiento de los mecanismos de acción a través de los cuales las PGPRs actúan.

Estos mecanismos se pueden clasificar en dos grupos: directos e indirectos. En términos generales se consideran mecanismos indirectos aquellos que se basan en procesos que ocurren fuera de la planta, mientras que los mecanismos de acción directos son aquellos que se basan en procesos que ocurren en el interior de la misma. No obstante, la diferenciación entre ambos es, en ocasiones, difícil de establecer. De esta forma, se pueden incluir entre los mecanismos indirectos aquellos que resulten de una

actividad bacteriana que ponga más nutrientes a disposición de la planta, o que inhiba a microorganismos patógenos para la planta, o simplemente que aporte nitrógeno al sistema rizosférico mediante la fijación biológica del mismo. Por otro lado, los mecanismos directos abarcarán aquellos mecanismos que alteren los niveles hormonales de la planta y los que modifican el metabolismo de la planta mejorando su capacidad adaptativa.

### **1.3.2.1. Mecanismos directos.**

a.- PGPRs que modifican los niveles de reguladores de crecimiento (RCs) de la planta.

Actualmente sabemos gracias a las potentes técnicas analíticas disponibles que algunos de los reguladores de crecimiento vegetales (RCs), como las auxinas y el etileno son de producción muy habitual entre los microorganismos edáficos (Dubeikovesky *et al.*, 1993). Otros RC, p. ej. las citoquininas, son producidas mucho menos frecuentemente, y las giberelinas se ha detectado su producción en dos cepas del género *Bacillus* aisladas de la rizosfera de *Alnus glutinosa* en cantidades mil veces superiores a las sintetizadas por algunas cepas de *Rhizobium* en la formación de nódulos (García de Salomone *et al.*, 2001; Gutiérrez-Mañero *et al.*, 1996, 2001). Este mecanismo de acción es importante no sólo por el hecho de actuar a través del principal mecanismo de regulación del crecimiento y diferenciación celular en plantas, sino porque se basa en el desarrollo de rutas metabólicas comunes, lo que implica considerar aspectos coevolutivos de gran interés.

Ahora bien, las bacterias no sólo son capaces de modificar los niveles de RCs de las plantas mediante la producción de los mismos, sino que además existen microorganismos capaces de degradar los precursores de dichos RCs, como por ejemplo el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC), precursor directo del etileno, considerado un RC implicado en respuestas de estrés (Glick, 2004). De este modo, ciertas PGPRs serán altamente eficaces en la mejora de procesos que implican un estrés en la planta, como lo es por ejemplo la nodulación por rizobios en leguminosas (Schmidt *et al.*, 1999).

**b.- PGPRs inductoras de resistencia sistémica en plantas (ISR).**

Determinadas bacterias no patógenas de plantas son capaces de prevenir eficazmente el ataque de microorganismos patógenos mediante la inducción de una respuesta altamente específica en la planta, que hace a ésta resistente al ataque ulterior del patógeno. A este mecanismo de protección se le denomina resistencia sistémica inducida (ISR), para diferenciarlo de la resistencia sistémica adquirida (SAR, del inglés “systemic acquired resistance”; Hammerschmidt, 1999) en la que participa un patógeno que interacciona virulentamente con la planta, sin llegar a producir daños letales, induciendo una resistencia sistémica que previene del ataque posterior de un patógeno. Sin embargo, no se trata de un mecanismo de defensa común a todos los vegetales, ya que existen numerosas plantas que no son capaces de generar esta respuesta.

En el caso de las rizobacterias, la ISR está mediada por vías de señalización en las que participan el etileno y el tandem etileno-ácido jasmónico (Pieterse *et al.*, 2001), acompañadas de un incremento en la actividad de las enzimas fenilalanina-amino-liasas, peroxidasas y oxidoreductasas, englobadas en el conjunto de las denominadas proteínas de resistencia (PRs).

Como resumen, en la tabla I.1. mostramos varios ejemplos de microorganismos utilizados como PGPRs que emplean mecanismos directos para ejercer su función.

**Tabla I.1.** Mecanismos directos empleados por las PGPRs.

<b>Mecanismo</b>	<b>Parámetro modificado</b>	<b>Referencia</b>
Fijación de N <sub>2</sub> asociada a la raíz	Biomasa y contenido en nitrógeno	Döbereiner & De-Polli, 1980
Síntesis de hormonas (auxinas, citoquininas, giberelinas)	Biomasa (parte aérea y radical), ramificación de raíces, floración	Gutiérrez-Mañero <i>et al.</i> , 1996; Probanza <i>et al.</i> , 1996
Inhibición de síntesis de etileno	Longitud radical	Glick <i>et al.</i> , 1994
Solubilización de fósforo	Biomasa y contenido en fósforo	Subba Rao, 1982
Oxidación de azufre	Biomasa y contenido en azufre	Grayston & Germida, 1991
Aumento del tamaño de la raíz	Biomasa y captación de nutrientes	Safronova <i>et al.</i> , 2006
Aumento del número y tamaño de nódulos (leguminosas)	Biomasa y contenido en nitrógeno	Polenko <i>et al.</i> , 1987
Aumento del número y tamaño de nódulos (aliso)	Biomasa y contenido en nitrógeno	Molina <i>et al.</i> , 1994
Incremento de infección por ectomicorizas	Biomasa y contenido en fósforo	Gutiérrez-Mañero <i>et al.</i> , 1996

### 1.3.2.2. Mecanismos indirectos.

#### a.- PGPRs fijadoras de nitrógeno.

Las interacciones entre microorganismos (entre los que destacan las ePGPRs) y plantas que no forman estructuras especializadas en las raíces pero que actúan en la rizosfera aportando nutrientes (entre otros el nitrógeno), juegan un papel importante en el rendimiento de las cosechas tanto de leguminosas como no leguminosas. El nitrógeno asimilado por la bacteria será intercambiado con la planta por carbohidratos, dando lugar a uno de los procesos metabólicos energéticamente más “caros” de la biología (Simpson & Burris, 1984).

Existen gran cantidad de bacterias, incluidas en un amplio rango de taxones, capaces de fijar nitrógeno de forma libre (Raymond *et al.*, 2004). Entre los géneros bacterianos más importantes podemos citar *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia* y *Herbaspirillum*, las cuales podrían ser clasificadas como ePGPRs, mientras que las iPGPRs quedarían exclusivamente circunscritas a los rizobios.

#### b.- PGPRs productoras de sideróforos.

La carencia de hierro provoca fuertes alteraciones metabólicas debido a su importante papel como cofactor de numerosos enzimas. De hecho, su absorción suele ser problemática, ya que en el suelo suelen predominar las formas oxidadas ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que forman fácilmente hidróxidos y óxidos insolubles quedando fuera del alcance de la planta. Algunas bacterias rizosféricas producen moléculas capaces de formar complejos solubles con  $\text{Fe}^{3+}$ , denominados sideróforos, similares a los sintetizados por la propia planta (Castignetti & Smarrelli, 1986). Entre las bacterias productoras de sideróforos más importantes están las pertenecientes al género *Pseudomonas* (Vandenbergh & González, 1984; Buysens *et al.*, 1996).

Las bacterias productoras de sideróforos que habitan en la rizosfera son consideradas en ocasiones como agentes de biocontrol, puesto que no sólo mejoran la nutrición de la planta sino que también dificultan el crecimiento de microorganismos patógenos que carecen de mecanismos adecuados para capturar el hierro acomplejado con los sideróforos, por lo que sufren un desplazamiento de nicho, mermándose su capacidad para producir enfermedades (Daniel *et al.*, 1992).

c.- PGPR solubilizadoras de fosfato.

El fósforo es, después del nitrógeno, el nutriente que más limita el crecimiento de las plantas (Vance *et al.*, 2000). La variedad de microorganismos capaces de movilizar fosfatos es extraordinariamente amplia, abarcando géneros tan dispares como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Micrococcus*, *Aerobacter*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium* y *Erwinia* (Gyaneshwar *et al.*, 2002). Las bacterias solubilizan fosfatos mediante la liberación de ácidos orgánicos que interaccionan iónicamente con los cationes de las sales fosfatadas (Kpombrekou & Tabatabai, 1994), o bien mediante la liberación de fosfatasas, encargadas de liberar grupos fosfato ligados a la materia orgánica.

Finalmente, en la tabla I.2. mostramos varios ejemplos de microorganismos utilizados como PGPRs que emplean mecanismos indirectos para ejercer su función.

**Tabla I.2.** Mecanismos indirectos empleados por las PGPRs.

Mecanismo	Ejemplo	Referencia
Síntesis de sideróforos	<i>Pseudomonas putida</i> vs <i>Fusarium</i>	Scher & Baker, 1982
Síntesis de antibióticos	<i>Pseudomonas fluorescens</i> vs <i>Erwinia carotovora</i>	Cronin <i>et al.</i> , 1997
Producción de ácido cianhídrico	<i>Pseudomonas</i>	Voisard <i>et al.</i> , 1989
Hidrólisis de moléculas producidas por agentes patógenos	<i>Pseudomonas cepacia</i> , <i>Pseudomonas solanacearum</i> vs ácido fusárico	Toyoda & Utsumi, 1991
Síntesis de enzimas hidrolíticas de la pared fúngica	<i>P. cepacia</i> vs <i>Phytium ultimum</i> y <i>Rhizoctonia solani</i>	Fridlernder <i>et al.</i> , 1993
Competencia por nutrientes	<i>Pseudomonas</i> vs <i>P. ultimum</i>	Stephens <i>et al.</i> , 1993
Inducción de resistencia sistémica	<i>Serratia marcescens</i>	Press <i>et al.</i> , 1997

### 1.3.3. Los rizobios como PGPRs.

Los efectos beneficiosos de la inoculación de *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* en leguminosas en términos de fijación biológica del nitrógeno son bien conocidos (Werner, 1992). Sin embargo, trabajos adicionales indican que estas bacterias simbióticas tienen el potencial de ser usadas como PGPRs en plantas no leguminosas gracias a la síntesis de ciertas moléculas que influyen en el desarrollo del vegetal, como

fitohormonas, factores Nod, lumicromo, riboflavina e hidrógeno (Antoun *et al.*, 1998; Dakora, 2003).

Por ejemplo, cuando los factores Nod están presentes en el suelo pueden estimular la germinación de la semilla e incrementar así la productividad del cultivo grano de leguminosas y no leguminosas. También se ha descrito que incrementan la tasa fotosintética cuando son pulverizados como spray sobre las hojas de la planta (Dakora, 2003). Otro ejemplo lo constituye el filtrado estéril de *R. leguminosarum*, el cual protege con altísima eficacia las plantas de lenteja frente a la infección por *Fusarium oxysporum* MR84 (Essalmani & Lahlou, 2003). Por estos motivos, el papel de los rizobios dentro de los sistemas agrícolas es claramente mucho más complejo que la simple participación en la fijación simbiótica del nitrógeno en leguminosas.

Para actuar como PGPRs en plantas no leguminosas, los rizobios deben poder colonizar estas plantas y sobrevivir en ellas. En este sentido, Gaur *et al.* (1980) mostraron en los sistemas de cultivo rotativo de cereales con leguminosas cómo la inoculación del cultivo de maíz precedente (*Zea mays* L.) con *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* incrementaba significativamente el número de nódulos, el peso seco de la planta y la productividad final del posterior cultivo de frijol chino (*Vigna radiata* L.) y cacahuete (*Arachis hypogaea* L.). Otros autores como Wiehe y Höflich (1995b) y McInroy y Kloepper (1995) estudiaron asimismo la multiplicación y la supervivencia de distintos rizobios en la rizosfera y dentro de las raíces de plantas no hospedadoras y no leguminosas.

Numerosos estudios indican que las plantas no leguminosas reaccionan en presencia de los rizobios que existen en la rizosfera deformando sus pelos radicales, bien por acción de la propia bacteria (Plazinski & Rolfe, 1985; Terouchi & Syono, 1990), bien por sus factores Nod (Staehelin *et al.*, 1994a), desarrollando posteriormente estructuras similares a los nódulos (Trinick & Hadobas, 1995). Este es el caso de varios aislamientos de *Bradyrhizobium* sp. que forman nódulos fijadores de nitrógeno en *Parasponia*, planta no leguminosa perteneciente a la familia *Ulmaceae*.

Anteriormente se indicó que las PGPRs pueden afectar directamente al crecimiento de la planta mediante la síntesis de fitohormonas (Lippmann *et al.*, 1995), como es el caso de cepas nodulantes y no nodulantes de *R. leguminosarum* productoras de ácido indol-3-acético (Wang *et al.*, 1982). Noel *et al.* (1996) observaron bajo condiciones gnotóbicas una promoción directa del crecimiento de semillas jóvenes de cánola (*Brassica campestris*) y lechuga (*Lactuca sativa*) por acción de *R.*

*leguminosarum*. Conjuntamente, se han caracterizado numerosos rizobios productores de sideróforos, cualidad que les confiere cierta ventaja de selección sobre los demás microorganismos de la rizosfera (Guerinot, 1991), al mismo tiempo que pueden promover el crecimiento de la planta gracias a la potenciación de la toma de hierro por parte de la misma (Jadhav *et al.*, 1994). A semejanza de otras muchas bacterias PGPR, se conocen algunas especies rizobianas productoras de solubilizadores de fosfato. De hecho, en un estudio de campo Chabot *et al.* (1996) comprobaron que la solubilización del fosfato por cepas de *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* era el mecanismo más importante en la promoción del crecimiento de lechuga y maíz.

Los rizobios pueden incluso ocasionar un efecto sinérgico sobre las micorrizas arbusculares vesiculares (VAM, del inglés “vesicular-arbuscular mycorrhizal”) estimulando el crecimiento de la planta e incrementando la acumulación de fósforo (Valdés *et al.*, 1993) o, por el contrario, pueden inhibir el crecimiento de algunos hongos patógenos para el vegetal, por lo que se les considera en ocasiones como potenciales agentes de biocontrol (Malajczuk *et al.*, 1984; Ehteshamul-Haque & Ghaffar, 1993).

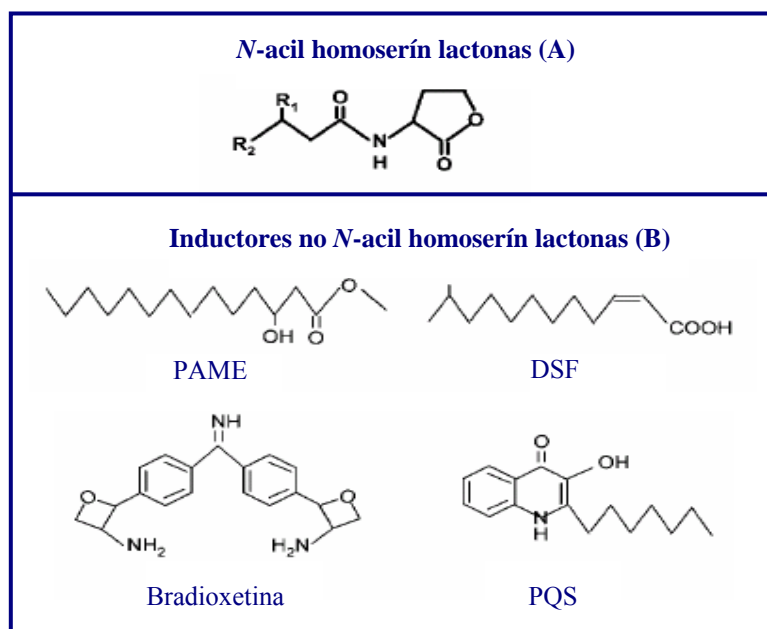
## **1.4. Interacción triple rizobio-PGPR-planta.**

Las interacciones directas que tienen lugar entre los distintos miembros de una comunidad microbiana, y en especial de la rizosfera, derivan a menudo en la promoción de procesos claves que benefician la salud y el crecimiento de la planta (Barea *et al.*, 2005). De este modo, el empleo de simbioses fijadoras de nitrógeno (*Rhizobium* y *Frankia* spp.) o de bacterias fijadoras de nitrógeno en vida libre (*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Bacillus*, *Klebsiella* spp., etc.) en el cultivo de leguminosas, ha contribuido sustancialmente a la economía del N<sub>2</sub> en los sistemas agrícolas (Herridge *et al.*, 2001; Peoples & Baldock, 2001). Sin embargo, la interacción de los rizobios con los otros microorganismos presentes, bien en el suelo, o bien en el propio inoculante empleado, puede concluir en un efecto tanto positivo como negativo para el primero, y, consecuentemente, para la planta inoculada en cuestión (Drozdowicz & Ferreira Santos, 1987; Isopi *et al.*, 1995; Gray & Smith, 2005). No obstante, se han ido desarrollando a lo largo de estos últimos años inoculantes mixtos de rizobios con otros microorganismos cuyos resultados en la planta han sido netamente beneficiosos (Rodelas *et al.*, 1999;



Dashti *et al.*, 2000). Ya en 1979, Singh y Subba Rao informaron sobre los efectos positivos de la inoculación de *Azospirillum brasilense* en el número y peso seco de nódulos, y biomasa de plantas de soja. En este mismo sentido, Burdman *et al.* (1996) demostraron cómo la inoculación de *P. vulgaris* con *A. brasilense* promovía la formación de pelos radicales e incrementaba el número de nódulos tras inocular con *Rhizobium*. A pesar de la gran importancia de este proceso, la interacción triple rizobio-PGPR-planta ha recibido poca atención. Por el contrario, no ha ocurrido así con las interacciones bacterianas dentro de una misma comunidad, donde han aumentado considerablemente los estudios acerca de los diálogos establecidos entre los integrantes de dichas asociaciones.

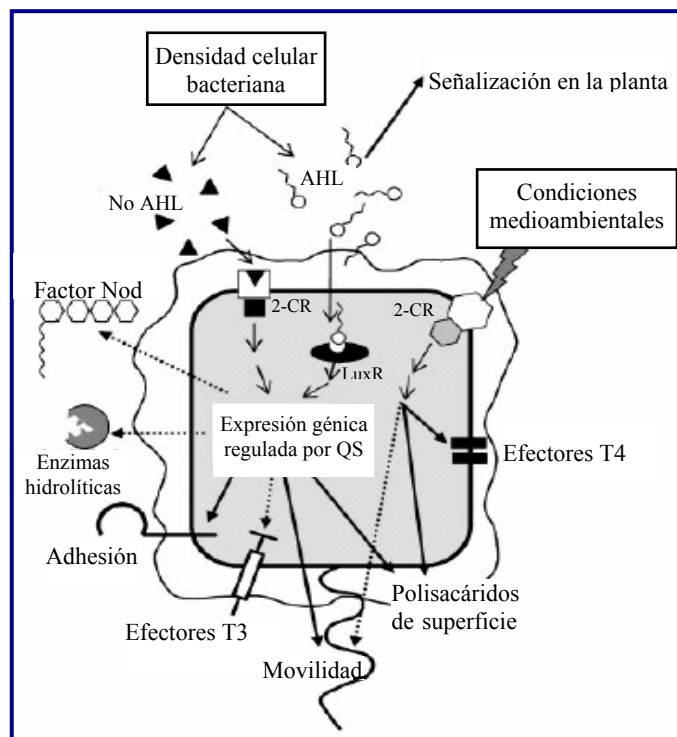
Las poblaciones bacterianas regulan coordinadamente la expresión de sus genes mediante la producción de moléculas señal difusibles, denominadas autoinductores (figura 1.8.), que disparan la expresión de los genes en respuesta a la densidad de población bacteriana circundante (Swift *et al.*, 1996). La síntesis de estas moléculas tiene lugar en determinados estadios del crecimiento bacteriano y en respuesta a cambios medioambientales que desencadenan una respuesta concreta una vez que se ha alcanzado una concentración bacteriana crítica (Thorne & Williams, 1999). A este fenómeno se le conoce como “quorum sensing” (QS).



**Figura 1.8.** Panel A, estructura básica de las AHLs y panel B, moléculas inductoras que actúan por mecanismos de QS, de naturaleza distinta de las AHLs. PAME, 3-ácido hidroxipalmítico metil éster; DSF, factor difusible de señalización (*cis*-11-metil-2-ácido dodecenoico) y PQS, quinolona señal de *Pseudomonas* (2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona).

El mecanismo de QS más estudiado corresponde al de los organismos Gram-negativos y se caracteriza por el empleo de *N*-acil homoserín lactonas como moléculas señal (AHLs, del inglés “**acylated homoserine lactones**”, Fuqua *et al.*, 1998), las cuales activarán receptores específicos que funcionan como reguladores transcripcionales. Existen adicionalmente otras moléculas inductoras que no son AHL, de naturaleza muy variada, y menos frecuentes que las AHL. La figura 1.8. recoge algunos ejemplos de éstas.

La mayoría de los microorganismos son productores de más de un tipo de AHL, al mismo tiempo que microorganismos diferentes pueden producir la misma AHL (Hardman *et al.*, 1998). Esta peculiaridad provoca una superposición en los procesos de síntesis y reconocimiento de AHLs por distintos organismos, especialmente en ambientes donde existe una gran diversidad bacteriana, por ejemplo, en la rizosfera, donde el QS ha demostrado tener un papel crucial como mecanismo coordinador de los rizobios que van a establecer una simbiosis con su hospedador en cuestión (González & Marketon, 2003; Daniels *et al.*, 2002). La figura 1.9. nos propone diversas estrategias empleadas por las bacterias, patógenas o no, para establecer asociaciones compatibles con sus hospedadores.



**Figura 1.9.** Coordinación de la expresión génica durante la colonización del hospedador mediante mecanismos de QS y sistemas reguladores de dos componentes (2-CR). Las vías activadas conjuntamente por rizobios y agentes patógenos están señaladas con flechas continuas. Las activadas, bien por el rizobio, bien por el patógeno, están señaladas con flechas discontinuas (Soto *et al.*, 2006).

Afortunadamente el papel de la planta hospedadora va adquiriendo importancia dentro del proceso de comunicación por QS de los microorganismos que interactúan con ella. En este sentido, se han descrito numerosas sustancias secretadas por la planta, de estructuras no completamente definidas, que mimetizan a las AHLs bacterianas alterando su función o incluso suplantándolas (Teplitski *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2003). De igual manera se han caracterizado plantas que secretan enzimas encargadas de degradar las AHLs, lo cual supone un mecanismo de defensa frente a patógenos que actúen mediante mecanismos de QS (Chen *et al.*, 2000; Soto *et al.*, 2006). Esta respuesta denota un claro grado de coevolución entre la planta y los microorganismos adyacentes, puesto que la primera ha conseguido adoptar el lenguaje empleado por la segunda para poder así interferir en sus actividades.

Teniendo en cuenta estas premisas, el estudio de los mecanismos de QS y su posterior manipulación biotecnológica pueden ser una herramienta muy eficaz en un sector como el agrícola que emplea numerosos recursos en intentar evitar el ataque de patógenos y/o mejorar la capacidad nutritiva de los suelos (Soto *et al.*, 2006).

#### **1.4.1. Coinoculaciones.**

El éxito de los inoculantes formulados con numerosos microorganismos (denominados inoculantes mixtos), como práctica alternativa al empleo de inoculantes simples, dependerá principalmente de la cooperación microbiana entre los integrantes de dicho inoculante y las condiciones medioambientales hostiles que tengan que afrontar (Bashan *et al.*, 1995; Barea *et al.*, 2005). Si bien la inoculación de las plantas con rizobacterias suele ocurrir de forma natural, se trata principalmente de una práctica agrícola artificial, por lo que las nuevas bacterias que se incorporen al suelo deberán competir con los microorganismos nativos que ya se encuentren en él como población autóctona (Holguin & Bassan, 1996). Por ese motivo, las nuevas combinaciones entre rizobios y leguminosas con otras bacterias de diversas fuentes, como las ya citadas PGPRs, deberán ser previamente evaluadas para asegurar la efectividad del producto en vistas a ser utilizado como inoculante comercial.

Varios autores han descrito PGPRs capaces de modular los procesos de nodulación y FBN cuando son coinoculadas con rizobios. Zhang *et al.* (1996) caracterizaron PGPRs perteneciente al género *Serratia* y *Aeromonas* que incrementaban

la nodulación y la fijación biológica del N<sub>2</sub> por *B. japonicum* a temperaturas subóptimas. Bashan & Holguin (1997) recopilaron igualmente varios ejemplos de coinoculación con *Azospirillum* y *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, o *Klebsiella*. En este mismo sentido, y basándose en un estudio sobre la coinoculación de la especie fijadora de nitrógeno *Phyllobacterium* sp. con la bacteria solubilizadora de fosfato *Bacillus licheniformis* en plantas de mangle, Rojas *et al.* (2001) sugirieron por primera vez que la interacción entre diversas bacterias rizosféricas debería ser estimada a la hora de evaluar los efectos promotores que cada una ejerce por separado.

Asimismo, existen interacciones similares entre hongos y bacterias. Ruíz-Lozano & Bonfante (2001) sugirieron que la asociación bacteriana con los hongos AM podría influir positivamente sobre la captación de nutrientes por parte de la planta, así como incrementar el transporte de los mismos desde la AM. De forma similar, el crecimiento y la actividad de las bacterias también se ven afectados por las AM y sus exudados presentes en la rizosfera (Christensen & Jakobsen, 1993; Olsson *et al.*, 1996). Mansfeld-Giese *et al.* (2002) informaron acerca de notables diferencias entre la estructura de una comunidad bacteriana propia de una rizosfera micorrizada y la de una no micorrizada, si bien fueron pocos los taxones que determinaron como diferentes entre ambas.

De estos ejemplos podría concluirse que existen interacciones entre los hongos y las bacterias que pueden ser tanto inhibitorias como promotoras, al igual que sucede en las combinaciones bacteria-bacteria, donde si bien la interacción entre ambas puede resultar en un efecto sinérgico de una para con la otra y beneficiar así, en última instancia, a la planta (Tilak *et al.*, 2006), igualmente cabe la posibilidad de que la interacción sea negativa y por lo tanto no se obtenga el efecto deseado (Mrabet *et al.*, 2006). Por este motivo, autores como Gentili & Jumpponen (2006) resaltan la importancia de identificar la combinación compatible de coinoculantes previo a su utilización en el campo.

Además de las combinaciones promotoras del crecimiento constituidas por bacterias y/u hongos, existen otras novedosas aplicaciones de microorganismos que pueden llegar incluso a aumentar el rango de hospedador más allá del propio de cada especie. En este sentido, Kovalskaya *et al.* (2001) mostraron como el tratamiento de la colza (*Brassica napus* bv. *napus*) con una sustancia artificial promotora del crecimiento de estructura semejante a las auxinas, o con las bacterias *Micrococcus* sp. y *Rhodococcus* sp. inducían la formación de paranódulos, que posteriormente eran colonizados por las especies fijadoras de nitrógeno *Azotobacter nigricans* y *Bacillus* sp..

Como resultado de este proceso de formación de paranódulos y fijación de nitrógeno, el contenido de nitrógeno y proteínas de la planta se incrementó significativamente. Estos ejemplos apoyan firmemente la posibilidad de una compleja comunidad formada por AM, bacterias rizosféricas y plantas hospedadoras, cuyas interacciones podrán aportar cuantiosos beneficios en materia de productividad y salud vegetal. De hecho, ya se está comenzando a especular el papel de ciertas PGPRs en combinación con rizobios y/u hongos como agentes biofertilizantes (Vessey, 2003).

Sin embargo, la gran mayoría de los mecanismos a través de los cuales se producen estos efectos no están del todo esclarecidos, por lo que precisan estudios más exhaustivos en este campo para poder optimizar y rentabilizar el potencial de estos microorganismos.

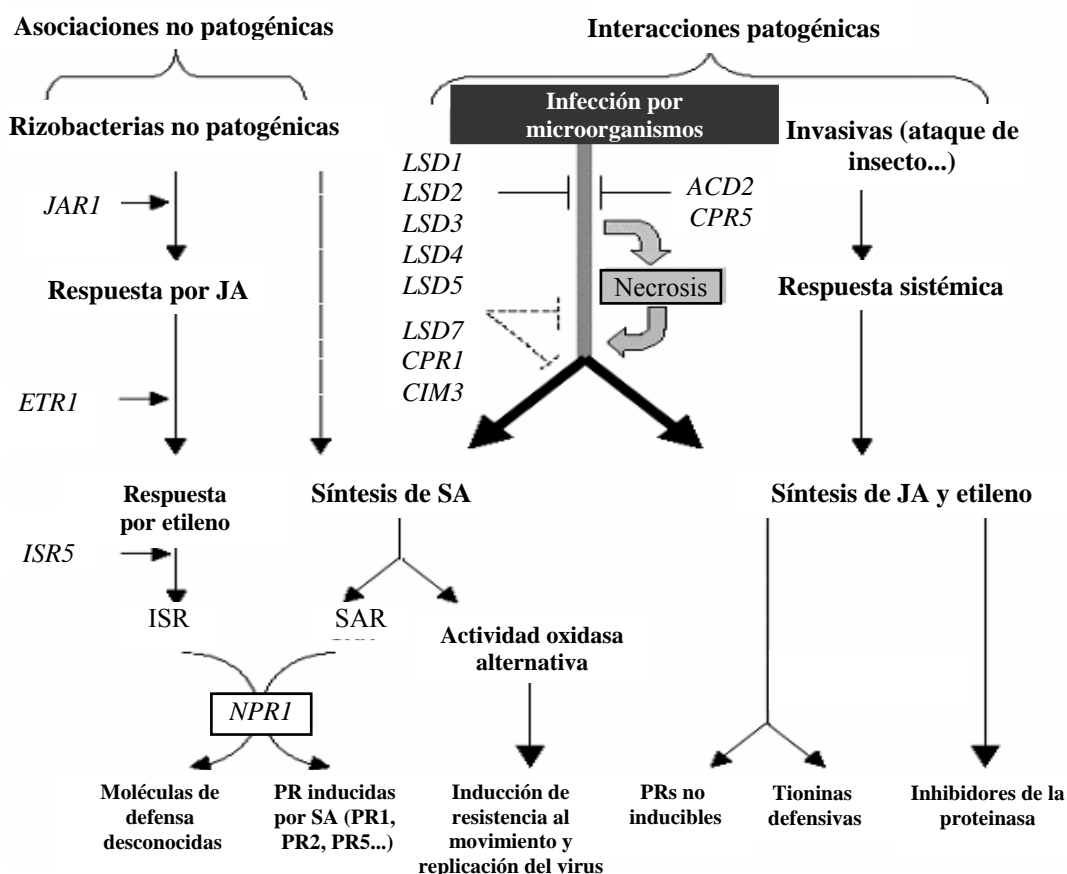
## **1.5. Factores bióticos y abióticos que influyen sobre la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa.**

### **1.5.1. Factores bióticos.**

Las plantas poseen un conjunto de mecanismos para defenderse del ataque de agentes patógenos, ya que son consideradas como substratos nutricionales para un amplio rango de parásitos que incluyen hongos, bacterias, virus, nematodos, insectos y plantas parasitarias. En todos los casos se requiere, en primer lugar, el reconocimiento por parte de la planta de una señal molecular procedente del patógeno, sintetizada a partir de la expresión de los genes *avr* en el caso de las bacterias (genes de resistencia-avirulencia) (Jones, 2001). Una vez reconocida la señal, la planta responde mediante la producción de ácido salicílico (SA), el cual induce a su vez una serie de respuestas como la producción de fitoalexinas y proteínas de resistencia (PRs), la modificación estructural de la pared como barrera física (van Loon *et al.*, 1998, 1999) y el aumento de la concentración de agua oxigenada y de las enzimas relacionadas con su eliminación (catalasas) o control de su concentración. Todas estas respuestas constituyen la ya presentada vía SAR.

Curiosamente, la mayoría de los microorganismos que interaccionan simbióticamente con las plantas son capaces de activar los mecanismos defensivos de ésta. Sirva como ejemplo la relación rizobio-leguminosa, donde inicialmente la planta

reconoce al rizobio como un agente patógeno y se dispara una respuesta mediada por SA (Gianinazzi-Pearson *et al.*, 1996; Soto *et al.*, 2006). Esta respuesta está asociada al fracaso del establecimiento de la simbiosis (rizobios incompatibles), salvo que la señal se bloquee en los estados iniciales de la interacción (rizobios compatibles), lo cual conduce a la formación de nódulos. Por ello, el éxito del establecimiento de la simbiosis entre los rizobios y la leguminosa requiere que las bacterias no induzcan una reacción de defensa de la planta. Igualmente se conoce que las PGPRs son capaces de inducir la vía ISR mediante mecanismos aún desconocidos, pero en los que aparecen claramente implicadas moléculas de su metabolismo secundario como sideróforos y el propio ácido salicílico (Ramamoorthy *et al.*, 2001), y que en ocasiones se solapan con las vías inducidas por los agentes patógenos (figura 1.10.).



**Figura 1.10.** Modelo de vías de señalización sistémicas inducidas en plantas por rizobacterias patogénicas y no patogénicas. ACD, aceleración de la muerte celular; CIM, inmunidad constitutiva; CPR, expresión constitutiva de los genes *PR*; ETR, gen mediador en la respuesta respuesta al etileno; ISR, resistencia sistémica inducida; JA, ácido jasmónico; JAR, gen mediador en la respuesta por ácido jasmónico; LSD, genes implicados en la reparación de daños del ADN celular; NPR, inhibidor de los genes *PR*; *PR*, proteínas de respuesta defensiva; SA, ácido salicílico; SAR, resistencia sistémica adquirida (Persello-Cartieaux *et al.*, 2003).

Las enfermedades, las plagas y las malas hierbas son factores reductores del rendimiento de los cultivos, disminuyendo unas veces la densidad de plantas, otras la absorción y traslocación de agua y nutrientes, la absorción de radiación solar o la tasa de asimilación. Paralelamente, las plantas deben afrontar otras situaciones adversas en sus propias zonas de cultivo, tales como los fenómenos de compatibilidad con aquellos rizobios que se encuentran de forma natural en la rizosfera y que, a pesar de ser generalmente inefectivos en simbiosis, son altamente competitivos dada su alta adaptación al medioambiente. Se define como “competitividad” aquella habilidad de una determinada especie para infectar una leguminosa hospedadora y formar nódulos en presencia de otras cepas, de manera que aquellas especies que dominan mayoritariamente el número de nódulos formados son consideradas más competitivas que las otras. De este modo, trabajos como el realizado por Shamseldin & Werner (2004), quienes seleccionaron cepas altamente competitivas para judía en un medioambiente tan restrictivo como es el caluroso suelo de Egipto, asegurarán en mayor medida el éxito del inoculante.

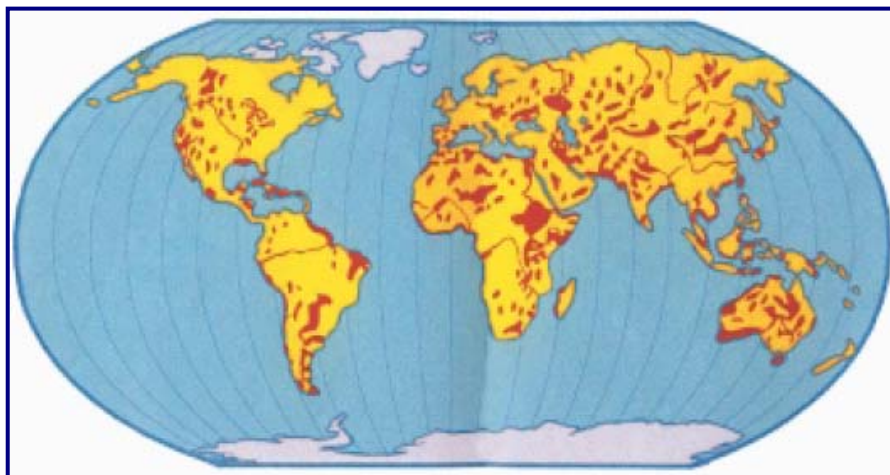
Teniendo en cuenta estas premisas, el éxito del proceso de nodulación dependerá no sólo de una alta eficacia del proceso de fijación del nitrógeno por parte del inoculante, sino también de que éste sea capaz de inhibir la respuesta de rechazo inicial de la planta, y que al mismo tiempo sea un inoculante altamente competitivo con respecto a los rizobios nativos (Segovia *et al.*, 1991).

## **1.5.2. Factores abióticos.**

### **1.5.2.1. Salinidad.**

Las tierras afectadas por el estrés salino se distribuyen prácticamente por todas las regiones climáticas, desde los húmedos trópicos hasta las regiones polares, y a distintas altitudes, desde el nivel del mar hasta sistemas montañosos de 5.000 metros de altitud. A pesar de tratarse de áreas no bien definidas, se estima que aproximadamente un tercio de los casi 160 millones de hectáreas de tierra cultivable en el mundo están afectados por la sal (figura 1.11.), lo cual convierte a la salinidad en una de las restricciones mayores para la producción de alimentos (Zahran, 1999). Así por ejemplo, en la India constituye el mayor problema de toxicidad, donde la combinación de suelos afectados

por sal y la baja calidad de los mismos limita seriamente la productividad agrícola en un país con pocos recursos alimenticios (Greenland, 1984).



**Figura 1.11.** Distribución de suelos salinos en el mundo, indicados con color rojo (Singh & Chatrath, 2001).

La sal común está reconocida como un compuesto inorgánico que ejerce sobre las células un estrés tanto iónico como osmótico, debido a la fuerza iónica que origina en toda solución acuosa y a su alta capacidad de retención de agua. Frente a esta situación, la planta desarrolla respuestas defensivas que no siempre son suficientes para superar esta condición adversa. Bartels y Sunkar (2005) recopilan gran cantidad de información acerca de todas las vías que se disparan en la planta frente a un estrés por sal y sequía.

Las leguminosas han sido consideradas tradicionalmente como una familia poco tolerante a la sal, si bien es cierto que existe gran variabilidad dentro de las distintas especies de dicha familia (Zahran, 1991, 1999). Existen muchos factores tales como las condiciones climáticas, las propiedades del suelo y el cultivar seleccionado (Cordovilla *et al.*, 1995) que limitan la habilidad de las distintas leguminosas para crecer en condiciones salinas. Por ejemplo, especies como *P. vulgaris*, *Viciae faba* y *G. max* son más tolerantes a la sal que *P. sativa* (Cordovilla *et al.*, 1995).

Al mismo tiempo, las leguminosas son más sensibles al estrés salino que sus simbiontes rizobianos (Zahran & Sprent, 1986; El-Shinnawi *et al.*, 1989; Velagaleti *et al.*, 1990), por lo que se están desarrollando varias estrategias encaminadas a la obtención de cultivares más tolerantes a la sal que permitan mejorar la productividad de estos cultivos en condiciones adversas, como por ejemplo la utilización de plantas transgénicas altamente tolerantes a la sal (Yamaguchi & Blumwald, 2005).



Si bien los simbioses de las leguminosas suelen ser más tolerantes a la sal que sus hospedadores, ellos también muestran una marcada variación en cuanto a su tolerancia frente al estrés salino. Yelton *et al.* (1983) informaron acerca de ciertas cepas de rizobios cuyo crecimiento disminuía significativamente bajo concentraciones salinas superiores a 100 mM de NaCl, mientras que Priefer *et al.* (2001) aislaron estirpes de nódulos de *P. vulgaris* en Marruecos que toleraban hasta 680 mM de NaCl. Como patrón general, las bacterias de crecimiento rápido suelen ser más tolerantes a la sal que las de crecimiento lento (El-Sheikh & Wood, 1990), si bien existen numerosas excepciones.

El rango de tolerancia de una estirpe bacteriana vendrá determinado principalmente por la capacidad de respuesta que esta bacteria adopte frente al estrés salino, donde podemos distinguir dos tipos diferentes de respuesta. Existe un primer grupo de bacterias capaces de incrementar su concentración salina interna hasta equipararla con la exterior (familia *Halobacteriaceae*), y un segundo grupo más numeroso que contrarresta la subida de la concentración salina externa con la síntesis de moléculas de bajo peso molecular, denominados solutos compatibles, que ajustarán el valor de presión osmótica interna sin que se afecte la fisiología de la célula (Brown & Simpson, 1972).

Los efectos del estrés salino sobre los procesos de nodulación y fijación de nitrógeno también han sido objeto de amplio estudio (El-Shinnawi *et al.*, 1989; Subba-Rao *et al.*, 1990; Moawad & Beck, 1991; Nair *et al.*, 1993; Delgado *et al.*, 1994; Igual *et al.*, 1997 y Tejera *et al.*, 2005). Tu (1981) observó que los pelos radicales de plantas de soja no mostraban ningún tipo de deformación cuando eran inoculadas con *B. japonicum* en presencia de 170 mM de NaCl, y que la nodulación se inhibía por completo a 210 mM de NaCl. Muchos otros autores han observado fenómenos similares bajo estas condiciones de estrés, de forma que, por regla general, se confirma que la sal inhibe los primeros estadios de la simbiosis rizobio-leguminosa. Otro parámetro que también sufre una reducción por efecto del estrés salino es la tasa de fijación de nitrógeno, bien por una disminución en el número de nódulos (Bekki *et al.*, 1987), o por una bajada en los niveles de hemoglobina de los mismos que conlleve a una menor tasa respiratoria (Delgado *et al.*, 1994), o por una disminución de la actividad nitrogenasa (Tejera *et al.*, 2004).

Teniendo en cuenta estas premisas, el éxito de la simbiosis rizobio-leguminosa estará claramente condicionado por la elección conjunta y adecuada de un simbionte y

un hospedador, ambos tolerantes a la sal (Zahran, 1991; Saadallah *et al.*, 2001b). En este sentido se están desarrollando numerosos proyectos de búsqueda, caracterización y cruzamiento de estirpes y cultivares tolerantes a la sal, como el descrito por Drevon *et al.* (2001).

#### **1.5.2.2. Acidez del suelo.**

Junto con la salinidad, la acidez del suelo constituye uno de los principales problemas para la producción agrícola mundial, puesto que, al igual que la sal, disminuye significativamente la productividad del cultivo (Bordeleau & Prevost, 1994; Graham, 1992). Los valores bajos de pH afectan a todos los estadios de la simbiosis rizobio-leguminosa, incluyendo la supervivencia de la bacteria en el suelo, infección de los pelos radicales, iniciación del nódulo y fijación de nitrógeno (Graham *et al.*, 1982; Wood *et al.*, 1984). Esta disminución de la nodulación es especialmente manifiesta en leguminosas crecidas a valores de pH inferiores a 5, debido a la incapacidad del inóculo rizobiano de sobrevivir bajo estas condiciones tan adversas (Graham *et al.*, 1982; Carter *et al.*, 1994). Sin embargo, existen ciertas excepciones como el trabajo recientemente publicado por Morón *et al.* (2005), quienes indican que la capacidad de nodulación de *R. tropici* CIAT899, cepa altamente tolerante a numerosos tipos de estrés, no disminuye bajo condiciones de pH 4,5 con respecto a las plantas inoculadas a pH 7,0.

#### **1.5.2.3. Temperaturas extremas.**

Las plantas no disponen de mecanismos de regulación térmica, por lo que deben adoptar las temperaturas de su entorno. Si éstas no fluctúan dentro del rango de temperaturas óptimas para su crecimiento (Weis & Bery, 1988), tanto por exceso como por defecto, la planta entra en una situación de estrés que afecta a su desarrollo y que puede llegar a tener importantes implicaciones en la agricultura.

Las altas temperaturas en las regiones tropicales constituyen un gran inconveniente en el cultivo de leguminosas, puesto que dificultan el establecimiento de la simbiosis de rizobios inoculados o de los ya presentes en el suelo, especialmente durante el verano (Michiels *et al.*, 1994). Por regla general, la nodulación óptima tiene lugar a temperaturas por debajo de 30 °C. Sirva como ejemplo la temperatura óptima de nodulación de *P. vulgaris*, la cual oscila entre 25 y 30 °C, anulándose la capacidad de formar nódulos a temperaturas por encima de 33 °C (Piha & Munns, 1987). No

obstante, existen excepciones puntuales como los rizobios aislados por Surange *et al.* (1997) y Kulkarni y Nautiyal (2000) de raíces de leguminosas tropicales, que resultaron ser tolerantes a temperaturas tan elevadas como 50 °C.

Igualmente se dificulta el proceso de simbiosis a temperaturas por debajo de las óptimas, tal y como informan Flower *et al.* (2001) y Ercoli *et al.* (2004), donde la supervivencia de la planta dependerá de la rapidez del descenso de las temperaturas así como de la tenencia o no de mecanismos protectores contra el frío (Pearce, 1999).

#### **1.5.2.4. Disponibilidad limitada de N<sub>2</sub> en el suelo.**

La capacidad de fijación de nitrógeno por las plantas noduladas está condicionada por la concentración de nitrógeno mineral del suelo en al menos dos vertientes. En primer lugar, el proceso de nodulación parece estar promovido por valores relativamente bajos de nitrógeno mineral en el suelo; mientras que en segundo lugar, las concentraciones demasiado elevadas del mismo disminuyen la nodulación (Eaglesham, 1989). Así, Danso *et al.* (1990) indicaron como la fijación de N<sub>2</sub> en plantas de soja se reducía significativamente bajo concentraciones elevadas de nitrógeno mineral en el suelo (83 mg de N por cada kg de suelo).

La formación de los nódulos durante el proceso simbiótico rizobio-leguminosa está considerado como un complejo proceso de múltiples pasos, lo cual predispone a la existencia de numerosas teorías acerca de la inhibición de la fijación del N<sub>2</sub> por altos niveles de nitrógeno. Por una parte se estima que el efecto inhibitorio del nitrato sobre el proceso de fijación se debe a una competición directa entre las enzimas nitrato reductasa y nitrogenasa por el poder reductor (Straub *et al.*, 1997), mientras que otros autores como Becana y Sprent (1987) sostienen que el nitrito, como intermediario de la nitrato reductasa, inhibe la función de la nitrogenasa o de la leghemoglobina.

#### **1.5.3. Aplicaciones de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa en la mejora de los efectos negativos causados por el estrés ambiental.**

En los epígrafes anteriores se desarrollaron numerosos ejemplos de interacciones triples constituidas por rizobio-PGPR-leguminosa cuyo principal objetivo era

incrementar la productividad del cultivo, gracias a la mejora de parámetros como p. ej. la tasa de fijación de nitrógeno o la ingesta de nutrientes; o bien mediante la disminución de los efectos negativos originados por un estrés medioambiental, biótico o abiótico. En este sentido, numerosos autores han descrito los efectos positivos de diversos inoculantes sobre plantas crecidas en condiciones no favorables, a pesar de que en la mayoría de los casos el mecanismo de acción de dichas bacterias no está esclarecido del todo.

Ciertamente, existen relativamente pocos mecanismos que han demostrado inequívocamente ser inductores de una respuesta frente al estrés abiótico en plantas tratadas con PGPRs. Algunos de ellos incluyen la disminución en la producción de etileno por causas del estrés, vía enzima ACC desaminasa (Glick *et al.*, 1998), e incremento en la expresión del gen *ERD15* de la planta, quien ha sido descrito como inducido por el estrés por sequía (Kiyosue *et al.*, 1994). No obstante, es cierto que las PGPRs encontradas en asociación con plantas que crecen de forma continua bajo condiciones de estrés ambiental, han debido desarrollar diversos mecanismos que le permitan afrontar esta situación adversa tanto para ella como para su hospedador.

Mayak *et al.* (2004a, 2004b), han propuesto la utilización de la PGPR *Achromobacter piechaudii* como agente paliativo de los efectos del estrés salino en plantas de tomate y pimiento. Igualmente se han caracterizado microorganismos promotores del crecimiento vegetal en suelos afectados por el estrés ácido, como es el caso de la interacción del hongo *Penicillium radicum* con plantas de algodón (Wakelin & Ryder, 2004). Otros autores, como Bai *et al.* (2003) describieron el efecto promotor de varias cepas de *Bacillus* sobre la nodulación de *B. japonicum* en plantas de soja a temperaturas por debajo de las óptimas, resaltando el gran potencial como PGPB (bacterias promotoras del crecimiento vegetal) que tiene ciertas bacterias endofíticas como las del género *Bacillus* (Hallmann *et al.*, 1997).

Aún más numerosos son los trabajos realizados en los últimos años para paliar los efectos del estrés biótico, en términos de empleo de agentes de biocontrol, donde la mayoría han empleado un único agente de biocontrol para combatir el patógeno. Sin embargo, estos inoculantes simples no suelen ser eficientes en todos los tipos de suelo probados ni en todos los ecosistemas seleccionados (Raupach & Kloepper, 1998), por lo que salen a relucir ciertas deficiencias en el producto como son la colonización inadecuada, la tolerancia limitada a los cambios medioambientales y las fluctuaciones en la producción de metabolitos antifúngicos (Weller & Thomashow, 1994; Dowling &

O’Gara, 1994). Teniendo en cuenta estas premisas, se han empleado alternativamente combinaciones adecuadas de dos o más agentes de biocontrol para reducir de forma más eficiente el daño causado por el patógeno *Sirvan* como ejemplos los trabajos realizados por Pierson & Weller (1994), Duffy *et al.* (1996), Leibinger *et al.* (1997), Schisler *et al.* (1997), Raupach & Kloepper (1998) y Singh *et al.* (1999), quienes emplearon tanto combinaciones de bacterias con hongos como bacterias con bacterias.

En base a estos estudios, podemos resaltar el importante papel que los inoculantes anteriormente descritos juegan dentro del concepto de una agricultura sostenible, puesto que gracias a ellos podremos disminuir en un futuro cercano la aplicación descontrolada de plaguicidas y abonos que intentan, en la misma línea que los inoculantes, paliar los efectos negativos derivados del estrés medioambiental.



## OBJETIVOS





La interacción rizobio-leguminosa está actualmente considerada como la asociación fijadora de N<sub>2</sub> más importante desde un punto de vista agrícola. Junto a esta simbiosis, existen muchas otras interacciones en la rizosfera que pueden bien optimizar la primera, o bien afectarla negativamente, dando lugar a importantes pérdidas ecológicas, económicas y alimenticias. Sin embargo, estos factores bióticos no son los únicos que pueden alterar la eficacia del proceso simbiótico. Existen igualmente factores abióticos que causan pérdidas incluso mayores que las anteriores por la extensa amplitud de su radio de acción. Sirva como ejemplo la elevada salinidad de diversos campos de cultivo, distribuidos mundialmente, los cuales constituyen aproximadamente un 40% del total del terreno cultivable (Zahran, 1999).

Esta disminución en la eficacia de la simbiosis rizobio-leguminosa esta siendo hoy en día contrarrestada eficazmente gracias al empleo de técnicas respetuosas con el medio ambiente, basadas en el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), a fin de lograr una agricultura sostenible. Estas bacterias constituyen un sistema tripartito junto con el rizobio y la leguminosa e incrementan la productividad del cultivo mediante mecanismos directos o indirectos. En este sentido, se están llevando a cabo numerosos trabajos de investigación dedicados no sólo a la optimización del proceso simbiótico rizobio-leguminosa mediante coinoculación con PGPRs en condiciones control, sino que al mismo tiempo, se están desarrollando estudios ambiciosos que proponen las técnicas de coinoculación con PGPRs como medida paliativa de los efectos negativos que el estrés medioambiental ejerce sobre la simbiosis rizobio-leguminosa.

En base a los antecedentes indicados en la Introducción y al planteamiento de la hipótesis de mejorar de forma respetuosa con el medio ambiente la fertilización de cultivos de gran valor alimenticio para la población humana o animal, proponemos como OBJETIVO GENERAL de este trabajo el **estudio de las implicaciones básicas y aplicadas de la interacción triple rizobio-PGPR-leguminosa**, centrándonos especialmente en los efectos del estrés salino sobre el intercambio de señales específicas que tiene lugar entre los integrantes de dicho sistema, y que son imprescindibles para el establecimiento y la eficacia del sistema simbiótico propuesto.

El Objetivo General indicado en esta Memoria de Tesis Doctoral fue desarrollado en los siguientes OBJETIVOS CONCRETOS:

1. **Estudiar el efecto del estrés salino sobre el microsimbionte.** Para la realización del trabajo propuesto se emplearon cepas nodulantes de judía y soja, llevando a cabo un amplio estudio del efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de los factores Nod de los primeros.
2. **Analizar los efectos que la salinidad ejerce sobre las leguminosas *P. vulgaris* y *G. max*.** Nos centraremos fundamentalmente en el estudio de la naturaleza y funcionalidad de sus exudados, así como sobre los estadios iniciales del proceso simbiótico que establecen estas plantas con rizobios compatibles.
3. **Caracterizar el empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la simbiosis rizobio-leguminosa, bajo condiciones control y de estrés salino.** Se estudiará la compatibilidad entre las cepas seleccionadas de rizobio y PGPR, a nivel de crecimiento bacteriano y biosíntesis de factores Nod para evaluar, en última instancia, su potencial como inoculantes dobles en plantas de judía y soja.

## MATERIAL Y MÉTODOS



### **3. Material y Métodos.**

- 3.1. Material biológico.
- 3.2. Antibióticos, enzimas, flavonoides, reactivos, isótopos y oligonucleótidos.
- 3.3. Medios y condiciones de cultivo de las bacterias.
- 3.4. Tampones y soluciones de trabajo.
- 3.5. Aislamiento y manipulación del ADN.
- 3.6. Técnicas de análisis de factores de nodulación (factores Nod).
- 3.7. Ensayos de la actividad  $\beta$ -galactosidasa.
- 3.8. Manejo de plantas.

### **ÍNDICE DE FIGURAS DE MATERIAL Y MÉTODOS.**

	<b>Página</b>
3.1. Sistema de recogida de exudados a gran escala de judía en soporte de rejilla.....	73
3.2. Sistema de tubo empleado en los ensayos de actividad biológica.....	75
3.3. Plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL sembradas en sistemas de macetas de arena de cuarzo estéril.....	77
3.4. Sistemas empleados en los ensayos de cinética de nodulación.....	78

### **ÍNDICE DE TABLAS DE MATERIAL Y MÉTODOS.**

III.1. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	57
III.2. Plásmidos usados en este trabajo.....	58
III.3. Antibióticos utilizados en este trabajo.....	60
III.4. Secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	61
III.5. Medios de cultivo óptimos utilizados para el crecimiento bacteriano.....	61

### 3.1. Material biológico.

#### 3.1.1. Bacterias y plásmidos.

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se recogen en las tablas III.1. y III.2. respectivamente.

**Tabla III.1.** Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepas	Características	Referencias/Fuente
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Cepa silvestre, PGPR	Tarrand <i>et al.</i> , 1978
<i>Chryseobacterium balustinum</i> Aur9	Cepa silvestre, PGPR	Gutiérrez-Mañero <i>et al.</i> , 2003
<i>Ensifer fredii</i> HH103 SMH12	Cepa silvestre, Nal <sup>R</sup> Cepa silvestre, Nal <sup>R</sup>	Dowdle & Bohlool, 1985 Cleyet-Marel, J.C. 1987. Tesis de Estado.
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r	Cepa silvestre, PGPR de referencia	Pieterse <i>et al.</i> , 1996
<i>Rhizobium etli</i> CFN42 ISP42	Cepa silvestre, rizobio de referencia, Rif <sup>R</sup> , Nal <sup>R</sup> Cepa silvestre, Rif <sup>R</sup>	Segovia <i>et al.</i> , 1993 Rodríguez-Navarro <i>et al.</i> , 2000
<i>Rhizobium gallicum</i> PhD12 R602	Cepa silvestre, rizobio de referencia, bv. phaseoli, Nal <sup>R</sup> Cepa silvestre, rizobio de referencia, bv. gallicum, Nal <sup>R</sup>	Geniaux <i>et al.</i> , 1993 Geniaux <i>et al.</i> , 1993
<i>Rhizobium giardinii</i> H152	Cepa silvestre, rizobio de referencia, bv. giardinii, Nal <sup>R</sup>	Geniaux <i>et al.</i> , 1993

Ro84	Cepa silvestre, rizobio de referencia, bv. phaseoli, Nal <sup>R</sup>	Geniaux <i>et al.</i> , 1993
<i>Rhizobium leguminosarum</i>		
RBL5280	Cepa derivada de <i>R. leguminosarum</i> bv. trifolii RCR5 curada de su plásmido simbiótico, pMP154, pMP280, Rif <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
TAL1121	Cepa silvestre, rizobio de referencia, bv. phaseoli, Nal <sup>R</sup>	IPAGRO, Brasil.
<i>Rhizobium tropici</i>		
CFN299	Cepa silvestre, rizobio de referencia tipo IIA, Nal <sup>R</sup>	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1991
CIAT899	Cepa silvestre, rizobio de referencia tipo IIB, Rif <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	Martínez-Romero <i>et al.</i> , 1985
RSP900	Cepa derivada de <i>R. tropici</i> CIAT899 curada del plásmido simbiótico, Rif <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup>	Vargas <i>et al.</i> , 1990
RSP3051	Cepa derivada de <i>R. tropici</i> CIAT899 portadora en el plásmido simbiótico de la fusión transcripcional <i>nodP::lacZ-Gm</i> , Rif <sup>R</sup> , Str <sup>R</sup> , Gm <sup>R</sup>	Manyani <i>et al.</i> , 2001
RSP82	Cepa derivada de <i>R. tropici</i> CIAT899 con una mutación en el gen <i>nodD1</i> , Rif <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Manyani, H. 2000. Tesis Doctoral.

**Tabla III.2.** Plásmidos usados en este trabajo.

Plásmidos	Características	Referencias/Fuente
pCV38	Plásmido derivado del pVK102 con un fragmento de 28 Kb portador de los genes <i>nodD1</i> y <i>nodABCSUIJHPQ</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899, Tc <sup>R</sup>	Vargas <i>et al.</i> , 1990
pCV3804	Plásmido derivado del pRK404 portador de los genes <i>nodD1</i> y <i>nodABCSU</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899, Tc <sup>R</sup>	Vargas <i>et al.</i> , 1990



pCV61	Plásmido derivado del pVK102 con un fragmento de 25,5 Kb portador de los genes <i>nodABCSUIJHPQ</i> de <i>R. tropici</i> CIAT899, bajo influencia del promotor constitutivo de Kanamicina, Tc <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>	Vargas <i>et al.</i> , 1990
pMP240	Plásmido reportero de la actividad β-galactosidasa, portador de la fusión promotor <i>nodA</i> de <i>R. leguminosarum</i> :: <i>lacZ</i> , Tc <sup>R</sup>	de Maagd <i>et al.</i> , 1988
pMP154	Plásmido reportero de la actividad β-galactosidasa, portador de la fusión promotor <i>nodABCIJ</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> :: <i>lacZ</i> clonada en el plásmido pMP190, Str <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP190	Vector de expresión IncQ, Str <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP280	Plásmido derivado del vector pMP92, portador del gen <i>nodD</i> de <i>R. leguminosarum</i> bv. <i>viciae</i> , Tc <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987
pMP92	Vector de expresión IncP, Tc <sup>R</sup>	Spaink <i>et al.</i> , 1987

### 3.1.2. Plantas.

Los ensayos con plantas se llevaron a cabo con semillas de *Phaseolus vulgaris* L. cv. Negro Jamapa (suministradas por la Dra. Isabel M<sup>a</sup> López-Lara, C.C.G., Cuernavaca, México) y cv. Blue Bush Lake (BBL) y semillas de *Glycine max* L. cv. Osumi (ambas suministradas por la Dra. Dulce N. Rodríguez-Navarro, I.F.A.P.A. Las Torres-Tomejil, Alcalá del Río, España).

### 3.2. Antibióticos, enzimas, flavonoides, reactivos, isótopos y oligonucleótidos.

Se usaron antibióticos suministrados por Sigma Aldrich (U.S.A.). Las condiciones de preparación y las concentraciones de trabajo empleadas para cada uno de ellos se recogen en la tabla III.3..

**Tabla III.3.** Antibióticos utilizados en este trabajo.

Antibiótico	Concentración de trabajo	Concentración de la solución stock
Ácido nalidíxico	10 µg/mL de medio	20 mg/mL en H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Ampicilina	100 µg/mL de medio	100 mg/mL en H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> /NaOH
Cloramfenicol	50 µg/mL de medio	50 mg/mL en etanol al 50%
Estreptomina	200 µg/mL de medio	200 mg/mL en H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Gentamicina	25 µg/mL de medio	25 mg/mL en H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Kanamicina	50 µg/mL de medio	50 mg/mL en H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub>
Rifampicina	50 µg/mL de medio	15 mg/mL en metanol
Tetraciclina	5 µg/mL de medio para <i>Rhizobium</i>	5 mg/mL en etanol

Las soluciones de los antibióticos disueltas en H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> se esterizaron por filtración con filtros de nitrato de celulosa de 0,45 µm de diámetro de poro (Millipore®). Las soluciones se almacenaron a -20 °C hasta su uso.

La proteinasa K fue proporcionada por Amersham Biosciences (Gran Bretaña) y se preparó y usó según las recomendaciones de la casa comercial. La enzima Taq-polimerasa y los nucleótidos trifosfato fueron suministrados por Biotools, Inc. (Canadá).

Los inductores comerciales apigenina (4',5,7-trihidroxi flavona), naringenina (4',5,7-trihidroxi flavanona) y genisteína (4',5,7-trihidroxi isoflavona), obtenidos de Sigma Aldrich (U.S.A.), se prepararon mediante disolución en etanol al 96% a una concentración de 1 mM. Se conservaron a -20 °C y se usaron a una concentración final de 1 µM.

El sustrato utilizado en los ensayos enzimáticos de actividad β-galactosidasa fue O-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG), preparado a una concentración de 4 g/L de buffer Z.

El isótopo radiactivo clorhidrato de D-[1-<sup>14</sup>C]-glucosamina (actividad específica 50-60 mCi/mmol), utilizado en los ensayos de análisis de los factores Nod mediante cromatografía en capa fina (CCF), fue proporcionado por Amersham Biosciences (Gran Bretaña) y se utilizó a una actividad final de 0,2 µCi/mL de cultivo.

Los oligonucleótidos usados en los estudios de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), suministrados por Biomedal (España), se prepararon según recomendaciones de la casa suministradora y sus secuencias vienen recogidas en la tabla III.4.. Los oligonucleótidos empleados en este trabajo han sido diseñados gracias al programa informático Primer Premier 5<sup>©</sup> (PREMIER Biosoft International, U.S.A.).

**Tabla III.4.** Secuencias de los distintos oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia
nodD1 sentido	5' - CGGCACGCAGCATCAATCTCA-3'
nodD1 antisentido	5' - TCATGCTGAAGCCCTGCACGA-3'

### 3.3. Medios y condiciones de cultivo de las bacterias.

#### 3.3.1. Medios, condiciones de cultivo y conservación de las bacterias.

Los reactivos usados para la preparación de los distintos medios y soluciones utilizados en este trabajo fueron suministrados por las casas comerciales Panreac (España), Sigma Aldrich (U.S.A.), Merck (Alemania) y Amersham Biosciences (Gran Bretaña). Para la preparación de los cultivos bacterianos se utilizaron los medios recogidos en la tabla III.5., detallados en el apartado 3.3.2..

**Tabla III.5.** Medios de cultivo óptimos utilizados para el crecimiento bacteriano.

Cepa bacteriana	Medio mínimo óptimo (MMO)	Medio rico
<i>Azospirillum brasilense</i> Sp7	Nfb <sup>a</sup>	TY <sup>III</sup>
<i>Chryseobacterium balustinum</i> Aur9	B <sup>-</sup> Glu-cas <sup>b</sup>	TY
<i>Pseudomonas fluorescens</i> WCS417r, <i>Ensifer</i> y <i>Rhizobium</i>	B <sup>-</sup>	TY

<sup>a</sup> Medio Nfb<sup>I</sup> modificado (0,5 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por litro de medio).

<sup>b</sup> Medio B<sup>-II</sup> modificado (se sustituye el manitol por glucosa y se añade 1 g de casaminoácidos por litro de medio).

<sup>I</sup> Döbereiner & Baldani, 1979

<sup>II</sup> van Brussel *et al.*, 1977

<sup>III</sup> Beringer, 1974

Los medios fueron esterilizados en autoclave a 120 °C durante 20 minutos, después de ajustarles el pH adecuado. Para la preparación de medios sólidos se adicionó 15 g de agar/L al medio líquido correspondiente. Los cultivos de los cinco géneros bacterianos fueron incubados a 28 °C y agitación a 180 rpm. Como soporte para la criopreservación de cepas bacterianas se utilizó medio rico adicionado de una solución de glicerol estéril al 30% (1:1, v/v).

### 3.3.2. Medios de cultivo.

#### 3.3.2.1. Medio TY

Triptona	5 g
Extracto de levadura	3 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a 7,0. Una vez esterilizado en autoclave (120 °C, 20 min) y frío, se añadió 9 mL de Cl<sub>2</sub>Ca estéril 1M.

#### 3.3.2.2. Medio mínimo B<sup>-</sup>

Manitol	10 g
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1,3 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,55 g
KNO <sub>3</sub>	0,55 g
Fe(III)-NaEDTA <sup>a</sup>	2,5 mL
Microelementos <sup>b</sup>	2,5 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a 5,0 y se esterilizó en autoclave (120 °C, 20 min). Una vez frío se le añadió 1 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 M pH 7,2 estéril por cada litro de medio. Las vitaminas, disueltas en agua y esterilizadas por filtración (0,2 µm de diámetro de poro) se adicionaron a una concentración final de 0,2 µg/mL y 5 µg/mL, biotina y tiamina respectivamente.

**a.** La solución Fe(III)-NaEDTA se preparó separadamente al 1,3%, y se esterilizó mediante filtración usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm.

**b.** La solución de microelementos consta de:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,269 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,462 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,398 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,0974 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,0354 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

La solución se preparó y almacenó a temperatura ambiente.

### 3.3.2.3. Medio mínimo B<sup>-</sup> Glu-cas

Su composición y preparación es similar a la del medio mínimo B<sup>-</sup>, pero se sustituyó el manitol por glucosa y se adicionó casaminoácidos 1 g/L. Se ajustó el pH a 7,0 y se esterilizó en autoclave (120 °C, 20 min).

### 3.3.2.4. Medio mínimo Nfb

Ácido málico	5 g
KOH	4,5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,2 g
NaCl	0,1 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,02 g
FeEDTA (1,64%)	4 mL
Microelementos <sup>a</sup>	2 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a un valor de 6,8. Se esterilizó en autoclave (120 °C, 20 min) y se agregó 1 mL de solución de vitaminas <sup>b</sup>.

a. La solución de microelementos consta de:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,4 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1,2 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,17 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,04 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

La solución se preparó y almacenó a temperatura ambiente.

b. La solución de vitaminas consta de:

Piridoxol-HCl	0,2 g
Biotina	0,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

Se esterilizó mediante filtración usando un filtro con un tamaño de poro de 0,45 µm y se añadió al medio una vez frío.

### **3.3.3. Estudio del crecimiento bacteriano.**

A partir de un cultivo inicial de la bacteria en medio rico (D.O.<sub>600 nm</sub> oscilante entre 0,6 y 0,8) se inocularon tres tubos de MMO (5 mL de medio) por cada condición de estudio (D.O.<sub>600 nm</sub> cercana a 0,01-0,02) y se midió la variación de la D.O.<sub>600 nm</sub> a lo largo del tiempo. Los tubos fueron incubados a 28 °C en agitación (180 rpm) hasta alcanzar el estado estacionario. Paralelamente se realizó recuento de células viables en distintos puntos de la curva en placas de medio TY, cada uno por triplicado, para establecer una correcta relación entre turbidez y viabilidad celular, determinada como unidades formadoras de colonia (UFC)/mL.

La determinación del peso seco del cultivo fue necesaria en ciertas condiciones, para lo cual se recogió la totalidad del mismo al término de la curva, manipulando independientemente cada repetición, y se llevó hasta sequedad en una estufa a 75 °C. Tras eliminar el agua presente en la muestra, se pesó la masa recogida y se refirió el peso seco en mg/mL de cultivo.

### **3.3.4. Obtención del líquido metabólico (LM) de cultivos bacterianos.**

Se inoculó un precultivo de la bacteria en su correspondiente MMO (5 mL) hasta que alcanzó una D.O.<sub>600 nm</sub> entre 0,6 y 0,8, con el que se inoculó a continuación un volumen de 200 mL del mismo medio de crecimiento empleado. Se incubó a 28 °C, 180 rpm, hasta que alcanzó una D.O.<sub>600 nm</sub> cercana a 0,8 y se centrifugó durante 20 min, 4 °C, 12000 rpm. La D.O.<sub>600 nm</sub> nunca superó el valor indicado de 0,8, pues se dificulta en exceso la sedimentación de las células debido a la producción y excreción de diversos productos del metabolismo celular secundario, evitándose al mismo tiempo el agotamiento del medio de cultivo. El sobrenadante obtenido se filtró en condiciones de esterilidad mediante un kitasato estéril acoplado a una bomba de vacío, utilizándose en primer lugar un filtro de acetato de celulosa de 4 µm y posteriormente otro de 0,22 µm. Finalmente, se recogió el sobrenadante estéril (denominado “líquido metabólico” o LM) y se almacenó a 4 °C para su uso inmediato, o bien a -20 °C para un uso posterior. Para confirmar la ausencia total de contaminación, se fraccionaron tres alícuotas de 100 µL por muestra estudiada y se sembraron en medio mínimo B<sup>-</sup> y rico TY, comprobando la ausencia de crecimiento tras dos días de incubación a 28 °C.

### 3.3.5. Determinación de la tolerancia a la salinidad, estrés osmótico y estrés iónico. Crecimiento en diversas combinaciones de LM.

Se determinó la tolerancia a la salinidad, al estrés osmótico e iónico mediante la observación del crecimiento de las bacterias en las distintas condiciones de ensayo establecidas. Se prepararon precultivos de las distintas cepas en su MMO ( $D.O_{600\text{ nm}} \leq 0,6$ ), con los que se inocularon posteriormente 3 tubos de 5 mL por bacteria y condición de estudio, a una  $D.O_{600\text{ nm}}$  de 0,01-0,02. Así, para los ensayos de tolerancia al estrés salino por NaCl o por KCl, se establecieron las condiciones de estudio medio mínimo B<sup>-</sup> 0, 100, 200, 300, 400 y 450 mM de NaCl o KCl respectivamente. En los estudios de estrés por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, las concentraciones de las soluciones se rebajaron a la mitad, para equiparar en molaridad la concentración del ión Na<sup>+</sup> con las soluciones de NaCl. En los estudios de estrés osmótico las condiciones fueron medio mínimo B<sup>-</sup> 373 mM de manitol y 60 mM de PEG6000.

Para los estudios de influencia del LM de una bacteria (a) para con otra seleccionada (b), se establecieron las siguientes combinaciones:

LM puro (a)	LM (a) + agua	LM (a) + MMO (b)	MMO (b)	MMO (b) + agua
-------------	---------------	------------------	---------	----------------

Todas ellas se incubaron a 28 °C durante un periodo máximo de 120 horas, midiendo la turbidez del cultivo a 600 nm y paralelamente se realizó el recuento de células viables en determinados puntos de la curva de crecimiento.

Igualmente se realizaron ensayos de difusión en placa con el fin de determinar cualquier posible inhibición del crecimiento de una bacteria por el LM de otra. Así, se sembró un cultivo de la primera en una placa de TY, la cual fue troquelada a continuación, depositándose 100 µL del LM de la segunda en la cavidad. Se incubó a 28 °C durante 4 días a la espera de observar un halo de inhibición.

### 3.4. Tampones y soluciones de trabajo.

La composición de los distintos tampones y soluciones utilizadas en este trabajo se muestran a continuación. Salvo excepciones, las soluciones no se esterilizaron y se conservaron a temperatura ambiente.

### 3.4.1. Tampón TE.

Tris-HCl a pH 8,0	10 mM
EDTA a pH 8,0	1 mM

### 3.4.2. Tampón TBE 0,5X.

Tris base	90 mM
Ácido bórico	90 mM
EDTA	2 mM

### 3.4.3. Buffer Z.

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,54 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	5,50 g
KCl	0,75 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,25 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a 7,0 y se conservó a 4 °C sin esterilizarlo. Se añadió 2,8 mL de β-mercaptoetanol por cada litro de buffer en el momento de uso.

### 3.4.4. Soluciones tampón para pHs.

Los tampones empleados para mantener constante el pH del medio de cultivo en el valor de 4,5 fueron el buffer inorgánico citrato-fosfato ((0,56g C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>OH(COOH)<sub>3</sub>-1,67 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) /100 mL medio (Costilow, 1981)) y el buffer biológico HOMOPIPES (ácido homopiperazina-N-N'-bis-2-[etanosulfónico], 25 mM), suministrado este último por Research Organics (U.S.A.). Se añadieron al medio previo a la esterilización en autoclave (120 °C, 20 min), y tras la misma, se volvió a determinar el pH para comprobar que éste no había virado en más de ±0,1.

### 3.5. Aislamiento y manipulación del ADN.



### **3.5.1. Aislamiento del ADN total.**

La extracción del ADN total de las células de rizobio se llevó a cabo según la siguiente metodología: se tomó 5 mL de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, se centrifugaron durante 1 minuto para sedimentar las células y se lavaron dos veces con tampón TE 50/20 (TrisHCl 50 mM/EDTA 20 mM). Finalmente se resuspendieron en 400  $\mu$ L de este mismo tampón, al que se añadió 50  $\mu$ L SDS 10% y 50  $\mu$ L de proteinasa K al 0,2%, predigerida previamente durante 1 hora a 37 °C. Se vorteoó enérgicamente durante 3 minutos. Tras incubar la mezcla 60 minutos a 37 °C, se extrajo el ADN con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y se precipitó con dos volúmenes de etanol al 96% y 0,1 volumen de acetato sódico 3 M, dejándolo 20 minutos a -20 °C. Finalmente se lavó con 1 mL de etanol 70% y se conservó a -20 °C resuspendido en agua bidestilada estéril.

### **3.5.2. Determinación de la concentración del ADN.**

La determinación de la concentración del ADN se realizó usando el espectrofotómetro "Gene Quant" comercializado por Pharmacia Biotech (Gran Bretaña), a una longitud de onda de 260 y 320 nm.

### **3.5.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).**

Una vez extraído el ADN bacteriano según se describe en el apartado anterior, se emplearon 50-100 ng del mismo como molde para su amplificación según la metodología descrita por de Bruijn (1992).

El volumen final de la mezcla de reacción fue 25 ó 50  $\mu$ L, dependiendo de la utilidad final del producto amplificado. Se emplearon los componentes de dicha mezcla en las siguientes concentraciones: oligonucleótidos 1  $\mu$ M cada uno, dNTPs 0,25 mM, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, buffer comercial 5X y 1 unidad de Taq-polimerasa I.

Los programas utilizados para llevar a cabo la reacción dependieron del tamaño de los fragmentos que se querían amplificar, siendo el primer ciclo (desnaturalización, 3 minutos a 95 °C) y el último (extensión, 5 minutos a 72 °C) común para todos los programas. Sí se ajustó el tiempo de la fase de extensión a la banda amplificada, siendo de 30 segundos para los fragmentos de entre 200 y 700 pb, 1 minuto para los fragmentos de 700 a 1.500 pb y 2 minutos para los fragmentos mayores de 1,5 Kb. La temperatura de la fase de "annealing" (alineamiento) osciló entre 48 y 60 °C, dependiendo de la especificidad

de los oligonucleótidos. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100™ suministrado por M.J. Research, Inc. (U.S.A.).

La separación y visualización de los fragmentos amplificados se llevó a cabo según se describe en el apartado 3.5.4..

#### **3.5.4. Electroforesis en geles de agarosa.**

El ADN total o monocatenario fue analizado en geles horizontales de agarosa en tampón TBE 0,5X de concentración variable en función del tamaño de las bandas a visualizar. Así, se emplearon geles con una concentración de agarosa comprendida entre 0,8 y 1,2% para la visualización de bandas de tamaño entre 0,6 y 23 Kb (Maniatis *et al.*, 1982). Sin embargo, para los tamaños fuera de este intervalo se ajustó la concentración de agarosa de los geles dependiendo del tamaño de las bandas a estudiar, aumentando o disminuyendo la cantidad de la misma.

La tinción de los geles se llevó a cabo mediante el uso de bromuro de etidio, agente intercalante, incorporándolo directamente al gel a una concentración de 0,5 µg/mL, o sumergiendo el gel en una solución de este compuesto tras la migración del ADN. Como tampón de carga se usó azul de bromofenol al 0,25% y xileno cianol FF al 0,25% en glicerol al 30% y TBE 5X al 5%. Para la observación de las bandas y la fotografía de las mismas se utilizó un equipo transiluminador de luz UV (longitud de onda de 300 nm) acoplado a un sistema fotográfico de la casa BIO-RAD. La estimación de los pesos moleculares de las bandas observadas se realizó comparando la migración de las mismas con las de marcadores comerciales de ADN, tales como “100 pb Ladder” (bandas de 1; 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1; 0,08 Kb; BioTools Inc., Canadá) y “1 Kb Ladder” (bandas de 10; 8; 6; 5; 4; 3,5; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,75; 0,5; 0,25 Kb; BioTools Inc., Canadá) o ADN del fago λ digerido con la endonucleasa de restricción *Hind*III (bandas de 23,13; 9,42; 6,56; 4,36; 2,32; 2,03; 0,56 Kb; Amersham Biosciences, Gran Bretaña).

### **3.6. Técnicas de análisis de factores de nodulación (factores Nod).**

#### **3.6.1. Cromatografía en capa fina (CCF).**

Los análisis por CCF se llevaron a cabo de acuerdo con el método descrito por Spaink *et al.* (1992). Se prepararon precultivos de las distintas cepas de rizobio en medio

mínimo B<sup>-</sup> a una D.O.<sub>600 nm</sub> 0,4-0,6, los cuales fueron diluidos 1:10 en 1 mL bien del mismo medio (condición control) o bien de un medio modificado (B<sup>-</sup> adicionado de la cantidad estimada de un ión u osmolito, LM puro de una bacteria PGPR, o cultivo 10<sup>6</sup> UFC/mL de la propia PGPR para los estudios de coinoculación). A continuación se añadió el flavonoide inductor correspondiente (a excepción de los controles negativos) a una concentración final de 1 µM. Cuando el inductor empleado fue un exudado radical (ver apartado 3.8.3.), la proporción de dicha mezcla fue invertida, siendo finalmente exudado:cultivo bacteriano 10:1 (v/v). El marcaje radiactivo se efectuó con 0,2 µCi de clorhidrato de <sup>14</sup>C-glucosamina.

A las 48 horas (72 para la inducción con exudados, o bien el tiempo estimado en cada uno de los puntos de la cinética de producción de factores Nod) se centrifugó el cultivo durante 15 minutos a 13.000 rpm, descartándose el precipitado, y se añadió 0,5 mL de *n*-butanol saturado con agua al sobrenadante, incubándose la mezcla durante 12 horas con agitación. Una vez centrifugado, la fase butanólica fue recuperada y evaporada en un equipo Speed-Vac<sup>®</sup> Savant. El polvo resultante se resuspendió en 40 µL de *n*-butanol saturado con agua, aplicándose 10 µL de esta solución a placa de CCF de sílica RP-18 F<sub>254s</sub> de 10 x 10 cm de la casa comercial Merck (Alemania). La separación de los factores Nod se llevó a cabo empleando como fase móvil una mezcla de acetonitrilo (AcN):agua (1:1, v/v), preparada en el momento de uso. Las placas de CCF fueron expuestas sobre película de autorradiografía Kodak<sup>®</sup> X-Omat AR durante 15 días, al término de los cuales se procedió a su revelado con soluciones de revelador y fijador igualmente suministradas por Kodak<sup>®</sup>.

### 3.6.2. Análisis estructural de los factores Nod.

Para el análisis de la estructura de los factores Nod se prepararon muestras a partir de 10 L de cultivo. A partir de tubos con 5 mL de cultivo en medio B<sup>-</sup> de la bacteria a estudiar se inocularon matraces de 100 mL del mismo medio y se incubaron a 28 °C. Una vez que la D.O.<sub>600 nm</sub> llegó a 0,6-0,8, se trasvasó el contenido de los matraces a otros con 1 L del medio indicado suplementado con el flavonoide correspondiente a una concentración final de 1 µM, salvo controles negativos.

Ambos cultivos fueron incubados a 28 °C en agitación hasta fase exponencial tardía. La extracción de los factores Nod se realizó añadiendo 300 mL de *n*-butanol por litro de medio, dejándolo en agitación durante 12 horas. Posteriormente se recogió la fase

butanólica concentrándose a sequedad en rotavapor a 50 °C. El extracto butanólico conteniendo los factores Nod se pasó a través de una columna de purificación en fase reversa C<sub>18</sub>, eluyendo con AcN:agua al 20, 45 y 60%.

La fracción del 45% se sometió a fraccionamiento utilizando un cromatógrafo de HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución, del inglés “**H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography) equipado con una columna semipreparativa y un detector Photodiode Array, monitorizando a 206 nm y usando como eluyente AcN:agua en distintas proporciones (20%, 5 minutos; 30%, 30 minutos; 40%, 30 minutos; 60%, 15 minutos y terminando con un gradiente 60-100% de 10 minutos). Con ayuda de un recolector de fracciones se aislaron diferentes factores Nod, colectándolos y liofilizándolos. Las fracciones aisladas conteniendo los factores Nod se analizaron por FAB-MS, MALDI-Tof-MS, ES-Q-o-Tof-MS, y MALDI-Q-o-Tof-MS.

El análisis de la estructura de los mismos fue llevado a cabo en colaboración con los Grupos de Investigación dirigidos por el Dr. Antonio Gil Serrano (Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Química de la Universidad de Sevilla, España), la Dra. Jane Thomas-Oates (Departamento de Química, Universidad de York, Gran Bretaña) y el Dr. Paul Hensbergen (Departamento de Parasitología del Centro Médico Universitario de Leiden, Universidad de Leiden, Holanda).

### **3.7. Ensayos de la actividad $\beta$ -galactosidasa.**

Se emplearon dos protocolos de ensayo de la actividad  $\beta$ -galactosidasa según la cepa indicadora seleccionada. Se empleó la técnica descrita por Zaat *et al.* (1987) para determinar el nivel de inducción de los genes *nod* de las cepas *R. tropici* CIAT899, *R. etli* ISP42, *E. fredii* SMH12 y HH103, portadores todos ellos del plásmido pMP240 (ver tabla III.2.).

A partir de un precultivo de la cepa objeto de estudio, se sembraron tres tubos de 5 mL por cada condición de ensayo establecida (medio mínimo B<sup>-</sup> en presencia o ausencia de NaCl o manitol; o bien LM puro, con la excepción del LM de *A. brasilense* Sp7, el cual se utilizó mezclado con B<sup>-</sup> (1:1, v/v)). Los flavonoides apigenina, naringenina o genisteína fueron añadidos a una concentración final de 1  $\mu$ M en las condiciones inducidas. Cuando se emplearon alícuotas de exudados como inductores de la reacción, la proporción de la mezcla de ensayo fue 100  $\mu$ L del cultivo bacteriano y 900  $\mu$ L del exudado objeto de

estudio. Estos cultivos se incubaron a continuación a 28 °C hasta alcanzar una D.O.<sub>600 nm</sub> cercana a 0,3-0,4 (72 h para los ensayos con exudados, puesto que la D.O.<sub>600 nm</sub> permanece constante), recogiendo 100 µL de la mezcla y añadiéndole 900 µL de buffer Z.

A continuación se añadió a cada tubo 50 µL de cloroformo y 100 µL de SDS 0,1%, y tras una incubación de 5 minutos a 28 °C y un vortex de 1 minuto, se adicionó a cada tubo 100 µL de ONPG, preparado a una concentración de 4 mg/mL en buffer Z y se incubaron a 28 °C hasta la aparición de color amarillo. Finalmente, se detuvo la reacción con 0,4 mL de carbonato sódico 1M y se midió la absorbancia a 420 nm a fin de poder determinar la actividad β-galactosidasa de acuerdo al método de Miller *et al.* (1972). Los ensayos se realizaron por triplicado, siendo la desviación estándar de los valores siempre menor de un 20%.

Para aquellos ensayos en los que se empleó como cepa indicadora *R. leguminosarum* RBL5280, se recurrió al protocolo descrito por van Brussel *et al.* (1990), el cual incorpora ciertas modificaciones en los métodos de lisis y en la concentración y el volumen de las alícuotas empleadas con respecto al protocolo anteriormente descrito.

### **3.8. Manejo de plantas.**

#### **3.8.1. Solución nutritiva para el crecimiento de plantas.**

Se empleó la solución Fåhraeus (Fåhraeus, 1957) para los ensayos de actividad biológica y la solución Rigaud & Puppo diluida a la cuarta parte (Rigaud & Puppo, 1975) para los estudios de la actividad inductora y composición de los exudados de judía y soja y los ensayos de nodulación. La composición de ambas soluciones se detallan a continuación.

Para los ensayos de actividad biológica llevados a cabo en condiciones de estrés ácido se ajustó el pH de la solución nutritiva a 4,5 con tampón citrato-fosfato (0,5g C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>OH(COOH)<sub>3</sub>-0,61 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O) /100 mL medio).

De igual manera, se adicionó la cantidad requerida de NaCl para los ensayos de actividad biológica y test de nodulación llevados a cabo bajo condiciones de estrés salino (solución Fåhraeus 25 mM de NaCl y solución Rigaud & Puppo 25 mM de NaCl, respectivamente), así como para la obtención de exudados radicales salinos (solución Rigaud & Puppo 50 mM de NaCl).

### 3.8.1.1. Solución Rigaud & Puppo

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,20 g
Ca <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,12 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,20 g
Fe(III)-NaEDTA	0,02 g
CIK	0,02 g
Solución de Gibson	1 mL
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

Se ajustó el pH a un valor de 6,8 y se esterilizó mediante autoclave (120 °C, 20 min).

Solución de Gibson	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2,86 g
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	2,08 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,22 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,11 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,08 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

### 3.8.1.2. Solución de Fåhraeus

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,15 g
Citrato férrico	0,13 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,12 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,1 g
Cl <sub>2</sub> Ca·2H <sub>2</sub> O <sup>a</sup>	0,1 g
H <sub>2</sub> O <sub>dest.</sub> c.s.p.	1 L

<sup>a</sup> El Cl<sub>2</sub>Ca·2H<sub>2</sub>O se añadió a la solución una vez esterilizada, a partir de una solución 1M estéril previamente preparada.

### 3.8.2. Desinfección y pregerminación de semillas.

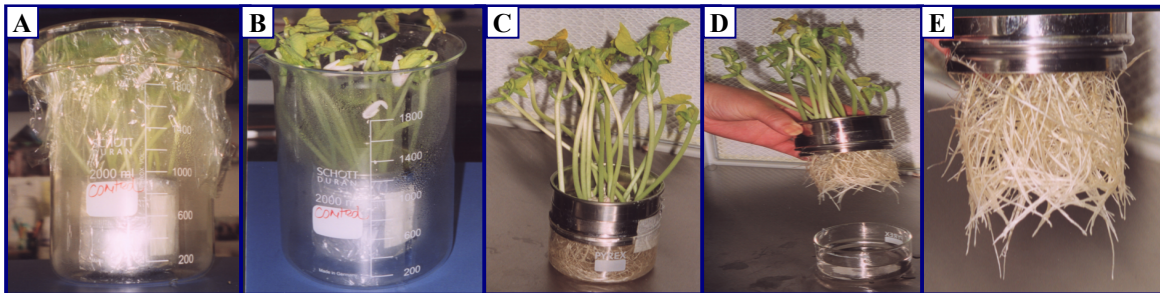
Las semillas de *P. vulgaris* (cv. Negro Jamapa y cv. BBL) y de *G. max* (cv. Osumi) se desinfectaron según las siguientes etapas: lavado con agua destilada estéril, 30 segundos en etanol absoluto, lavado con agua destilada estéril, 8 minutos en hipoclorito sódico al

10% y 7 lavados finales con agua destilada estéril. Posteriormente, se colocaron en placas de Petri con agar-agua al 0,8% y TY diluido a la cuarta parte, y fueron incubadas durante 48 horas a 28 °C en oscuridad para su pregerminación.

### 3.8.3. Obtención de exudados radicales.

Se colocaron las semillas desinfectadas y pregerminadas sobre mallas de acero inoxidable depositadas en un cristalizador lleno con 130 mL de solución Rigaud & Puppo estéril (0 ó 50 mM de NaCl, según las condiciones de estudio), de modo que las raíces de las semillas (de 15 a 20 por sistema) quedaran embebidas en dicha solución. Se cultivaron las plantas durante una semana en una cámara IBERCEX<sup>®</sup> (modelo 6-28, A.S.L., S.A.), bajo condiciones de asepsia, con un ciclo de 16 horas de luz a 24 °C/8 horas de oscuridad a 20 °C, 50% humedad relativa, y preservando las raíces de la luz.

A los siete días (cuatro para determinados ensayos donde se indica pertinentemente) se recogió y prefiltró el exudado con una membrana de nitrato de celulosa de 8 µm de diámetro de poro y posteriormente se esterilizó por filtración con una segunda membrana de nitrato de celulosa de 0,22 µm de diámetro de poro. La figura 3.1. muestra los sistemas empleados en este proceso de recolección.



**Figura 3.1.** Sistema de recogida de exudados a gran escala de judía en soporte de rejilla. Panel A, sistema completo; B, C, y D, separación de raíces de judía y obtención del exudado radical; E, raíces de *P. vulgaris*.

Cuando el exudado a recolectar debía provenir de plantas preinoculadas con la PGPR *C. balustinum* Aur9, las plantas de judía y soja se inocularon a tiempo cero a una concentración final de la PGPR de 10<sup>6</sup> UFC/mL, a partir de un cultivo inicial del orden de 10<sup>9</sup> UFC/mL. Después de 7 días de ensayo se procedió a la recolección de los exudados siguiendo las indicaciones anteriores, y se comprobó el crecimiento de la PGPR inoculada

inicialmente, el cual oscilaba en el mismo rango del inóculo inicial. Posteriormente se centrifugó a 6000 rpm, 4 °C durante 10 minutos, se filtró varias veces hasta la eliminación completa de la bacteria y se almacenó a -20 °C hasta su utilización. Se sembraron alícuotas de 100 µL del mismo filtrado en placas de TY, y tras incubación a 28 °C durante tres días se verificó la ausencia de contaminación.

Para los ensayos de inducción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa *R. leguminosarum* RBL5280 se siguió el protocolo de recogida de exudados descritos por van Brussel *et al.* (1990).

#### **3.8.4. Técnicas de análisis de exudados de judía y soja.**

Tras recolectar los exudados según los pasos indicados en el apartado 3.8.3., éstos fueron concentrados hasta un volumen de 25 mL aproximadamente y el concentrado se pasó a través de cartuchos de 900 mg de C<sub>18</sub> (Resprep). Los flavonoides fueron eluidos del cartucho con metanol al 50, 80 y 100% y posteriormente las fracciones fueron combinadas, liofilizadas y solubilizadas en metanol al 50% (1 mL) para ser analizadas por HPLC. La separación por HPLC fue llevada a cabo en un Espectrómetro de Masas Linear Ion Trap Quadrupole LC/MS/MS (AB Sciex Instruments), a través de una columna analítica C<sub>18</sub> de fase reversa (200×2,1 mm, Excel 120 ODSB, 5 µm, Tracer). Se empleó la mezcla de solventes (A) H<sub>2</sub>O:HCO<sub>2</sub>H (99,9:0,1 v/v) y (B) MeOH:CH<sub>3</sub>CN: HCO<sub>2</sub>H (50:50:0,1 v/v/v), con una tasa de flujo de 0,3 mL/min, según el siguiente gradiente de elución: 0-10 min linear de 5% a 55% del solvente B; 10-30 min linear de 55% a 100% B; 30-50 min isocrático 100% B y 50-55 min linear de 100% a 5% B (Dakora *et al.*, 1993a; Ríos *et al.*, 2005). Debido al acople del cromatógrafo de HPLC con la fuente ESI, toda la muestra obtenida del primer equipo pasó directamente al segundo, donde se obtuvo el espectro de masas en modo negativo. Las condiciones establecidas para dicho análisis fueron las indicadas por Justesen (2001): voltage de spray -4.5 kV; cortina de gas, 20 psi; gas nebulizador (GS1) (N<sub>2</sub>), 20 psi; gas secador (GS2), 0 psi; potencial declustering (DP), -70V; temperatura 200 °C; scan completo (*m/z* 100-400).

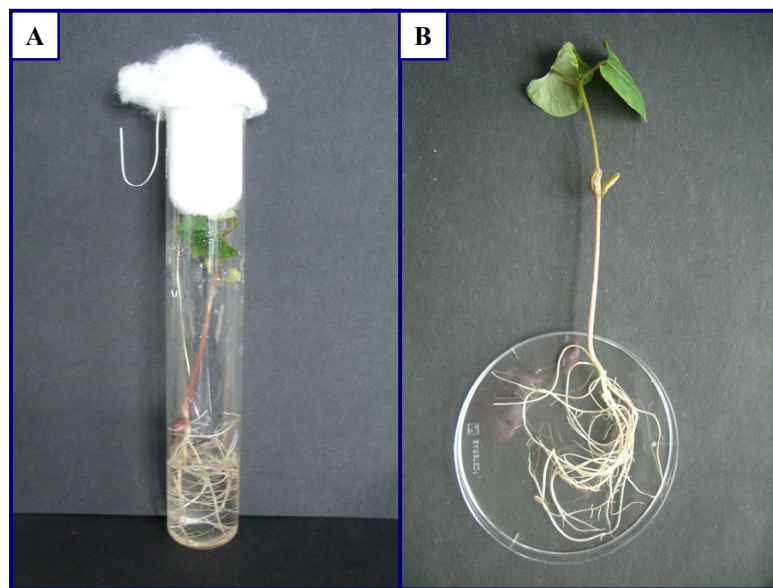
#### **3.8.5. Ensayos de actividad biológica en plantas.**

Se prepararon tubos de vidrio de 3 x 20 cm con un alambre de punta enrollada introducido y un saliente por fuera del tubo que facilita su manejo en condiciones



asépticas. Se cubrieron con un tapón de algodón y se esterilizaron en autoclave (120 °C, 20 min).

Se depositó una semilla por tubo, desinfectada y pregerminada según el apartado 3.8.2., procurando que quedase en suspensión tal que la semilla estuviese sujeta en el enrollamiento del alambre y su radícula estuviese embebida en los 25 mL de solución Fåhraeus con los que se llena cada tubo (pH 7,0, 0 mM de NaCl para condiciones control de ensayo para la planta; o pH 4,5, 0 mM de NaCl para condiciones de estrés ácido; o pH 7,0, 25 mM de NaCl para condiciones de estrés salino). La figura 3.2. muestra el sistema empleado para estos ensayos.



**Figura 3.2.** Sistema de tubo empleado en los ensayos de actividad biológica. Panel **A**, sistema completo y panel **B**, planta tomada del sistema.

En los ensayos de determinación de la actividad biológica de factores Nod, se adicionó 25  $\mu\text{L}$  de una solución concentrada de factores Nod  $10^{-2}$  M (disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO), preparados según se detalla en el apartado 3.6.2., para trabajar a una concentración final de  $10^{-5}$  M, o bien 2,5  $\mu\text{L}$  de la misma solución para una concentración de  $10^{-6}$  M, haciendo cuatro réplicas por cada condición. Para los ensayos de actividad donde se utilizó la propia estirpe bacteriana, se añadió 20  $\mu\text{L}$  del cultivo  $10^8$  UFC/mL por cada tubo de ensayo. Y para la variante de ensayo de las fracciones purificadas de los factores Nod, se secaron las fracciones recogidas del HPLC del extracto

puro de los mismos, y se disolvieron en 20  $\mu$ L de DMSO que fueron directamente añadidos a la planta.

Finalmente, se depositaron los tubos en un soporte de madera que resguardaba la raíz de la luz y se incubaron en una cámara de cultivo con un ciclo de 16 horas de luz a 28 °C/8 horas de oscuridad a 20 °C, durante un período de 10 días para las plantas de judía y de 14 días para las de soja. Se abrió y se examinó un tubo por condición al quinto día del ensayo para controlar el desarrollo de la planta y los restantes al décimo y catorceavo día, respectivamente. A todas las plantas se le seccionó el tallo, se recogió y lavó la raíz con agua destilada y posteriormente se impregnó en hipoclorito sódico 5 % durante unos 20 minutos aproximadamente en placa Petri. Se lavó nuevamente con agua bidestilada estéril y se conservaron a 4 °C durante al menos 24 horas. A continuación se tiñeron con unas gotas de azul de metileno al 1% con el fin de visualizar los primordios nodulares y nódulos al microscopio óptico, con aumentos de 10X, 40X, 100X y 1000X según requerimiento.

Para los ensayos de actividad biológica en los que la planta fue preinoculada con la PGPR *C. balustinum* Aur9, se inoculó en primer lugar la PGPR (20  $\mu$ L de un cultivo  $10^8$  UFC/mL por cada tubo de ensayo) y a las 15 horas, como mínimo (generalmente 48 horas para las plantas de soja), se añadió el rizobio (nuevamente 20  $\mu$ L de un cultivo  $10^8$  UFC/mL por cada tubo de ensayo).

### **3.8.6. Ensayos de nodulación.**

El ensayo se llevo a cabo en macetas de 2 kg de arena de cuarzo estéril, regadas con 100 mL de solución estéril de Rigaud & Puppo diluida a la mitad. Cada maceta portaba una planta, con seis repeticiones para cada tratamiento. Para las condiciones de estrés salino, dicha solución de riego fue preparada adicionándole 25 mM de NaCl.

Una vez desinfectadas y pregerminadas las semillas según el apartado 3.8.2., se depositaron dos por macetas y se inocularon con 1 mL de cultivo de *C. balustinum* Aur9  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL para los tratamientos coinoculados (Aur9 + rizobio). Tras un periodo mínimo de 15 horas, se inocularon tanto los tratamientos simples (sólo rizobio) como los coinoculados, con 1 mL de un cultivo fresco del rizobio a ensayar  $10^7$ - $10^8$  UFC/mL. Se cultivaron las plantas durante 28 días en una cámara de cultivo (a los 7 días del comienzo se eliminó una de las dos plantas sembradas en cada maceta), con un ciclo de 16 horas de luz a 25 °C/8 horas de oscuridad a 18 °C.

La humedad relativa se mantuvo en torno al 80%. Los riegos se efectuaron en días alternos a lo largo de los 28 días, con solución Rigaud & Puppo 25 mM de NaCl para el tratamiento salino y 0 mM para el control, si bien tanto el ensayo control como el salino fueron regados con solución 0 mM de NaCl durante la primera semana. La figura 3.3. nos muestra los sistemas empleados en este ensayo.



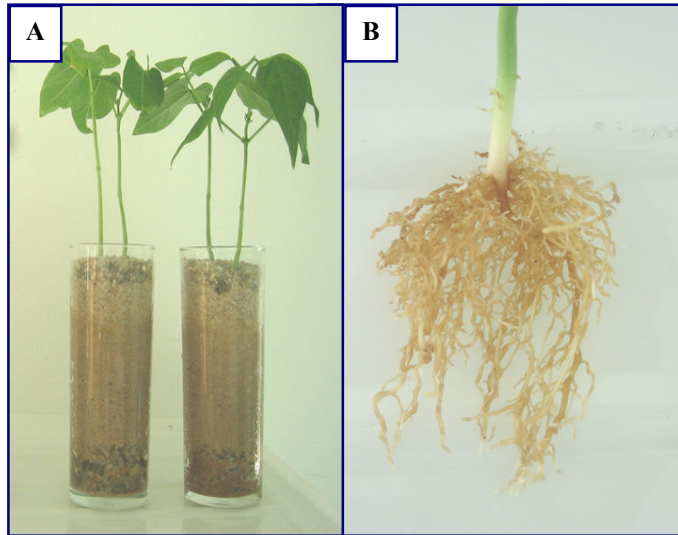
**Figura 3.3.** Plantas de *P. vulgaris* cv. BBL sembradas en sistemas de macetas de arena de cuarzo estéril.

Se determinaron cuatro parámetros en cada ensayo: PSPA (peso seco de parte aérea, estimado en mg/planta), N° NOD (número de nódulos/planta), PSR (peso seco de raíz, estimado en mg/planta) y PUNOD (peso seco unitario de nódulo, estimado en mg/nódulo). Para el tratamiento informático de los datos se utilizó el programa Statistix 8.0, con un análisis ANOVA de la desviación estándar ( $P < 0,05$ ). Los grupos significativamente diferentes para cada columna se identifican con las letras a, b, c y d junto a cada valor. Los grupos significativamente diferentes para cada cepa se identifican con las letras A, B y C junto a cada valor, englobando los tratamientos simples y dobles, en condición control y de estrés salino.

### 3.8.7. Ensayos de cinética de nodulación.

Los ensayos de cinética de nodulación se realizaron de forma similar al protocolo descrito para el apartado anterior. El soporte empleado fue distinto, puesto que se emplearon vasos de cristal de 8 x 20 cm, rellenos igualmente de arena de cuarzo estéril. Se depositaron dos semillas por sistema, con tres repeticiones por tiempo de observación y condición de estudio, y se regaron con 50 mL de solución Rigaud & Puppo (control, 0 mM de NaCl, o salina, 25 mM de NaCl) cada tres días.

Así, se desmontaron tres recipientes por condición y día de recuento (días 5, 7, 9, 11, 15, 18, 22 y 28 tras la inoculación) cuantificando los nódulos y comparando los resultados obtenidos entre las dos condiciones de ensayo. Los resultados se representaron gráficamente, correspondiendo las barras de error a la desviación estándar de las tres repeticiones. La figura 3.4. muestra el sistema empleado en los ensayos de cinética nodulación.



**Figura 3.4.** Sistemas empleados en los ensayos de cinética de nodulación. Panel **A**, plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa y panel **B**, raíz nodulada de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa.

**RESULTADOS**



#### **4.1. Efecto del estrés salino sobre el microsimbionte.**

- 4.1.1. Efecto del estrés salino sobre cepas que nodulan plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*.
- 4.1.2. Efecto del estrés salino sobre cepas de *Rhizobium* que nodulan plantas de *P. vulgaris*.
- 4.1.3. Efecto del estrés salino sobre *R. tropici* CIAT899.
- 4.1.4. Estudio comparativo de los efectos inducidos por el estrés salino-osmótico sobre la biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899.
- 4.1.5. Estudios preliminares de la influencia del estrés salino en la regulación de la biosíntesis de factores Nod de *R. tropici* CIAT899.

## **ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS 4.1.**

	<b>Página</b>
4.1. Tolerancia al estrés salino de cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> .....	85
4.2. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> , bajo condiciones de crecimiento control.....	86
4.3. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> , bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	87
4.4. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> , bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	91
4.5. Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 crecida en medio mínimo B <sup>-</sup> bajo condiciones control y de estrés salino.....	93
4.6. Actividad β-galactosidasa de <i>R. tropici</i> RSP3051 crecida en medio mínimo B <sup>-</sup> control y de estrés salino.....	95
4.7. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	98
4.8. Cromatogramas de HPLC de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899 obtenidos en condiciones de crecimiento control y de estrés salino, inducidos por apigenina 1 μM...	101
4.9. Cromatogramas de HPLC de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899 obtenidos en condiciones de crecimiento control y de estrés salino, en ausencia y presencia de apigenina 1 μM.....	102
4.10. Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 crecida en medio mínimo B <sup>-</sup> bajo condiciones control y de estrés osmótico.....	107
4.11. Efecto del estrés osmótico sobre la expresión de los genes de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899, bajo condiciones de crecimiento control y de estrés osmótico.....	110
4.12. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899, bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino por Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , KCl y NaCl....	112
4.13. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP900 pCV3804, pCV38 y pCV61, bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	115
4.14. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por las cepas <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP82, bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino.....	117

## **ÍNDICE DE TABLAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS 4.1.**

IV.1. Parámetros de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl).....	94
IV.2. Factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl), inducido por apigenina 1 μM...	297
IV.3. Factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl), en ausencia de apigenina.....	299



## 4.1. Efecto del estrés salino sobre el microsimbionte.

La familia de las leguminosas (*Fabaceae*) establece simbiosis con el grupo bacteriano conocido como “rizobios”, cuyo inicio viene determinado por un complejo diálogo molecular entre ambas partes. Las raíces de las leguminosas liberan diferentes compuestos, entre ellos flavonoides, que inducen la expresión de los genes de nodulación bacterianos (genes *nod*), que codifican proteínas implicadas en la síntesis y secreción de los factores de nodulación (factores Nod). Todos los factores Nod descritos hasta la fecha constan de un esqueleto común de 2-6 unidades de *N*-acetilglucosamina, sobre el que se disponen varios sustituyentes, variables en función de la especie bacteriana, que confieren la especificidad de hospedador inherente al proceso de nodulación. Estos factores Nod producen diversas respuestas en el metabolismo vegetal, conduciendo finalmente a la invasión bacteriana y la formación del nódulo (Perret *et al.*, 2000).

Sin embargo, factores bióticos y abióticos, como la elevada salinidad del entorno, pueden alterar diversos parámetros críticos tanto de la leguminosa como del rizobio (ver Introducción, apartado 1.5.). Estos cambios pueden comprometer la eficacia del diálogo molecular entre ambos, alterándose consiguientemente el desarrollo de la simbiosis. Por esta razón, constituiría una ventaja el hecho de poder seleccionar y utilizar bacterias tolerantes a la sal como inoculantes comerciales, cuyos parámetros claves en el proceso de interacción con su hospedador no se viesen fuertemente afectados por este estrés. De esta forma, se podrían optimizar, en la medida de lo posible, aquellas simbiosis influidas negativamente por el entorno salino en el que se desarrollan, incluso llegando a anular los efectos negativos inducidos por la sal (Zahran, 1999).

### 4.1.1. Efecto del estrés salino sobre cepas que nodulan plantas de *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max*.

El proceso simbiótico anteriormente citado entre los rizobios y las leguminosas beneficia eficazmente a estas últimas debido al aporte extra de nitrógeno que obtienen de la simbiosis. Por este hecho, se indica que las fabáceas es la familia de plantas con mayor aporte proteico del reino vegetal y están consideradas de gran importancia en la

agricultura y alimentación mundial. De entre todas las leguminosas cabe destacar el papel estratégico del cultivo de dos especies: *Phaseolus vulgaris* (judía), cultivada en numerosos países donde constituye el principal aporte de proteínas en la dieta humana (p. ej. México), y *Glycine max* (soja), reconocida como la leguminosa de mayor contenido proteico, la cual abarca el 69% del consumo mundial de proteínas (SoyStats American Soybean Association, <http://www.soystats.com/2004>) (ver Introducción, apartado 1.2.3.).

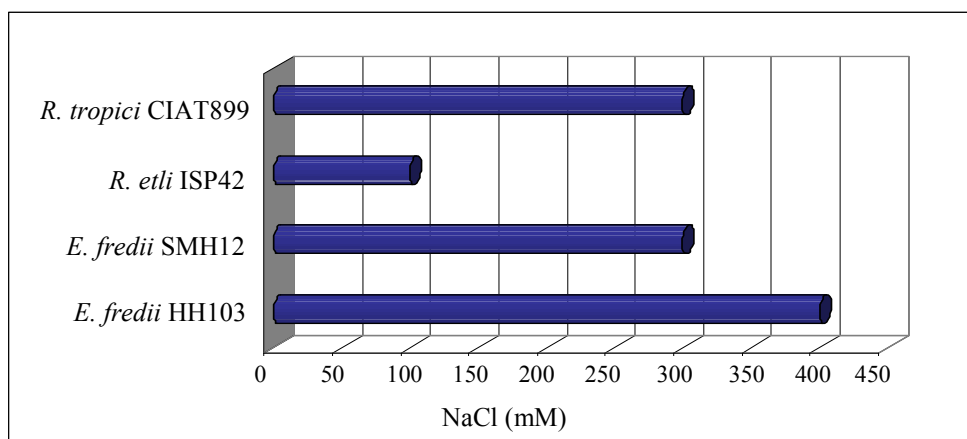
Teniendo en cuenta estas premisas, procedimos a restringir el estudio del efecto del estrés salino sobre cepas de rizobio que nodulan preferentemente plantas de judía y soja.

#### **4.1.1.1. Estudio de la tolerancia al estrés salino de cepas que nodulan *P. vulgaris* y *G. max*.**

Con el fin de determinar la influencia que el estrés salino produce en el crecimiento de cepas que nodulan judía y soja, en primer lugar se realizaron estudios de tolerancia del microsimbionte a la sal común (NaCl). En este sentido, se eligieron inicialmente dos estirpes que nodulan *P. vulgaris*, *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* ISP42, y dos que nodulan *G. max*, *E. fredii* SMH12 y HH103 (ver Discusión, apartado 5.1.) (Hungria *et al.*, 2003; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003; Buendía-Clavería *et al.*, 1989). La tolerancia de dichas bacterias a la sal se determinó estudiando el crecimiento de las mismas en el medio mínimo líquido B<sup>-</sup>, adicionado de las correspondientes concentraciones de sal: 0, 50, 100, 200, 300, 350 y 400 mM de NaCl.

El seguimiento del crecimiento se llevo a cabo durante 5 días, realizando medidas de D.O.<sub>600nm</sub> cada 6 horas, tal y como se describe en apartado 3.3.3. de Material y Métodos. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.1., donde puede observarse como la respuesta de los rizobios seleccionados frente al estrés salino fue muy variable. *R. etli* ISP42 no toleró más de 100 mM de sal ( $1,5 \times 10^7$  UFC/mL frente a  $3,6 \times 10^8$  UFC/mL en condición control, ambas en estado estacionario), mientras que *E. fredii* SMH12 y *R. tropici* CIAT899 alcanzaron el valor de 300 mM ( $6,1 \times 10^8$  UFC/mL frente a  $4,5 \times 10^8$  UFC/mL en condición control para SMH12, y  $4,8 \times 10^8$  UFC/mL frente a  $5,1 \times 10^8$  UFC/mL en condición control para CIAT899, todas en estado estacionario). *E. fredii* HH103 la única capaz de crecer en 400 mM de NaCl ( $5,2 \times 10^7$  UFC/mL frente

a  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL en condición control, ambas igualmente en estado estacionario). En base a los resultados obtenidos podemos concluir que las cepas que presentan el mayor rango de tolerancia al estrés por sal son *R. tropici* CIAT899 para simbiote de judía y *E. fredii* HH103 para soja, tolerando ambas una concentración de NaCl del medio de cultivo de 300 y 400 mM respectivamente. De este modo, podrían ser consideradas como candidatos óptimos para un futuro desarrollo industrial de inoculantes tolerantes a la salinidad de *P. vulgaris* y *G. max*.



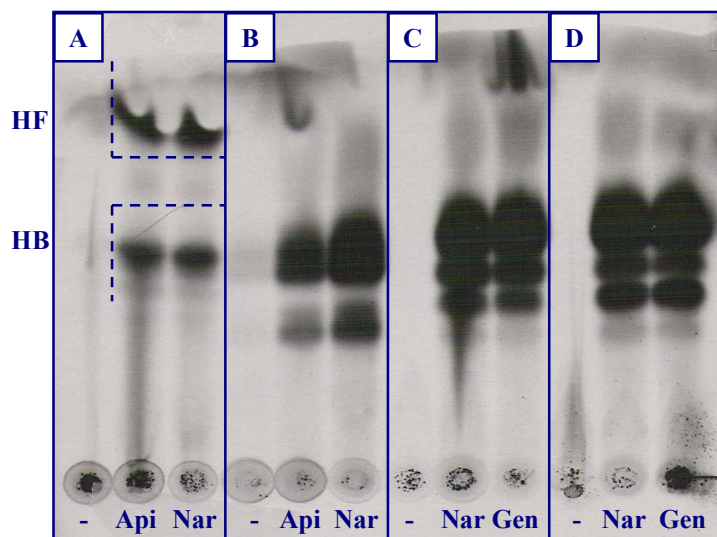
**Figura 4.1.** Tolerancia al estrés salino de cepas que nodulan *P. vulgaris* y *G. max*.

#### 4.1.1.2. Efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de los factores Nod de los rizobios que nodulan *P. vulgaris* y *G. max*.

Bajo condiciones de estrés abiótico, las bacterias sufren cambios metabólicos que permiten una adaptación final al nuevo entorno existente o, por el contrario, conducen a la muerte celular. Algunas de estas modificaciones, de tan variada naturaleza, han sido ampliamente descritas en rizobios, como por ejemplo alteraciones en el perfil de moléculas de superficie (p. ej. LPS y KPS), de rutas metabólicas (p. ej. síntesis de osmolitos), de transportadores de membrana (p. ej. sistema de secreción tipo III). En ocasiones, estos cambios son trascendentales para el adecuado establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa pudiéndose ver tanto optimizada como inhibida o incluso impedida. Por ello, moléculas cruciales en el diálogo rizobio-leguminosa, como es el caso de los factores Nod, deberían seguir siendo igualmente efectivas en condiciones de estrés que bajo condiciones no estresantes.

Para verificar si el estrés salino provoca algún tipo de modificación en los factores Nod de las cepas seleccionadas que nodulan *P. vulgaris* y *G. max*, se estudió en primer

lugar los perfiles de los factores Nod de cada una de ellas en condiciones de crecimiento control (ver Material y Métodos, apartados 3.3.1. y 3.6.1.), recogidos en la figura 4.2.. Las bacterias fueron crecidas tanto en presencia de sus inductores correspondientes, detallados en el pie de figura, como en ausencia de los mismos (carriles con signo negativo).



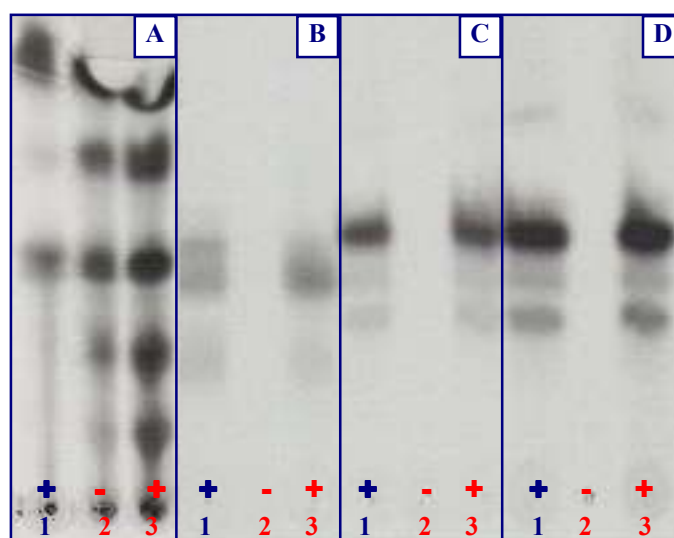
**Figura 4.2.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan *P. vulgaris* y *G. max*, bajo condiciones de crecimiento control. Panel **A.**- *R. tropici* CIAT899; panel **B.**- *R. etli* ISP42; panel **C.**- *E. fredii* SMH12 y panel **D.**- *E. fredii* HH103. Los inductores empleados fueron apigenina (Api), naringenina (Nar) y genisteína (Gen), todos ellos a una concentración final de 1  $\mu$ M. Los carriles con signo negativo (-) indican ausencia del mismo. La denominación “HF” engloba los factores Nod hidrofílicos y “HB” los hidrofóbicos.

Como se observa, cada una de las cepas estudiadas presenta un perfil cromatográfico específico, a excepción de las dos estirpes *E. fredii* HH103 (panel D) y SMH12 (panel C), cuyos perfiles son semejantes debido a la gran similitud estructural de su factores Nod (Gil-Serrano *et al.*, 1997; A.M. Gil-Serrano, comunicación personal). Los factores de nodulación sintetizados por *R. tropici* CIAT899 (panel A) se agrupan en dos conjuntos cromatográficamente distintos. El primer grupo comprende factores Nod de naturaleza hidrofílica (HF), correspondientes a la banda más elevada en la placa cromatográfica (Folch-Mallol *et al.*, 1996), que por sus abundantes radicales hidrofílicos (p. ej. grupos sulfato) se movilizan fácilmente junto con el frente del solvente. El segundo grupo engloba factores más hidrofóbicos (HB), situados desde la parte media de la placa hacia la zona de aplicación de la muestra. Por último, identificamos los factores Nod sintetizados por *R. etli* ISP42 (panel B) que se agrupan

en una zona media-baja de la placa cromatográfica como corresponde a su carácter más hidrofóbico.

Una vez observado los perfiles cromatográficos de cada una de las cepas objeto de estudio, se procedió a analizar el efecto que el estrés salino pueda ejercer sobre la producción de los factores Nod. De este modo, cada una de las estirpes se crecieron en las condiciones de estrés salino máximas que pueden tolerar (*R. tropici* CIAT899, 300 mM de NaCl; *R. etli* ISP42, 100 mM de NaCl; *E. fredii* SMH12, 300 mM NaCl y *E. fredii* HH103, 400 mM NaCl, ver figura 4.1.) y, posteriormente, se analizó el perfil cromatográfico de sus respectivos factores Nod comparándolos siempre con los sintetizados en condiciones de crecimiento control.

El ensayo se llevó a cabo tanto en ausencia como en presencia del inductor específico de cada una de las cepas usadas, eligiendo en esta ocasión un único inductor por estirpe bacteriana ensayada, puesto que el perfil cromatográfico de los factores Nod de las mismas no varió en función del inductor utilizado (ver figura 4.2.). Así, se eligió apigenina para *R. tropici* CIAT899, naringenina para *R. etli* ISP42 y genisteína para *E. fredii* SMH12 y HH103, a la concentración final de 1  $\mu$ M.



**Figura 4.3.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan *P. vulgaris* y *G. max*, en condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl, indicado en azul) y de estrés salino (100 mM de NaCl para *R. etli* ISP42, 300 mM para *R. tropici* CIAT899 y *E. fredii* SMH12 y 400 mM para *E. fredii* HH103, indicado en rojo). Panel **A**.- *R. tropici* CIAT899, panel **B**.- *R. etli* ISP42, panel **C**.- *E. fredii* SMH12 y panel **D**.- *E. fredii* HH103. Los carriles con signo negativo (-) indican ausencia de inductor, los positivos (+) la presencia del mismo (apigenina para *R. tropici* CIAT899, naringenina para *R. etli* ISP42 y genisteína para *E. fredii* SMH12 y HH103), a la concentración final de 1  $\mu$ M.

Como se puede apreciar en la figura 4.3., no se observan diferencias significativas para las cepas *R. etli* ISP42, *E. fredii* SMH12 y HH103, cuyo perfil de factores Nod sintetizados en condiciones de estrés salino (carriles 3) no difiere significativamente del perfil de los sintetizados en condiciones control (carriles 1). En los cultivos salinos de estas cepas donde no se añadió inductor (carriles 2) no se observó ninguna banda específica.

Por el contrario, *R. tropici* CIAT899 presentó cambios cuali y cuantitativos importantes en las condiciones de estrés salino estudiadas. Se puede observar claramente como en el carril 3, correspondiente a la condición de estrés salino 300 mM de NaCl inducida con apigenina 1  $\mu$ M, se registró un mayor número de bandas con respecto a la condición control inducida (carril 1). Este incremento en el número de bandas se puede relacionar *a priori* con un aumento del número de factores Nod diferentes sintetizados por la bacteria, ya que aparecen nuevas bandas de naturaleza más hidrofóbica (bandas en la parte inferior del cromatograma) y moderadamente hidrofílica (banda situada entre las dos que se registran en la condición control). Asimismo, hemos de destacar que la mayoría de estas nuevas bandas se registraron con una alta intensidad del marcaje radiactivo, comparado siempre con la condición control (carril 1), lo cual nos puede indicar un aumento en la cantidad de factores Nod sintetizados y liberados, hecho que también se registró en el resto de bandas comunes a la condición control.

En base a los datos obtenidos, podemos indicar que, efectivamente, el estrés salino modifica la pauta de biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899, al igual que, tal y como habíamos adelantado, otros tipos de estrés abiótico modifican la estructura y funcionalidad de moléculas cruciales en la simbiosis rizobio-leguminosa.

En la figura 4.3. (carril 2) se mostró síntesis de factores Nod en ausencia de flavonoide y presencia de 300 mM de NaCl por *R. tropici* CIAT899, a diferencia de lo sucedido con las otras cepas estudiadas, las cuales no sintetizaron factores Nod en ausencia de flavonoide, independientemente de las condiciones del medio. De este modo, se describe por primera vez para la cepa *R. tropici* CIAT899 la producción de factores Nod bajo condiciones de estrés salino sin necesidad de la intervención del flavonoide. Analizando el perfil de dichos factores Nod, se observan bandas comunes a la condición control de síntesis (carril 1), lo cual nos indica en un principio que se sintetizan los mismos grupos de factores Nod en ambas condiciones. Sin embargo, también se registran otras bandas no presentes en la condición control (carril 1), y sí en la condición de estrés salino inducida por flavonoide (carril 3), aunque en menor

intensidad. Por lo tanto, podemos confirmar finalmente que, tomando como referencia las técnicas de marcaje radiactivo específico de los factores Nod, el estrés salino modifica cuali y cuantitativamente el perfil de factores Nod biosintetizados por la cepa nodulante de judía *R. tropici* CIAT899, y sintetiza factores Nod en ausencia de inducción por flavonoide.

#### **4.1.2. Efecto del estrés salino sobre cepas de *Rhizobium* que nodulan plantas de *P. vulgaris*.**

Como se indicó previamente, el estrés salino es reconocido como uno de los perjuicios mayores a nivel mundial para el desarrollo de una agricultura fructífera y provechosa (Yamaguchi & Blumwald, 2005; Rengasamy, 2006). Los estudios desarrollados en el apartado anterior confirmaron que el estrés salino modifica parámetros básicos para el adecuado establecimiento y desarrollo de la interacción entre la leguminosa y sus simbioses. Sin embargo, estas modificaciones no fueron análogas para las cepas que nodulan judía y soja puesto que, combinando los estudios de tolerancia frente a la sal y síntesis de factores Nod, sólo se registraron cambios significativos en una cepa nodulante de judía *R. tropici* CIAT899 (ver figura 4.3.).

Por esta razón, se amplió el mismo estudio a otras cepas que nodulan *P. vulgaris*, consideradas estirpes representativas, con el fin de comprobar si se trata de un efecto generalizado a los rizobios que nodulan judía o, por el contrario, estamos ante un fenómeno exclusivo de ciertos géneros o especies. Para ello, se seleccionaron las especies aisladas de forma natural de nódulos de *P. vulgaris* (Martínez-Romero, 2003). En concreto utilizamos las siguientes cepas: *R. etli* CFN42, *R. gallicum* bv. gallicum R602 y bv. phaseoli PhD12, *R. giardinii* bv. giardinii H152 y bv. phaseoli Ro84, *R. leguminosarum* bv. phaseoli TAL1121 y *R. tropici* CFN299 y CIAT899.

##### **4.1.2.1. Estudios de tolerancia al estrés salino de cepas de *Rhizobium* que nodulan *P. vulgaris*.**

Para caracterizar el efecto del estrés salino sobre las cepas detalladas anteriormente, se determinaron primeramente las condiciones salinas extremas de crecimiento de las cepas indicadas mediante estudios de tolerancia a la sal según la

metodología descrita en el apartado 4.1.1.1.. Los resultados obtenidos mostraron nuevamente una gran variabilidad de la respuesta al estrés salino por parte de las estirpes seleccionadas, puesto que *R. giardinii* bv. *giardinii* H152 y bv. *phaseoli* Ro84, *R. gallicum* bv. *phaseoli* PhD12 y *R. tropici* CFN299 y CIAT899 fueron capaces de crecer bajo condiciones de estrés salino 300 mM de NaCl, mientras que *R. gallicum* bv. *gallicum* R602 sólo registró crecimiento hasta 200 mM, y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* TAL1121 y *R. etli* CFN42 no pudieron superar el valor de 100 mM. De este modo podemos concluir que los rizobios que nodulan judía incluidos en este estudio no muestran una tolerancia uniforme frente a la sal. Sin embargo, desconocemos si pueden modificarse o no otros parámetros característicos y cruciales de la fisiología de los rizobios en cuestión, como es el caso de la biosíntesis de los factores Nod.

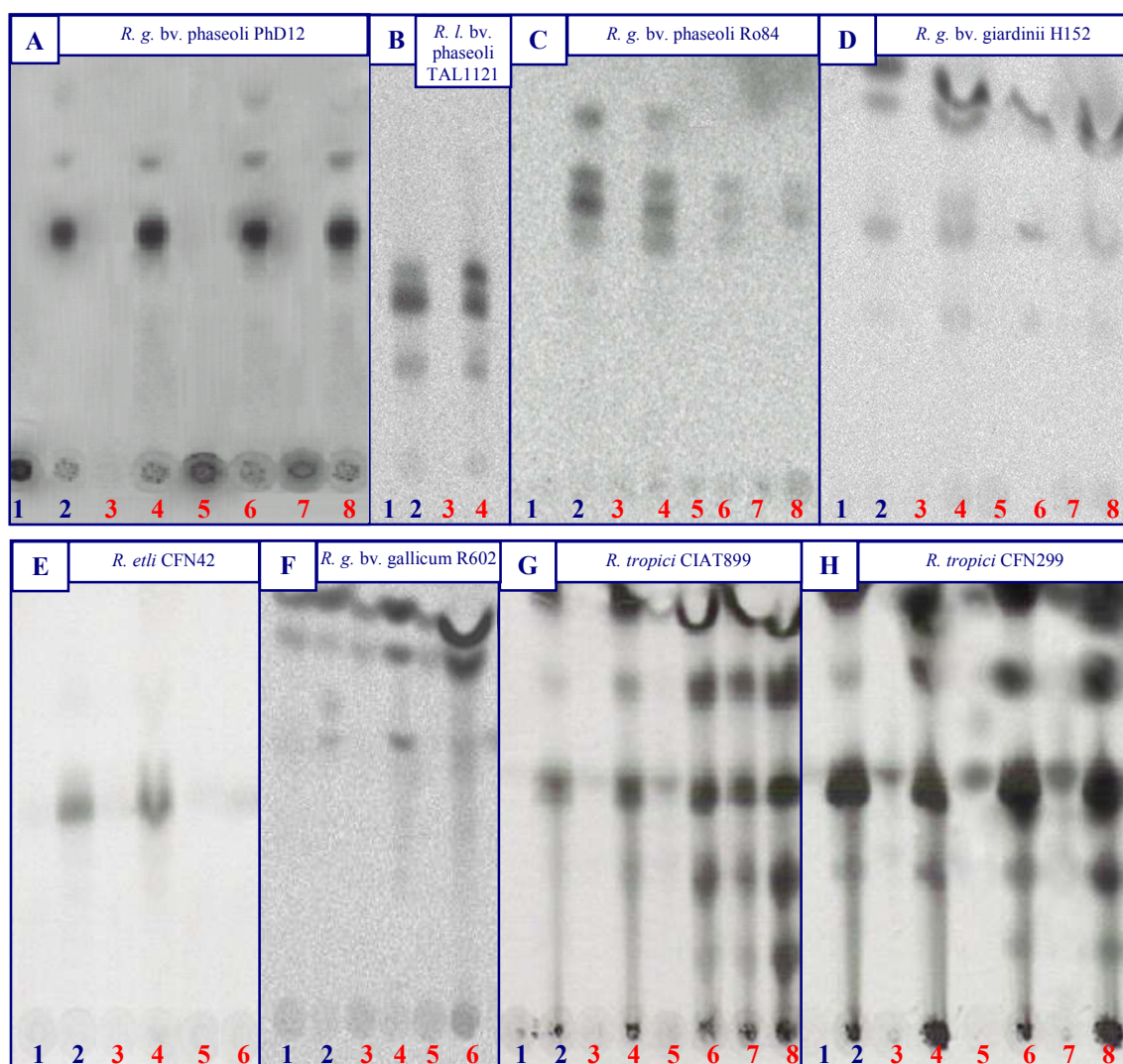
#### **4.1.2.2. Efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de los factores Nod de cepas de *Rhizobium* que nodulan *P. vulgaris*.**

Una vez establecidos los extremos de tolerancia a la sal de las cepas que nodulan judía anteriormente seleccionadas, se estudió el efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de sus factores Nod, para poder confirmar si se producen o no cambios en su perfil de forma generalizada, como un fenómeno de adaptación a las situaciones ambientales adversas.

La figura 4.4. muestra los perfiles de los factores Nod de las cepas seleccionadas que nodulan judía en condiciones de crecimiento control y de estrés salino, en ausencia y presencia de su inductor correspondiente. Se pueden distinguir tres fenómenos notablemente distintos entre sí, en función de las modificaciones que puedan sufrir los perfiles de los factores Nod de cada una de las cepas estudiadas.

En primer lugar podemos caracterizar un conjunto de cepas, heterogéneo en cuanto a su especie, que no ve modificado en modo alguno el perfil de sus factores Nod por acción de la concentración salina del medio. Se trata de las estirpes *R. gallicum* bv. *phaseoli* PhD12 (panel A) y *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* TAL1121 (panel B), cuyos perfiles de factores Nod sintetizados en sus correspondientes condiciones extremas de estrés salino (carriles pares, numeración roja) fueron semejantes a los registrados en la condición control (carril 2, numeración azul). En los ensayos no inducidos de estas cepas (ausencia de inductor, carriles impares) no se registró señal radiactiva específica alguna.





**Figura 4.4.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan *P. vulgaris*, en condiciones de crecimiento control (carriles 1 y 2) y de estrés salino (carriles 3 y 4, 100 mM de NaCl; carriles 5 y 6, 200 mM de NaCl y carriles 7 y 8, 300 mM de NaCl). Panel **A.**- *R. gallicum* bv. phaseoli PhD12, panel **B.**- *R. leguminosarum* bv. phaseoli TAL1121, panel **C.**- *R. giardinii* bv. phaseoli Ro84, panel **D.**- *R. giardinii* bv. giardinii H152, panel **E.**- *R. etli* CFN42, panel **F.**- *R. gallicum* bv. gallicum R602, panel **G.**- *R. tropici* CIAT899 y panel **H.**- *R. tropici* CFN299. Las estirpes fueron inducidas (carriles pares) con 1  $\mu$ M de apigenina (CIAT899), naringenina (H152, PhD12 y CFN299) o genisteína (Ro84, R602, CFN42 y TAL1121).

En segundo lugar englobamos a las cepas *R. giardinii* bv. phaseoli Ro84 (panel C), *R. giardinii* bv. giardinii H152 (panel D) y *R. etli* CFN42 (panel E), quienes, al contrario que el grupo anterior, si vieron afectada la producción de sus factores Nod, cuya cantidad disminuye de forma directamente proporcional a la concentración salina del medio (carriles pares, numeración roja) con respecto a la condición control (carril 2). Este fenómeno siempre se registra en las condiciones de crecimiento inducidas por cada uno de los flavonoides específicos previamente indicados, mientras que en las

condiciones de ausencia de los mismos (carriles impares) no se detectó ningún tipo de señal radiactiva.

En tercer y último lugar cabe destacar el grupo de cepas formado por *R. gallicum* bv. *gallicum* R602 (panel F) y por *R. tropici* CIAT899 y CFN299 (paneles G y H respectivamente), cuyos perfiles de factores de nodulación registraron dos cambios notables, ya descritos para CIAT899 en el apartado 4.1.1.2.: incremento en la biosíntesis de factores Nod (posiblemente en número y naturaleza) en las condiciones inducidas por flavonoide, y existencia de factores en las no inducidas en presencia del estrés salino (carriles impares, numeración roja).

De los resultados expuestos, podemos finalmente considerar el estrés por sal como un tipo de estrés ambiental que podría modificar no sólo el crecimiento de los rizobios en estudio sino también la producción de sus factores Nod, la cual se ve aumentada o disminuida en función de la especie.

#### **4.1.3. Efecto del estrés salino sobre *R. tropici* CIAT899.**

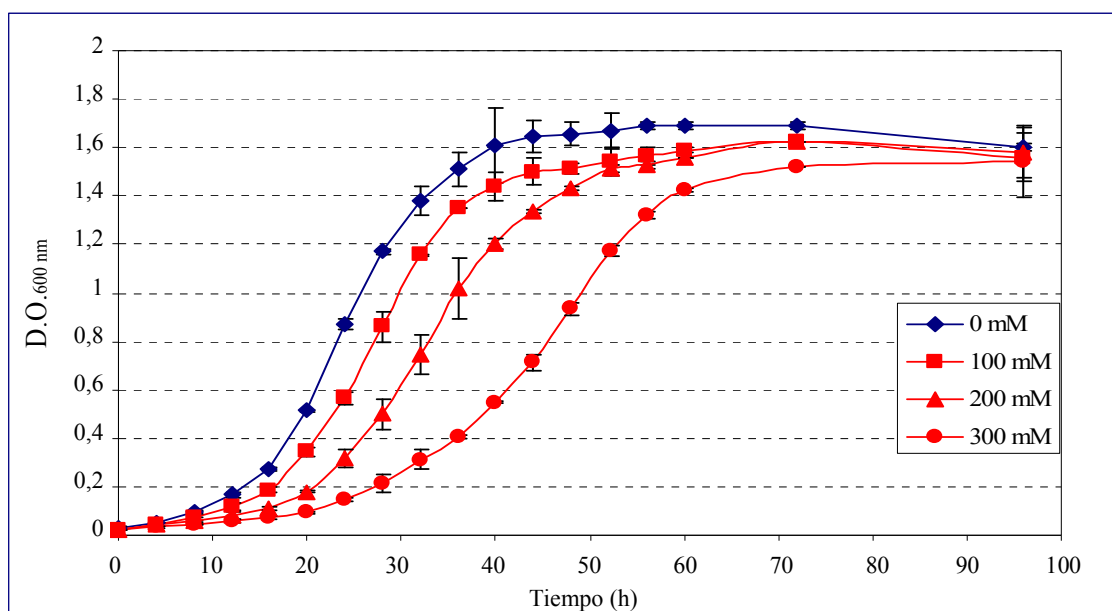
*R. tropici* CIAT899 está considerada como una cepa altamente tolerante a diversos tipos de estrés abiótico (Graham *et al.*, 1994; Ricillo *et al.*, 2000; Nogales *et al.*, 2002), además de haber demostrado ser un buen inoculante bajo dichas condiciones en distintas áreas de experimentación (Vlassak *et al.*, 1996; Morón *et al.*, 2005). Por lo tanto, la combinación de los estudios previamente descritos, su alta tolerancia a diversos tipos de estrés y la amplia experiencia de nuestro grupo de trabajo para con esta estirpe, orientaron la elección de *R. tropici* CIAT899 como la cepa modelo para los posteriores estudios del efecto del estrés salino en los estadios iniciales de la simbiosis rizobio-judía.

##### **4.1.3.1. Efecto del estrés salino sobre el crecimiento de *R. tropici* CIAT899.**

En el apartado 4.1.2.1., donde se desarrollaron los estudios de tolerancia al estrés salino de las cepas de *Rhizobium* que nodulan *P. vulgaris*, se estableció como concentración salina extrema de crecimiento para *R. tropici* CIAT899 el valor de 300 mM de NaCl. Sin embargo, y puesto que se definió dicha cepa como nuestro organismo modelo de trabajo, se abordó nuevamente este estudio de una forma más completa. Se incluyeron concentraciones intermedias como nuevas condiciones de ensayo de

tolerancia a la salinidad (100 y 200 mM de NaCl) y se realizó el estudio del crecimiento de la cepa analizando tanto la viabilidad celular como la biomasa del cultivo. Una vez definidas las condiciones de estudio, se procedió a realizar las correspondientes curvas de tolerancia al estrés salino en medio mínimo B<sup>-</sup>, siguiendo la metodología anteriormente descrita en el apartado 4.1.1.1..

En la figura 4.5. se puede observar un retraso de la tasa de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 directamente proporcional al aumento de concentración salina del medio. El tiempo de generación bajo condiciones de crecimiento control aumentó de 5 horas 30 minutos a 6, 7 y 10 horas en las condiciones de estrés salino 100, 200 y 300 mM de NaCl, respectivamente.



**Figura 4.5.** Curvas de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 crecida en medio mínimo B<sup>-</sup> bajo condiciones control y de estrés salino (100, 200 y 300 mM de NaCl). Los puntos de cada curva representan el valor de 6 ensayos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Sin embargo, debemos resaltar que, a pesar de aumentar su tiempo de generación, el crecimiento de *R. tropici* CIAT899 se equiparó en fase estacionaria para las cuatro condiciones.

Como cabe esperar, el segundo parámetro que se vio afectado como consecuencia del estrés salino fue el número de células viables, disminuyendo aproximadamente un 50% en D.O.<sub>600nm</sub> de 0,4 en cultivos crecidos a 300 mM de NaCl con respecto a la condición de crecimiento control, si bien estos valores volvieron a ser semejantes en D.O.<sub>600nm</sub> de 0,8 (tabla IV.1.).

**Tabla IV.1.** Parámetros de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl).

NaCl (mM)	UFC/mL (D.O. <sub>600nm</sub> )					Peso seco células (mg/mL)
	0,2	0,4	0,6	0,8	1,2	D.O. <sub>600nm</sub> = 1,2
0	6,4x10 <sup>7</sup>	1,6x10 <sup>8</sup>	1,9x10 <sup>8</sup>	4,1x10 <sup>8</sup>	6,4 x10 <sup>8</sup>	3
300	5,9x10 <sup>7</sup>	1,0x10 <sup>8</sup>	1,7x10 <sup>8</sup>	4,0x10 <sup>8</sup>	6,0 x10 <sup>8</sup>	5,5

Paralelamente, se registraron en estadíos estacionarios de la curva de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 los valores del peso seco del cultivo, en condiciones de crecimiento control y 300 mM de NaCl. Esos datos vienen recogidos en la tabla IV.1, donde podemos observar un incremento del 66% del peso seco en condiciones de estrés salino 300 mM de NaCl con respecto a la condición control, en valores estacionarios de D.O.<sub>600nm</sub>. Teniendo en cuenta los resultados presentados, podemos indicar que tanto la D.O.<sub>600nm</sub> como el número de células viables de *R. tropici* CIAT899 son equiparables en los cultivos control y salino, mientras que el peso seco de ambos difiere significativamente en función de la condición estudiada.

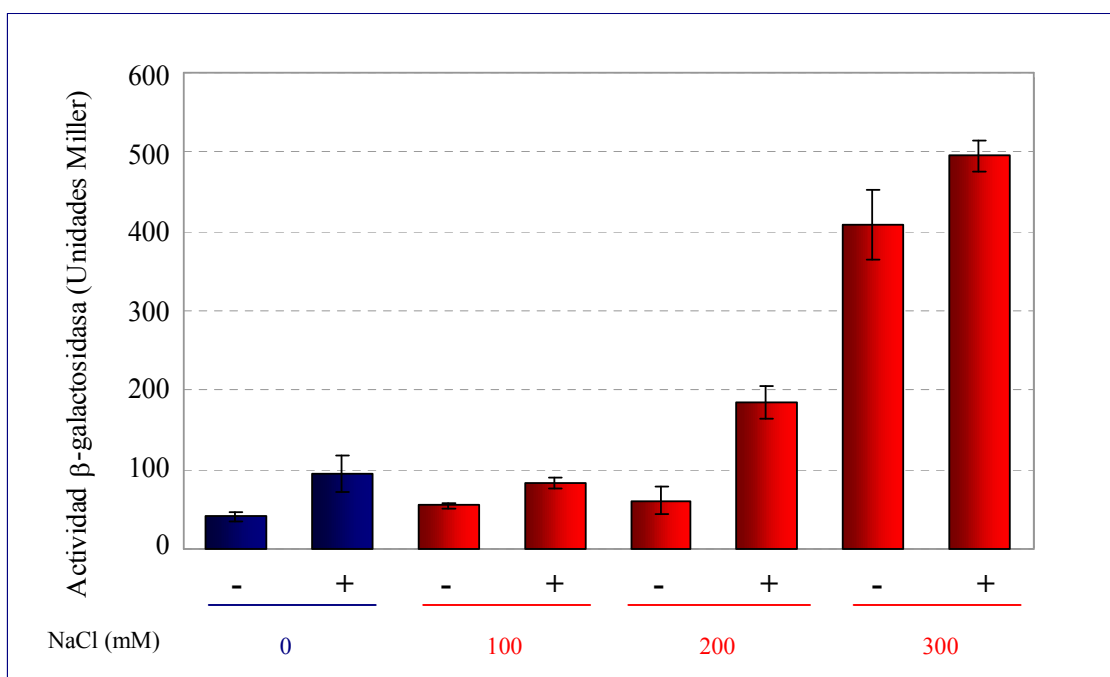
#### 4.1.3.2. Efecto del estrés salino sobre la expresión de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899.

Todo proceso de adaptación bacteriana a las variaciones del medio que las rodea ocasiona diversos cambios de la fisiología bacteriana, p. ej. en el perfil de expresión génica (Wankhade *et al.*, 1996). Los cambios de dicho perfil han sido estudiados en diferentes cepas bacterianas, puesto que pueden derivar bien en alteraciones metabólicas que reestructuren la fisiología bacteriana en función de las nuevas condiciones que las rodea, o por el contrario desemboquen en la muerte celular. En este sentido, el estrés salino ha sido descrito como un tipo de estrés abiótico inductor de alteraciones notables en perfiles de moléculas cruciales en la simbiosis rizobio-leguminosa, como son los lipopolisacáridos (Lloret *et al.*, 1998) o los canales y transportadores de membrana (Poolman *et al.*, 2004).

Basándonos en estas premisas, quisimos comprobar la existencia de algún tipo de correlación entre el aumento de la producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (ver figura 4.4., panel G, carriles con numeración roja) y los niveles de expresión de los genes *nod* que codifican para los mismos. Para ello, se recurrió a la técnica del análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, empleando una fusión

del gen informador *lacZ* con el gen de nodulación *nodP* del plásmido simbiótico de *R. tropici* CIAT899 (cepa *R. tropici* RSP3051, ver Material y Métodos, apartado 3.1.1.). De este modo, se midió la inducción de la actividad enzimática en respuesta al flavonoide apigenina, quien previamente mostró tener un efecto positivo sobre la biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 (ver figura 4.1.).

El ensayo se llevó a cabo en medio mínimo B<sup>-</sup>, adicionado o no del flavonoide a la concentración de 1  $\mu$ M, en las mismas condiciones establecidas para los estudios de tolerancia: 0, 100, 200 y 300 mM de NaCl. Las alícuotas del cultivo bacteriano empleadas en cada condición se recogieron cuando todas ellas alcanzaron una D.O.<sub>600nm</sub> de 0,6, asegurándonos de este modo que el número de células presentes en cada una estuviese dentro de un mismo orden ( $10^8$  UFC/mL, ver tabla IV.1.). De este modo se evitaron resultados erróneos debido a la sobrevaloración del número de células presente en la alícuota manipulada, puesto que la fórmula empleada para estimar las unidades Miller incluye el parámetro D.O.<sub>600nm</sub> del cultivo bacteriano manejado. Los datos de dicho ensayo se recogen en la figura 4.6..



**Figura 4.6.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *R. tropici* RSP3051 crecida en medio mínimo B<sup>-</sup> control y de estrés salino (100, 200 y 300 mM de NaCl). Los valores señalados con signo positivo (+) indican las condiciones inducidas con apigenina 1  $\mu$ M, los representados con signo negativo (-) carecen de inductor. Los datos se representan en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Se observó un notable incremento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, correlacionada con la expresión de los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899, directamente proporcional al aumento de la concentración de NaCl en el medio de cultivo.

Asimismo, es interesante destacar como los valores obtenidos en ausencia de inductor (indicados con signo negativo) también aumentan gradualmente hasta alcanzar niveles semejantes a los inducidos por apigenina (señalados con signo positivo), o incluso superarlos, tal y como ocurre en las condiciones 200 mM inducida (carril con signo positivo) y 300 mM no inducida (carril con signo negativo), donde los valores registrados en la segunda condición son mayores con respecto a los de la primera.

En función de los resultados obtenidos, podemos establecer una relación directamente proporcional entre la concentración salina del medio de crecimiento, la expresión de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899 y la biosíntesis y excreción de sus factores Nod. No obstante, se deberían realizar nuevos experimentos a nivel de transcripción que revelen el origen desencadenante de la expresión de los genes *nod* y la consecuente biosíntesis de factores Nod en ausencia de flavonoide, tal y como ya adelantamos en el apartado 4.1.2.2..

#### **4.1.3.3. Efecto del estrés salino sobre la biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899.**

En el apartado 4.1.1.2. se puso de manifiesto por primera vez el efecto inductor que la sal común ejerce sobre el proceso de biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899, al obtenerse un aumento de la misma directamente proporcional a la concentración salina del medio. También se destacó la producción de factores Nod en ausencia de flavonoide en el medio, como consecuencia del efecto inductor que la sal pueda ejercer sobre la expresión de los genes *nod*, corroborándose dicha hipótesis con los estudios de actividad  $\beta$ -galactosidasa descritos en el apartado 4.1.3.2..

De acuerdo con estos resultados, nos propusimos realizar un estudio sobre la cinética de producción de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 en condiciones de crecimiento control y de estrés salino. De este modo, se caracterizaron aquellos factores que son excretados gradualmente en el transcurso del tiempo, y se analizaron las posibles diferencias entre los perfiles de factores Nod sintetizados en función de las condiciones del medio de crecimiento de cada uno.

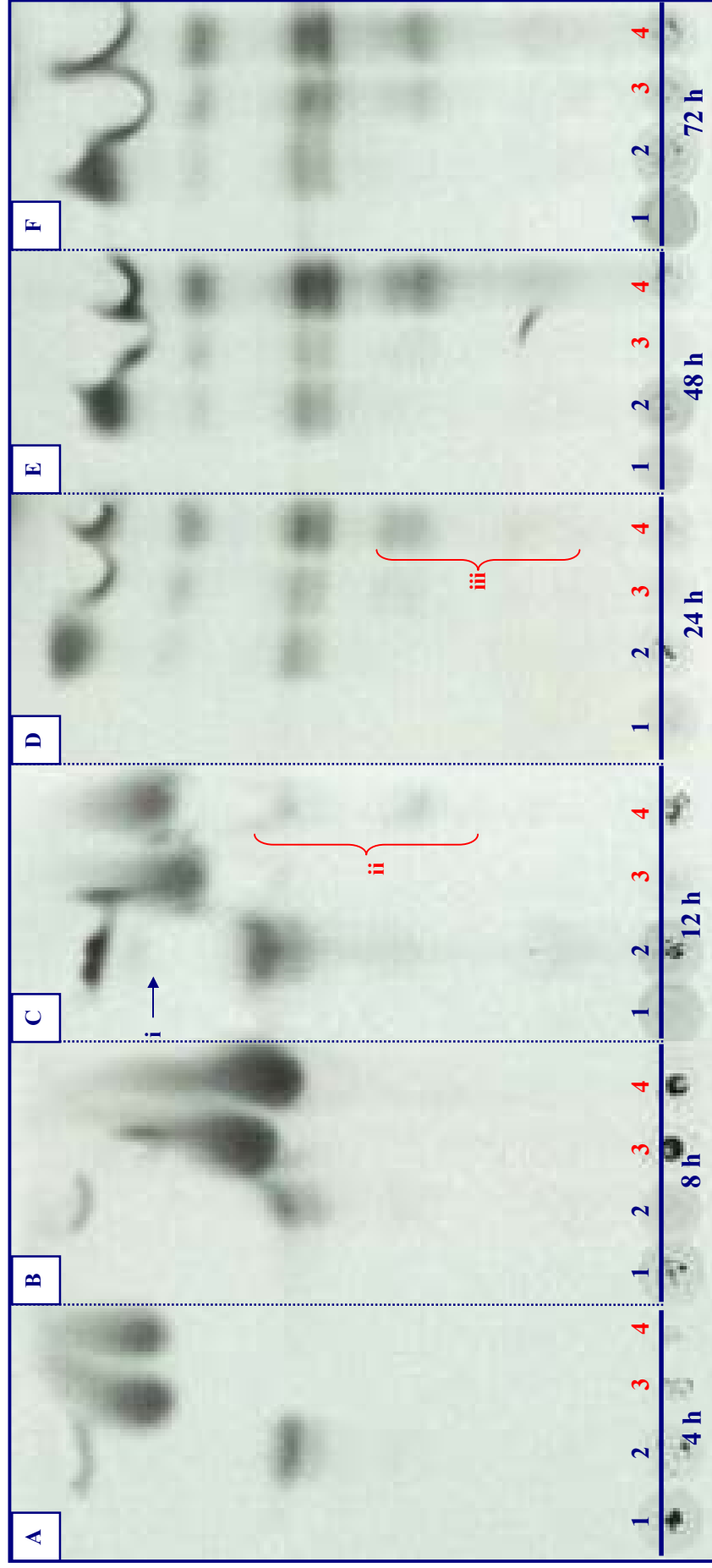
Para ello se cultivaron las bacterias durante distintos periodos de tiempo, en presencia o no de apigenina a la concentración de 1  $\mu$ M. Los datos de este ensayo se recogen en la figura 4.7., donde se muestran los perfiles cromatográficos de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 sintetizados en cada una de las condiciones anteriormente fijadas.

Como puede observarse en dicha figura, tras las primeras 4 horas de crecimiento del inóculo de *R. tropici* CIAT899 en condiciones control y presencia de apigenina 1  $\mu$ M (panel A, carril 2) se registró un perfil de factores Nod fragmentado en dos grupos claramente diferenciables por sus distintos coeficientes de migración, semejante al observado en la figura 4.2. (panel A, carriles “Api” y “Nar”), donde ya se describió en profundidad el perfil cromatográfico de *R. tropici* CIAT899. En ausencia de inductor (panel A, carril 1) no se registró ningún tipo de señal específica.

La señal radiactiva detectada en las condiciones de estrés salino (panel A, carriles 3 y 4), situada en la parte alta de la placa cromatográfica, no se correlaciona con ningún factor Nod descrito hasta la fecha, por lo que pueda tratarse bien de marca radiactiva D-<sup>14</sup>C-glucosamina libre que no ha sido incorporada por la célula para sintetizar factores Nod, y que ha migrado con la mezcla solvente al igual que las moléculas lipochitooligosacáridicas (ver Discusión, apartado 5.1.), o bien de artefactos que aparecen simplemente como resultado de las condiciones excesivamente artificiales del cultivo (Spaink, 2000).

El perfil que se registró a las 8 horas de crecimiento (panel B) fue similar al descrito durante las primeras 4 horas (panel A), si bien se observaron algunas diferencias. Una vez más, en las condiciones de crecimiento control (panel B, carril 2) se registró un perfil cromatográfico semejante al de 4 horas en presencia de apigenina (panel A, carril 2). Sin embargo, la banda intermedia correspondiente a los factores Nod de naturaleza mas hidrofóbica se subdivide en dos bandas, percepción que se volverá mas evidente en las futuras condiciones de estudio.

En este tiempo, los carriles 3 y 4, representantes de las condiciones de estrés salino, siguen sin mostrar bandas características de factores Nod. Simultáneamente, se puede observar marca radiactiva no incorporada, aunque esta vez, tanto en la condición adicionada de apigenina como no, la migración de dicha marca es menor lo cual podría ser causa de la aparición de nuevas moléculas con un carácter hidrofóbico mayor (carriles 3 y 4, panel B) (ver Discusión, apartado 5.1.).



**Figura 4.7.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en condiciones de crecimiento control (carriles 1 y 2, numeración azul) y de estrés salino (300 mM de NaCl, carriles 3 y 4, numeración roja). Se utilizó apigenina 1  $\mu$ M como inductor en los carriles pares. Los cultivos se tuvieron en agitación a 180 rpm, 28  $^{\circ}$ C, durante diversos intervalos de tiempo: 4 (A), 8 (B), 12 (C), 24 (D), 48 (E) y 72 (F) horas.



Tras 12 horas de crecimiento bacteriano (panel C), el perfil cromatográfico en condiciones de crecimiento control no sufrió grandes cambios comparados con las 8 horas previas (paneles A y B), a excepción de la aparición de una nueva y tenue banda justamente inferior a la banda sulfatada (banda i) en la condición inducida por apigenina (carril 2). Sin embargo, bajo condiciones de estrés salino, los cambios fueron más notorios puesto que en la condición inducida por apigenina (carril 4), se comenzaron a percibir dos nuevas bandas radiactivas de naturaleza levemente hidrofóbica (bandas ii), que se verán claramente definidas en las condiciones de estudio posteriores. Una de ellas migra aproximadamente a la altura del grupo de bandas relativamente hidrofóbicas que *R. tropici* CIAT899 sintetiza en condiciones control (altura media de la placa cromatográfica), mientras que la segunda es aún más hidrofóbica, ya que se encuentra cercana al punto de carga de la muestra. Este mismo perfil se registró también en la condición no inducida (carril 3), aunque la señal radiactiva fue muy tenue.

Los cambios que gradualmente han ido apareciendo tanto en la condición control como de estrés salino fueron mayores tras 24 h de crecimiento de la cepa (panel D). En la condición control en presencia de apigenina (carril 2) se registró el mismo perfil ya comentado en las 12 horas (panel C). La condición control sin apigenina añadida (carril 1) siguió sin registrar ningún tipo de señal radiactiva específica. En las condiciones de estrés salino (carriles 3 y 4) los perfiles observados fueron muy similares entre sí. Podemos destacar que comparten las mismas bandas que son sintetizadas en la condición control (panel D, carril 2), al mismo tiempo que se observan otras nuevas (bandas iii) revelando la posible síntesis de nuevos factores Nod de naturaleza variada que no se registran en la condición control (panel D, carril 2). Asimismo, la mayor intensidad de señales bajo estrés salino se observó en presencia de apigenina (panel D, carril 4).

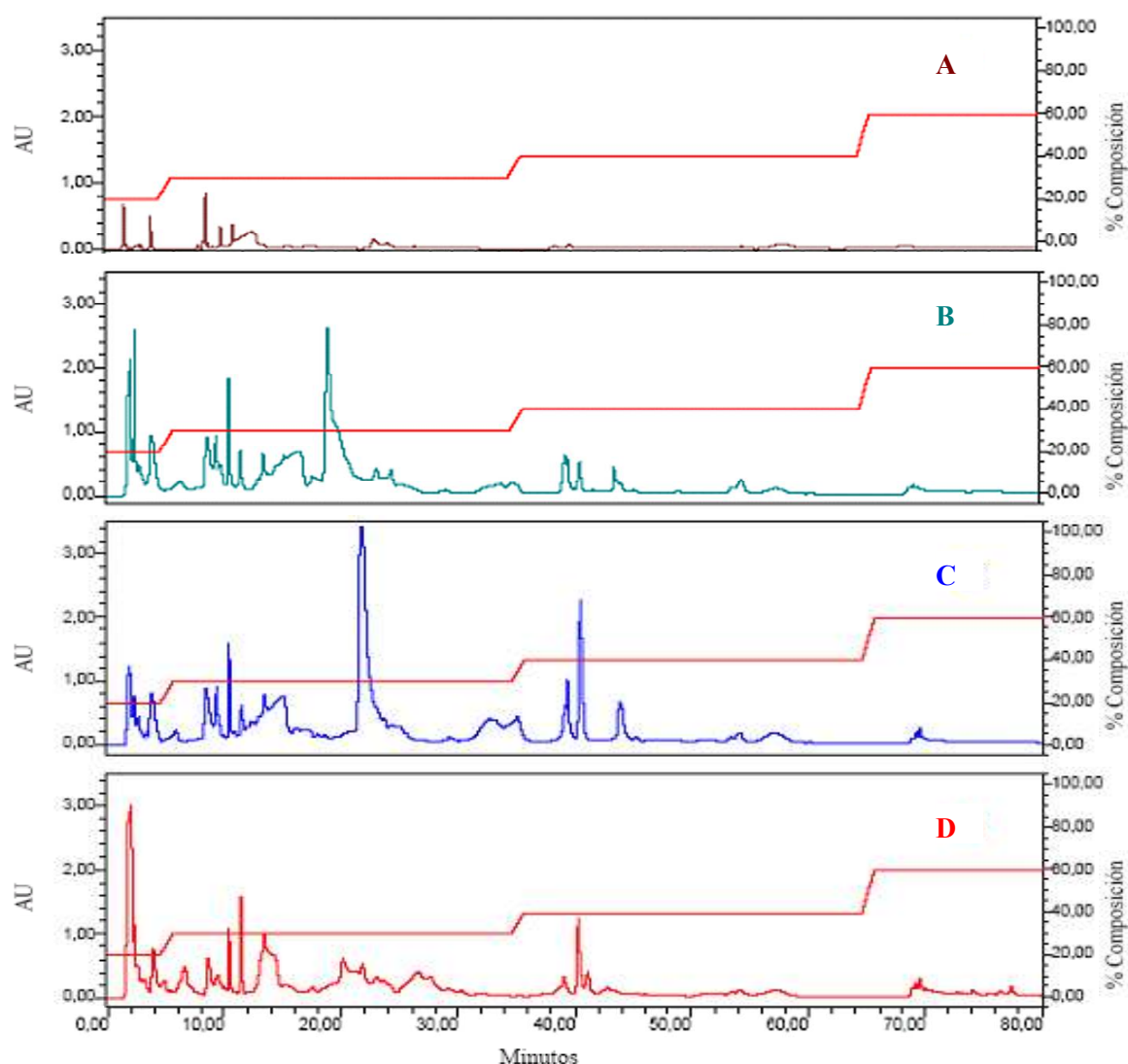
Después de 48 (panel E) y 72 (panel F) horas de crecimiento bacteriano, el perfil de producción de factores Nod fue similar al descrito en las 24 primeras horas (panel D), mostrando una posible saturación de la técnica de detección radiactiva. En base a estos resultados, podemos confirmar el aumento en la cantidad de factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 como consecuencia directa del estrés salino en el medio de crecimiento, tal y como habíamos adelantado en el apartado 4.1.2.2..

#### **4.1.3.4. Análisis por HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Resolución) y Espectrometría de Masas de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 sintetizados en condiciones de crecimiento control y de estrés salino.**

En el apartado 1.2.5. de la Introducción y 4.1.1.2. de los Resultados se subrayó la importancia de la especificidad estructural que caracteriza a los factores Nod, quienes serán reconocidos y ejercerán su acción en una determinada planta en función de los substituyentes del esqueleto molecular. Por ello, cambios en dicha estructura como los que hemos ido presentando en los apartados 4.1.1.2. y 4.1.3.3. podrían tanto comprometer la simbiosis rizobio-leguminosa como potenciar su eficacia (D'Haeze & Holsters, 2002).

Los estudios anteriormente presentados han permitido sentar las bases de la hipótesis de la inducción por sal de la biosíntesis de más y nuevos factores Nod de la cepa *R. tropici* CIAT899 en condiciones inducidas por flavonoide. Simultáneamente, tanto los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa (apartado 4.1.3.2.) como la técnica de análisis por cromatografía en capa fina (apartado 4.1.3.3.) muestran el efecto que la sal ejerce sobre la producción de factores de nodulación, obviando el papel inductor del flavonoide. Sin embargo, se precisaría de nuevos y distintos ensayos para poder confirmar estas modificaciones en la estructura y cuantía de los factores. De este modo, podríamos conocer si los radicales que confieren especificidad a los factores Nod de dicha cepa para nodular un determinado hospedador se mantienen, modifican o incluso desaparecen.

Con el fin de conocer si existe o no una variación cuali y cuantitativa de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino, comparándolos con los sintetizados en la condición control, se realizaron estudios de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Tal y como se detalla en el apartado 3.6.2. de Material y Métodos, la obtención de los factores Nod para su posterior análisis por HPLC se llevó a cabo a gran escala, empleando 10 L de cultivo bacteriano, cuyos factores Nod se extrajeron con *n*-butanol saturado en agua según describe Spaink *et al.* (1992). Posteriormente, se prepurificó el extracto butanólico con columna de purificación en fase reversa C<sub>18</sub> y se eluyó la mezcla con AcN:agua al 20, 45 y 60%. La fracción de 45% de AcN fue la que finalmente se analizó puesto que es representativa del conjunto de los factores Nod que la bacteria sintetiza.

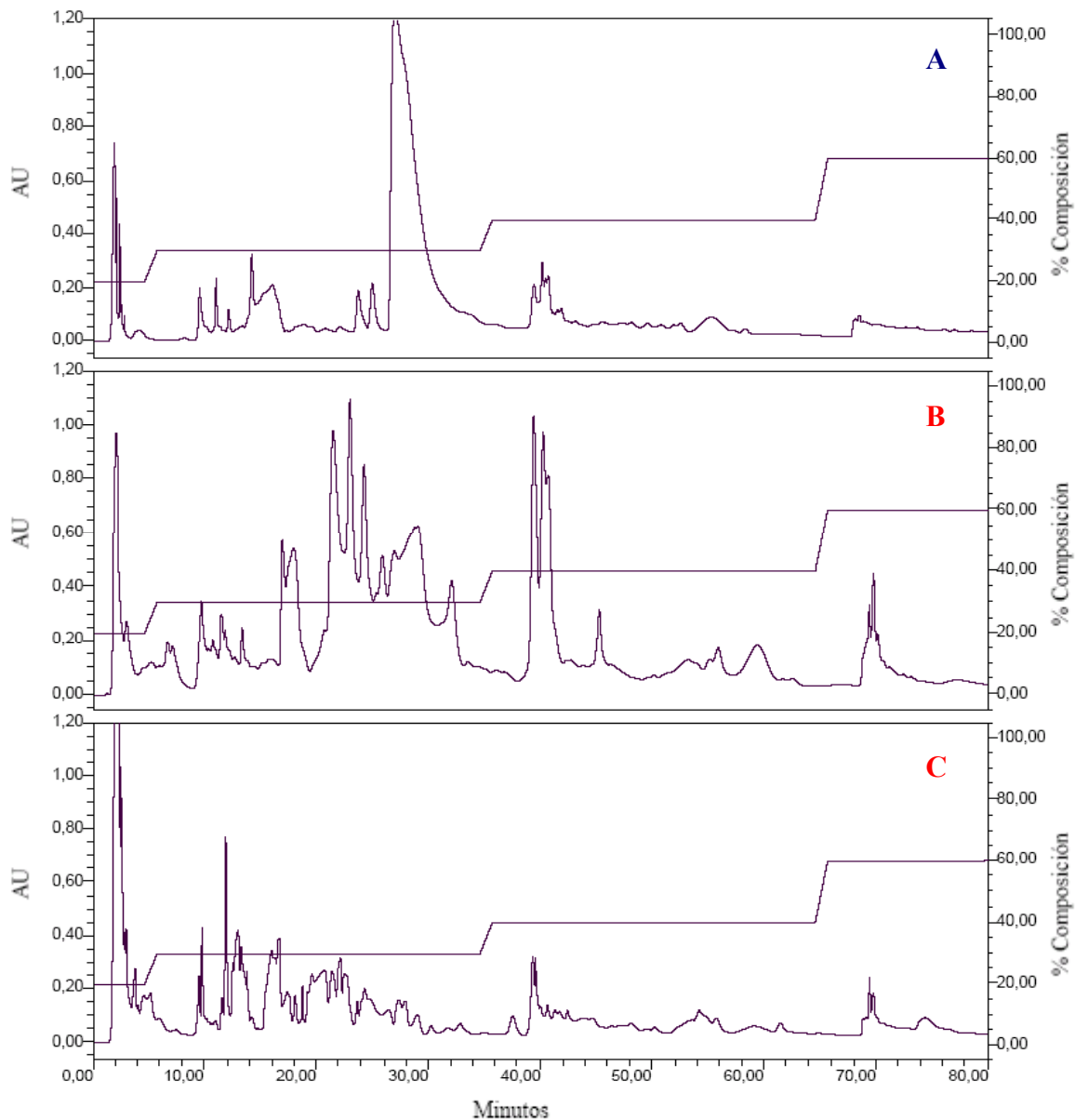


**Figura 4.8.** Cromatogramas de HPLC de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 obtenidos en condiciones de crecimiento control (**A**, 0 mM de NaCl) y condiciones de estrés salino: **B** (100 mM de NaCl), **C** (200 mM de NaCl) y **D** (300 mM de NaCl). La inducción se realizó con apigenina 1  $\mu$ M.

Como puede observarse, existe nuevamente una relación proporcional entre la concentración salina del medio y el área de los picos observados, parámetro indicativo del conjunto de moléculas que se analizan mediante esta técnica. De este modo, se puede confirmar el incremento en la producción de factores Nod de la cepa *R. tropici* CIAT899 como consecuencia del efecto que la sal común ejerce sobre ella, corroborando así los ensayos de actividad enzimática  $\beta$ -galactosidasa del epígrafe 4.1.3.2. y de cromatografía en capa fina del 4.1.3.3..

Tal y como se puso de manifiesto en los apartados anteriores, el NaCl induce la expresión de los genes de nodulación, derivando en la síntesis de factores Nod sin que sea necesaria la presencia del flavonoide en el medio de cultivo.

Estos ensayos indicaron igualmente que, en presencia del inductor, también existe una relación proporcional entre la cantidad de sal presente en el medio y el número de factores Nod sintetizados y excretados (sobre todo en el intervalo de los primeros 40 minutos del HPLC). Por ello, se realizó un nuevo estudio por HPLC en la condición salina extrema que *R. tropici* CIAT899 tolera (300 mM de NaCl), pero en ausencia de apigenina, con el fin de poder comparar el perfil de dicho cromatograma con el obtenido en presencia del flavonoide, tanto en condiciones control como de estrés salino (figura 4.9.).



**Figura 4.9.** Cromatogramas de HPLC de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 obtenidos en condiciones de crecimiento control (**A**, 0 mM de NaCl) y condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl), en presencia (**B**) y ausencia (**C**) de apigenina 1  $\mu$ M.

La figura 4.9. muestra el estudio comparativo de los cromatogramas de los factores Nod que *R. tropici* CIAT899 sintetiza en condiciones control inducida con apigenina 1  $\mu\text{M}$ , y en condiciones de 300 mM de NaCl, inducida o no con dicho flavonoide. En el cromatograma correspondiente a la condición de estrés salino no inducido (C), se observa un incremento del área integrada de los picos registrados con respecto a la correspondiente del cromatograma procesado en condición control (A), ya que se debe desestimar el pico que aparece en el minuto 30 de éste último, específico del inductor utilizado (apigenina 1  $\mu\text{M}$ ). Este ensayo confirma una vez más la elevada producción de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino, y en ausencia de inductor, descrita anteriormente en los apartados 4.1.3.2. y 4.1.3.3..

Sin embargo, debemos indicar que el número de señales registradas (picos) no son específicas de los factores Nod, puesto que cualquier otra molécula presente en el extracto que absorba a esta misma longitud de onda puede proporcionar una señal similar. Por ello, el estudio comparativo de los cromatogramas siempre debe hacerse desde un punto de vista relativo, nunca absoluto. De igual modo, tampoco sería correcto afirmar que existen cambios cualitativos de los factores Nod analizados por HPLC basándonos exclusivamente en el cambio de perfil cromatográfico.

Por este motivo, nos propusimos determinar la estructura de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 obtenidos en condición de estrés salino, inducido o no con apigenina, mediante técnicas de espectrometría de masas. De este modo, podremos confirmar si las nuevas bandas que se observan en los perfiles cromatográficos de los factores Nod sintetizados en condiciones de estrés salino se corresponden efectivamente con nuevos factores Nod. Estos ensayos se llevaron a cabo en colaboración con los grupos dirigidos por la Dra. J. Thomas-Oates (Departamento de Química, Universidad de York, Reino Unido) y Dr. A. Gil-Serrano (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla).

Las fracciones obtenidas tras separación por HPLC de los factores Nod contenidos en el extracto butanólico de *R. tropici* CIAT899, crecida en un medio 300 mM de NaCl e inducida con apigenina 1  $\mu\text{M}$ , fueron analizadas por FAB-MS y MALDI Q-o-Tof MS. Se identificaron 46 factores Nod sintetizados en dicha condición salina, recogidos en la tabla IV.2. (ver Apéndice, p.: 297).

Previamente, Morón *et al.* (2005) caracterizó 29 factores Nod producidos por la misma cepa crecida en condiciones control (0 mM de NaCl, pH 7.0, apigenina 1  $\mu\text{M}$ ),

sin embargo sólo quince factores Nod son comunes a ambas condiciones, mientras que se describen por primera vez catorce factores Nod en *R. tropici* CIAT899: V(C<sub>20:0</sub>, NMe, S), V(C<sub>22:1</sub>, S), V(C<sub>20:1</sub>, NMe, S), V(C<sub>18:0-OH</sub>, NMe, S), V(C<sub>20:0-OH</sub>), V(C<sub>20:1</sub>, NMe), V(C<sub>18:0-OH</sub>), V(C<sub>16:1</sub>, NMe, S, S), V(C<sub>18:1</sub>, MeFuc), IV(C<sub>20:0-OH</sub>, NMe, S), IV-Man(C<sub>18:1</sub>), IV(C<sub>18:1</sub>, MeFuc), IV(C<sub>18:1</sub>, Fuc) y IV(C<sub>18:0</sub>). Todas estas estructuras se estimaron en base a la composición del monosacárido y el análisis de la metilación de los factores Nod presentes en las fracciones de HPLC, el análisis por GLCMS de ácidos grasos, y principalmente, los resultados de FAB-MS y MALDI Q-o-Tof MS y el tándem CID-MS.

Todos los factores Nod identificados son tetrámeros y pentámeros de NAcGlc, portadores de distintos substituyentes sobre los terminales reductor/no reductor y se clasificaron en cinco grupos en base a los radicales que los caracterizan.

El primer grupo corresponde a los factores Nod de estructura básica: esqueleto de NAcGlc carente de substituyente alguno, a excepción del residuo de ácido graso unido por enlace amida al grupo amino del terminal no reductor. El ión B<sub>1</sub> mostrado por los espectros CID permitió la identificación dicho ácido graso. En segundo lugar englobamos a aquellos factores Nod portadores de uno o dos radicales sulfato, en el terminal reductor o en ambos. El tercer grupo comprende factores Nod *N*-metilados sobre el terminal no reductor y sulfatados o no sobre el extremo reductor, mientras que el cuarto está constituido por tetrámeros de glucosamina portadores de un grupo manosa en el terminal reductor, previamente descritos por Folch-Mallol *et al.* (1996).

El quinto y último grupo puede considerarse, quizás, como el de mayor interés, caracterizado por la presencia de 3 factores Nod fucosilados/metilfucosilados en el terminal no reductor: IV y V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) y IV (C<sub>18:1</sub>, Fuc). La presencia del radical fucosa fue confirmada paralelamente por cromatografía de gases. De esta forma, se describen por primera vez factores Nod fucosilados sintetizados por *R. tropici* CIAT899, estructuras muy comunes en bacterias del género *Ensifer* o de otras especies que nodulan *P. vulgaris* como p. ej. *R. etli*.

Con esta tecnología, en la Universidad de York y Sevilla, también se analizó la estructura de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en condiciones de 300 mM de NaCl y ausencia de inductor. Para ello, se recurrió a la misma metodología empleada anteriormente para el análisis de los factores Nod producidos tras inducción con apigenina, a fin de poder confrontar los datos obtenidos en ambas condiciones.

Los resultados se recogen en la tabla IV.3. (ver Apéndice, p.: 299), en la cual se identifica un total de 8 factores Nod repartidos en 5 fracciones de HPLC. Se trata de pentámeros de estructura muy básica, portadores bien del grupo NMe o sulfato como únicos radicales, y *N*-acilados con ácidos grasos de tan sólo 18 ó 20 carbonos, unidos al esqueleto por el extremo no reductor. Si elaborásemos un estudio comparativo entre los factores Nod inducidos frente a los no inducidos, podríamos afirmar que estos 8 factores Nod constituyen los mayoritarios de todo el “pool” que *R. tropici* CIAT899 sintetiza. observación que nos anima a pensar que esta bacteria, bajo condiciones de estrés salino y ausencia de inductor, se sirve únicamente de la maquinaria básica de síntesis de factores Nod (ver Discusión, apartado 5.1.).

#### **4.1.4. Estudio comparativo de los efectos inducidos por estrés salino-osmótico sobre la biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899.**

La sal común está ampliamente reconocida como un compuesto inorgánico que ejerce sobre las células un estrés tanto iónico como osmótico, debido a la fuerza iónica que origina en toda solución acuosa y a su alta capacidad de retención de agua. Se conocen numerosos cambios en la estructura y fisiología de las bacterias como consecuencia directa de la toxicidad iónica del NaCl (Amzallag & Lerner, 1994). A la vez, también se han estudiado exhaustivamente los efectos derivados del estrés osmótico del NaCl sobre gran parte de los procariontes, agrupándose (a excepción de la familia *Halobacteriaceae*) en una respuesta bifásica que conlleva igualmente cambios estructurales y funcionales (Wood, 1999; Heermann & Jung, 2004).

A pesar de todos los estudios realizados en este campo hasta nuestros días, continúa siendo una ardua tarea discriminar entre el efecto iónico y osmótico que el NaCl ejerce sobre las bacterias, puesto que los efectos finales sobre la misma son prácticamente indistinguibles. De este modo, para poder discernir en la medida de lo posible entre el efecto iónico y osmótico que la sal común ejerce sobre un cultivo rizobiano, más concretamente sobre la cepa *R. tropici* CIAT899, decidimos emplear osmolitos no iónicos como alternativa al NaCl. Se realizaron nuevamente los ensayos previos llevados a cabo con NaCl, en vistas a realizar un estudio comparativo entre los efectos de todos los osmolitos empleados. Para la consecución de este objetivo, se seleccionaron como osmolitos alternativos al NaCl, el manitol (osmolito permeable) y

el polietilenglicol 6000 (PEG6000) (osmolito no-permeable), ambos frecuentemente utilizados en estudios de estrés osmótico en bacterias (Culham *et al.*, 2003; Fox *et al.*, 2006).

#### **4.1.4.1. Efecto del estrés osmótico (manitol-PEG6000) sobre *R. tropici* CIAT899.**

La osmolaridad de la rizosfera está considerada mayor que la de un suelo desprovisto de vegetales, como consecuencia de la presencia de numerosos compuestos presentes en las rizodeposiciones, la exclusión de solutos por la toma de agua de la planta y la producción de exopolímeros tanto por la bacteria como por la planta. Como resultado de esta elevada presión osmótica, se originan diversas respuestas en las rizobacterias, que buscarán, en última instancia, el modo más óptimo de adaptación a los nuevos cambios que les rodea, mediante mecanismos como el aumento de la concentración del ión  $K^+$  y/o la síntesis/incorporación de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular denominados “solutos compatibles” (Brown & Simpson, 1972).

Estos cambios pueden disparar nuevas rutas metabólicas, o bien regular otras ya activadas, derivando en posibles cambios estructurales y/o funcionales que, en el caso de *R. tropici* CIAT899, pueden comprometer una vez más la eficacia de la simbiosis con su leguminosa hospedadora. Con el fin de garantizar la integridad y el buen funcionamiento de dicha simbiosis frente al estrés osmótico que pueda afectar el medioambiente rizobiano en una determinada situación, resolvimos estudiar los efectos que los osmolitos no iónicos puedan ejercer sobre ciertos parámetros críticos en el proceso simbiótico (crecimiento bacteriano, expresión de los genes de nodulación y biosíntesis de factores Nod).

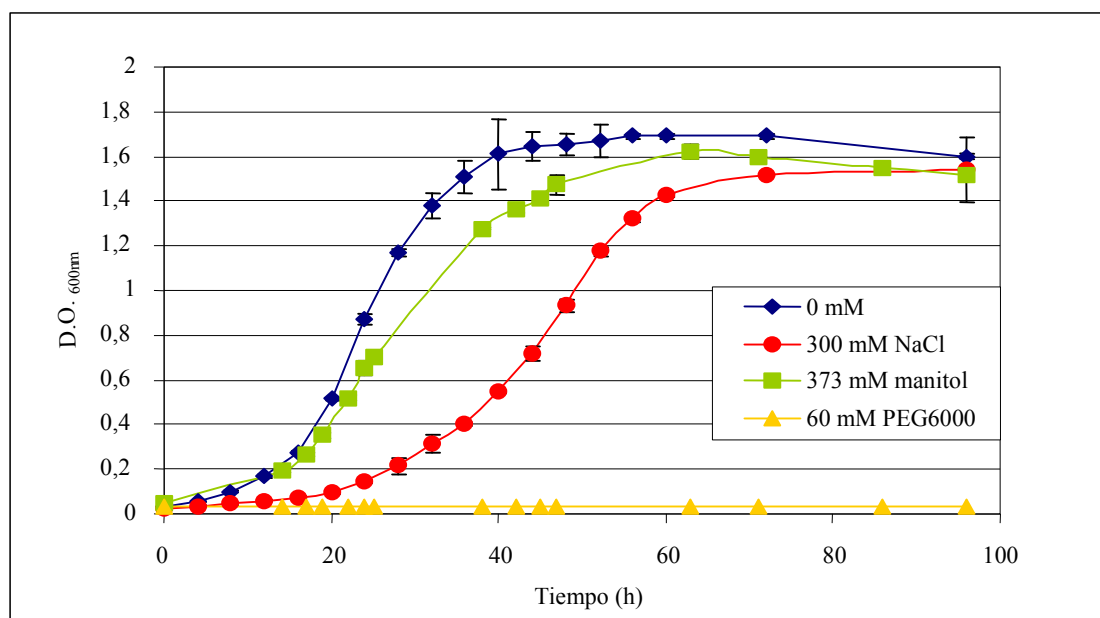
##### **4.1.4.1.1. Efecto del estrés osmótico sobre el crecimiento de *R. tropici* CIAT899.**

En primer lugar se procedió a calcular el valor de la presión osmótica ejercida por el NaCl, de forma que, con arreglo a la fórmula de presión osmótica ( $\pi = (n \cdot R \cdot T)/V$ ), 300 mM de NaCl se corresponden con 2,28 MPa. Este valor de presión osmótica es igualmente ejercida por soluciones 373 mM de manitol y 60 mM de PEG6000, por lo que utilizaremos estos valores de concentración de los nuevos osmolitos, a fin de



trabajar en condiciones de presión osmótica equivalentes (iso-osmóticas). Teniendo en cuenta las premisas establecidas, se fijó como punto de partida el estudio de los efectos causados por los nuevos osmolitos sobre el crecimiento de *R. tropici* CIAT899, mediante la obtención de curvas de crecimiento y recuento de células viables.

Como puede observarse en la figura 4.10., se registró una clara disminución en el crecimiento de *R. tropici* CIAT899 cuando ésta fue cultivada en medio mínimo B<sup>-</sup> a la concentración de 300 mM de NaCl, aumentando su tiempo de generación (ver apartado 4.1.3.1.). Por el contrario, cuando se utilizó manitol como osmolito en condiciones iso-osmóticas (373 mM manitol), la disminución de crecimiento no fue tan marcada como en presencia de 300 mM de NaCl. Aumentó su tiempo de generación de 5 horas y 30 minutos en condiciones control a 7 horas, equiparándose este efecto al fenómeno registrado bajo la condición de estrés por 100 mM de NaCl (figura 4.5.).



**Figura 4.10.** Curvas de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 crecida en condiciones de crecimiento control (sin osmolitos) y de estrés osmótico (300 mM de NaCl, 373 mM manitol y 60 mM PEG6000). Los puntos de cada curva representan el valor de 8 ensayos independientes  $\pm$  la desviación estándar.

A pesar del amplio uso del manitol en estudios de estrés osmótico en bacterias, varios autores han profundizado sobre la discutible eficacia como osmolitos de los solutos permeables de bajo peso molecular, como es el caso de este poliol (van der Heide *et al.*, 2001). Por esta razón, se seleccionó un segundo osmolito de naturaleza no iónica y no permeable, PEG6000, a una concentración de 60 mM, la cual es equivalente en presión osmótica a las anteriores empleadas de manitol y NaCl.

Sin embargo, los resultados registrados en los ensayos en que se empleó dicho osmolito no fueron satisfactorios porque, tal y como se observa en la figura 4.10., no se registró incremento alguno del crecimiento bacteriano, puesto que la D.O.<sub>600nm</sub> del cultivo se mantuvo en los niveles iniciales a lo largo de las 96 horas de estudio.

Paralelamente, se realizó el recuento de células viables en placas de medio rico TY de *R. tropici* CIAT899 en las distintas condiciones de estudio establecidas para las curvas de crecimiento. No se registraron cambios significativos en las condiciones de estrés osmótico donde se emplearon NaCl y manitol como osmolitos (300 y 373 mM respectivamente), cuyas células sí alcanzaron niveles de  $10^8$  UFC/mL, valores similares a los registrados en condiciones de crecimiento control (ver tabla IV.1.). Sin embargo, los valores de células viables registrados en la condición de crecimiento 60 mM PEG6000 se mantuvieron invariables, en torno a un orden de  $10^6$  UFC/mL, correspondiente al inóculo inicial de cada curva. Esta observación nos indica que, bajo condiciones de estrés osmótico por PEG6000, *R. tropici* CIAT899 se mantiene viable a lo largo del tiempo, más es incapaz de multiplicarse, quizás porque la viscosidad del medio mínimo B 60 mM PEG6000 es excesivamente elevada y físicamente dificulta el crecimiento (ver Discusión, apartado 5.1.).

#### **4.1.4.1.2. Efecto del estrés osmótico sobre la expresión de los genes de nodulación y la biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899.**

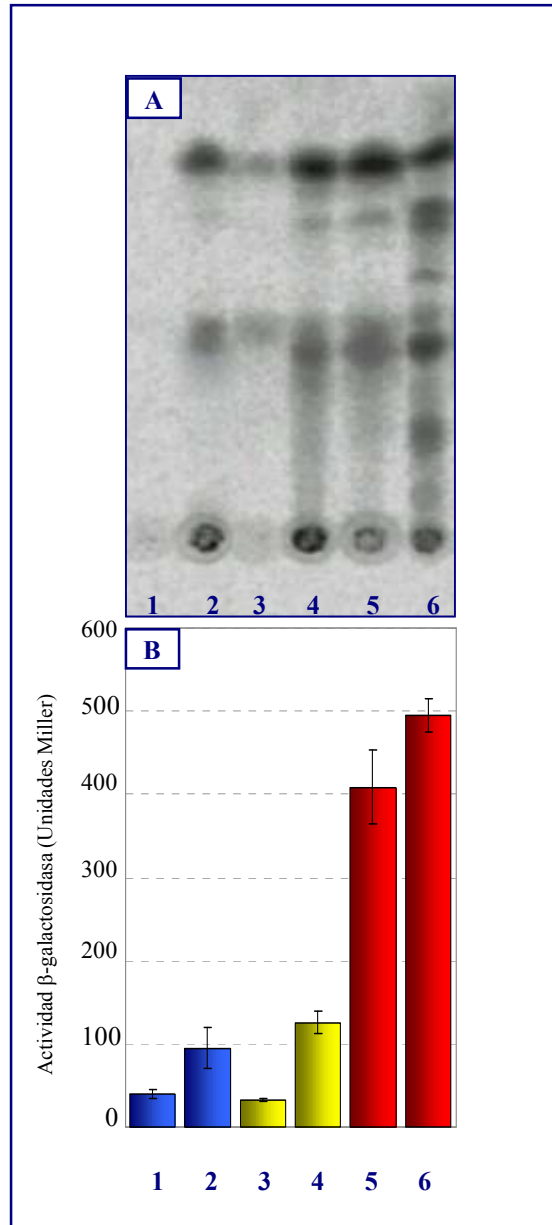
Hemos detallado anteriormente cómo, bajo condiciones de estrés osmótico, las bacterias acumulan moléculas orgánicas de bajo peso molecular conocidas como “solutos compatibles” gracias a varios mecanismos, como por ejemplo el catabolismo de la trigonelina a betaínas (Goldmann *et al.*, 1991). Phillips *et al.* (1992) informaron que la trigonelina podía actuar como inductor de los genes *nod*, lo cual nos llevó a especular acerca del efecto que podía tener el estrés osmótico sobre la expresión de los genes de nodulación y la posterior biosíntesis de factores Nod. De esta manera, se establecieron como condiciones de estudio aquellas que emplearon NaCl y manitol como osmolitos, equivalentes en presión osmótica a 2,25 MPa (300 mM y 373 mM de NaCl y manitol respectivamente), puesto que los estudios llevados a cabo con PEG6000 no arrojaron datos consistentes.

Al igual que en los apartados 4.1.3.2. y 4.1.3.3., se emplearon las técnicas del análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa como medida de la expresión de los genes *nod* y los estudios por cromatografía en capa fina para examinar los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899. Ambos ensayos se llevaron a cabo en medio mínimo B<sup>-</sup>, adicionado o no de apigenina 1  $\mu$ M, en las mismas condiciones establecidas para el apartado anterior (0 y 300 mM de NaCl, 373 mM manitol). La figura 4.11., panel A, nos muestra los perfiles cromatográficos de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en las condiciones control y de estrés anteriormente fijadas.

Se registró nuevamente un incremento en la producción y secreción de factores Nod en condiciones de estrés por NaCl (carriles 5 y 6) con respecto a la condición control (carriles 1 y 2), tal y como ya se describió en los apartados 4.1.2.2. y 4.1.3.3.. Por el contrario, en aquellas condiciones donde se empleó manitol como osmolito (carriles 3 y 4), si bien también se observó mayor producción de factores Nod con respecto a la condición control, ésta no fue tan notable como en las condiciones de empleo de NaCl. Nótese como en los carriles impares 3 y 5, referentes a los ensayos en ausencia de inductor, se registraron señales radiactivas específicas de factores Nod, de mayor intensidad en el empleo de NaCl (carril 5) que de manitol (carril 3).

Simultáneamente, se efectuaron los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa previamente indicados, cuyos datos vienen recogidos en la figura 4.11., panel B. De nuevo, se recurrió al uso de la cepa indicadora *R. tropici* RSP3051 (*lacZ::nodP*, ver apartado 3.1.1. de Material y Métodos) cuya medición de la capacidad inductora de la actividad enzimática nos revelará el nivel de expresión de los genes *nod* en respuesta a las condiciones fijadas en cada ensayo.

Se observa claramente cómo la inducción de la actividad enzimática en condiciones de estrés por NaCl adicionado de flavonoide (carril 6) aumentó 7 veces con respecto al valor registrado en la condición control adicionado igualmente de apigenina (carril 2). Este fenómeno ya había sido informado en el apartado 4.1.3.2., al igual que la inducción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de estrés por NaCl y ausencia de flavonoide (carril 5). Sin embargo, si orientamos el estudio de forma comparativa frente al efecto ejercido por el manitol, observamos igualmente un aumento de la actividad  $\beta$ -galactosidasa con respecto a la condición control, aunque no tan considerable como el obtenido al usar NaCl como osmolito.



**Figura 4.11.** Efecto del estrés osmótico sobre la expresión de los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899, bajo condiciones de crecimiento control (carriles 1 y 2) y de estrés osmótico (carriles 3 y 4, 373 mM manitol; carriles 5 y 6, 300 mM de NaCl). Se utilizó apigenina 1  $\mu$ M como inductor en los carriles 2, 4 y 6. Panel **A**.- Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899. Panel **B**.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa de *R. tropici* RSP3051. Los datos se representan en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

De hecho, en la condición inducida por apigenina 1  $\mu$ M (carril 4) este aumento apenas pudo superar en un 30% al registrado en la condición control de estudio (carril 2). Igualmente podemos trasladar esta observación a la condición no inducida con apigenina (carril 3), donde ciertamente se observa inducción de la actividad  $\beta$ -

galactosidasa, si bien no supera el valor correspondiente a la condición control inducida (carril 2).

Ambos resultados nos permiten retomar la hipótesis inicial propuesta en los apartados 4.1.3.2. y 4.1.3.3., donde ya se adelantó la potencial actividad inductora de la sal común sobre la expresión y posterior traducción de los genes *nod*. De este modo, podemos desarrollar extensamente la hipótesis que indica que el efecto de NaCl sobre los genes de nodulación combina tanto estrés osmótico como iónico; si bien, los efectos ejercidos por este último parecen ser de mayor intensidad que los de ensayos de estrés osmótico para los que se emplean osmolitos no iónicos.

#### **4.1.4.2. Efectos del estrés iónico (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, KCl) sobre *R. tropici* CIAT899.**

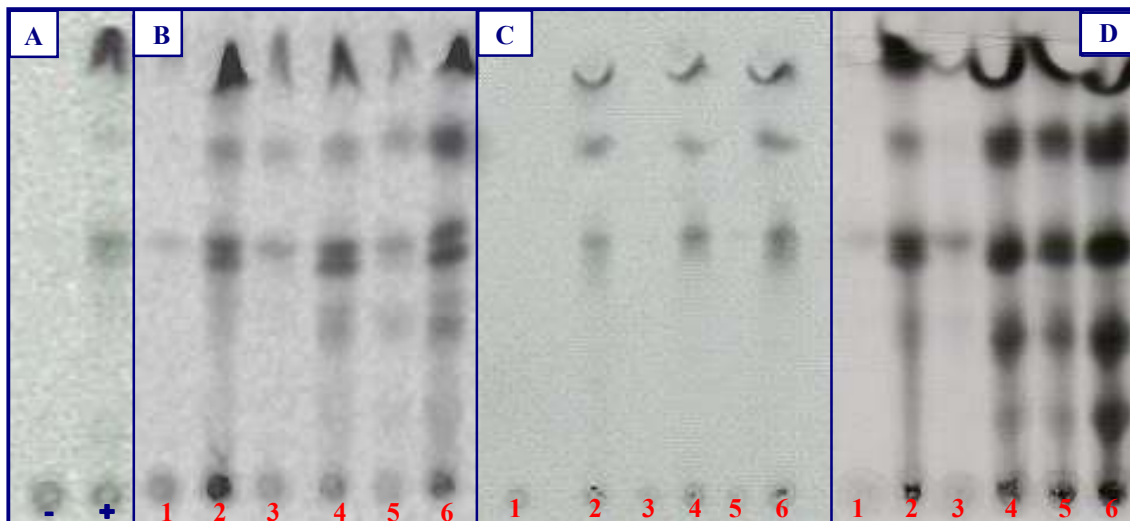
Tal y como se confirmó en el apartado anterior, los solutos iónicos, concretamente el NaCl, contribuyen simultáneamente a un estrés osmótico e iónico (Hagemann & Erdmann, 1997; Hayashi & Murata, 1998). Sin embargo, varios autores han intentado diferenciar entre ambos tipos de estrés, como Botsford (1984), quien estudió cómo determinados solutos de naturaleza iónica ejercían un efecto tóxico directo sobre *E. meliloti* independiente del estrés osmótico, al mismo tiempo que se registraban alteraciones en el crecimiento bacteriano específicas de un/varios ion/es determinado/s. Posteriormente, El-Sheikh (1998) afirmó que los daños que la sal común ocasionaba sobre el crecimiento rizobiano se debía a efectos específicos del estrés iónico, desestimando así el papel del estrés osmótico. En esta misma línea, se han ido notificando más efectos iónico-específicos sobre la fisiología bacteriana (Faituri *et al.*, 2001), lo cual nos hizo pensar sobre la posible naturaleza iónico-específica del efecto ejercido por el NaCl sobre *R. tropici* CIAT899.

##### **4.1.4.2.1. Efecto del estrés iónico sobre la biosíntesis de factores Nod de *R. tropici* CIAT899.**

Puesto que en el apartado 4.1.4.1.2. se confirmó la mayor contribución del NaCl a un estrés de tipo iónico que osmótico, nos propusimos identificar el ión (catión o anión) responsable de dicho efecto, o por el contrario verificar si se trataba de un efecto conjunto o incluso sinérgico de ambos iones. Con este fin, seleccionamos nuevos

osmolitos de naturaleza iónica que compartiesen bien el anión o el catión de la sal común, disueltos en soluciones del mismo valor de presión osmótica a las ensayadas con NaCl. De este modo, seleccionamos la sal KCl para reproducir el efecto del Cl<sup>-</sup>, y la sal Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para dilucidar el papel del Na<sup>+</sup>, comparando los efectos registrados siempre frente al NaCl. Se empleó nuevamente la técnica de estudio por cromatografía en capa fina de los factores Nod, estableciéndose varias condiciones de estudio, tanto control como de estrés iónico. La concentración salina de las condiciones de estudio osciló así en un rango de 0-300 mM del ión utilizado, toleradas todas por la bacteria objeto de estudio. La presión osmótica ejercida fue equivalente en éstas últimas condiciones, independientemente de los osmolitos empleados, de manera que la presión osmótica que ejerce una solución 300 mM de NaCl será equivalente en MPa a una 300 mM KCl, para estudios referentes al ión Cl<sup>-</sup>, y equivalente a una solución 150 mM Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, para estudios referentes al ión Na<sup>+</sup>, por la relación 2:1 catión:anión.

Los datos de este ensayo se recogen en la figura 4.12., donde se muestran los perfiles cromatográficos de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 sintetizados en cada una de las condiciones indicadas. Se empleó apigenina 1 µM como inductor para las condiciones de estudio inducidas (carriles pares).



**Figura 4.12.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899, bajo condiciones de crecimiento control (panel **A**) y de estrés salino por Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (panel **B**), KCl (panel **C**) y NaCl (panel **D**). Carriles 1 y 2, 100 mM; carriles 3 y 4, 200 mM y carriles 5 y 6, 300 mM de las distintas soluciones salinas. Se utilizó apigenina 1 µM como inductor en los carriles pares de **B**, **C** y **D** y el carril indicado como positivo (+) en la condición control **A**.

De acuerdo con los resultados que se muestran en la figura 4.12., podemos deducir claramente que existe una relación directamente proporcional entre la concentración de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  del medio y el aumento en la producción de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 (panel B), al igual que sucede con el NaCl (panel D). Al mismo tiempo hemos de destacar que nuevamente se presenta el fenómeno de síntesis de factores Nod en condiciones no inducidas como consecuencia del efecto de la sal en el medio,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  en esta ocasión, tal y como se describió para el NaCl en el apartado 4.1.3.3..

Sin embargo, no se registra este mismo comportamiento para los estudios de KCl (panel C), puesto que no se observa señal alguna correspondiente a factores Nod sintetizados en los ensayos carentes de inductor (carriles impares) y tampoco se registra un aumento en la síntesis de los mismos en las condiciones de estrés salino inducidas (carril 6) con respecto a la condición control (carril 2). Teniendo en cuenta estas afirmaciones, podemos concluir que los efectos atribuidos al NaCl de modificación de la expresión de los genes *nod* y biosíntesis de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 son fenómenos ión-específicos, siendo el catión  $\text{Na}^+$  el responsable de estos cambios.

#### **4.1.5. Estudios preliminares de la influencia del estrés salino en la regulación de la biosíntesis de factores Nod de *R. tropici* CIAT899.**

A día de hoy se conocen muchas vías a través de las cuales numerosos tipos de factores medioambientales disparan respuestas drásticas en las bacterias mediante modificaciones, activación o inhibición de determinadas rutas metabólicas. La mayoría de estos cambios vienen mediados por factores moleculares, que suelen ser clasificados en grupos en función de su estructura, función y/o finalidad. Así, podemos citar varios ejemplos ampliamente estudiados como es el caso de los notorios factores sigma (encargados de regular numerosas rutas activadas por estrés de naturaleza variada en *E. coli*), las “heat shock proteins” (mediadoras en procesos de estrés térmico), o las proteínas NolR y NodD, inhibidora y activadora respectivamente del proceso de transcripción de los genes *nod* (Kondorosi *et al.*, 1991; Schell, 1993; Chen *et al.*, 2005; Weber *et al.*, 2005). Asimismo, se conocen otras proteínas involucradas en la regulación de los genes *nod* (Göttfert, 1993; Schlaman *et al.*, 1998).

No obstante, poco se ha esclarecido acerca de los factores que median en los procesos activados o inhibidos en el metabolismo rizobiano como consecuencia del

estrés salino. Este es el caso del fenómeno de incremento en la producción de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 en condiciones inducidas, de forma directamente proporcional a la cantidad de Na<sup>+</sup> en el medio, así como el de la síntesis y excreción de dichos factores en condiciones de estrés por Na<sup>+</sup> en ausencia del inductor.

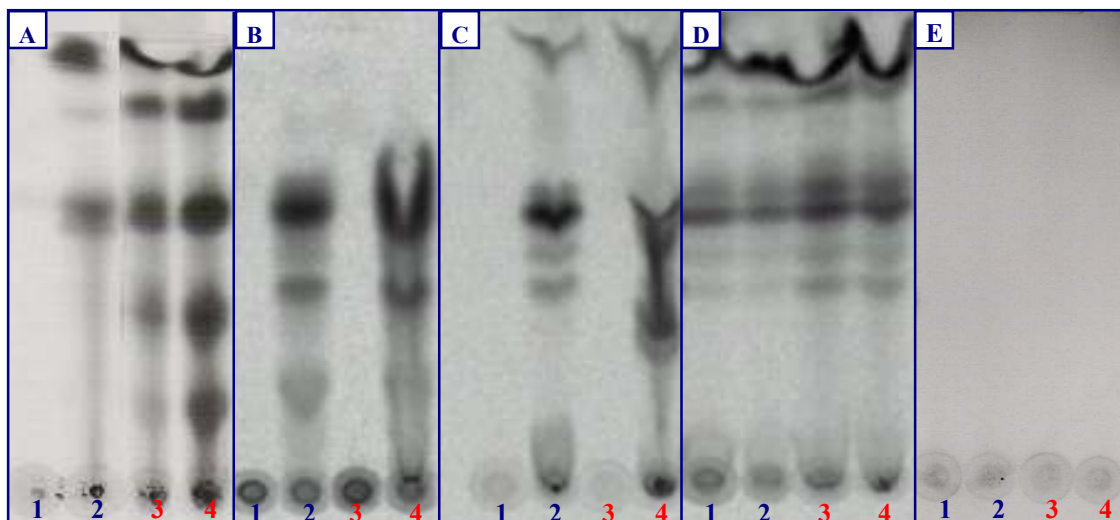
*R. tropici* CIAT899 posee 5 copias del gen *nodD* (Sousa *et al.*, 1993) siendo la copia del *nodDI* imprescindible para la nodulación de nuestra cepa en plantas de *Leucanea leucocephala* y *Macroptillium atropurpureum*. En *P. vulgaris* no se anula la nodulación, aunque si disminuye la tasa de la misma (van Rhijn *et al.*, 1994). En base a la importancia del papel regulador de dicha copia en la simbiosis de *R. tropici* CIAT899 con sus hospedadores, nos propusimos estudiar la posible participación de dicho gen en el proceso de regulación frente al estrés salino. Con este fin, dispusimos de los transconjugantes *R. tropici* RSP900 pCV38, RSP900 pCV3804 y RSP900 pCV61 (ver Material y Métodos, apartado 3.1.1.). *R. tropici* RSP900 representa a la cepa *R. tropici* CIAT899 curada de su plásmido simbiótico, mientras que los distintos plásmidos empleados se corresponden con determinados cósmidos del banco de genes de *R. tropici* CIAT899. Así, el plásmido pCV3804 porta los genes *nodDI**nodABCS* y parte del *nodU*, el pCV38 los genes *nodDI**nodABCSULJHPQ* y el pCV61 deriva del cósmido pCV38 sin el gen *nodDI* ni la caja de nodulación, con todos los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899 bajo la influencia de un promotor constitutivo de Kanamicina.

Seguidamente de determinó por técnicas de CCF el perfil cromatográfico de los factores Nod de dichos transconjugantes bajo condiciones control y de estrés salino (300 mM de NaCl), tanto en presencia como en ausencia de apigenina 1 μM, comparando los mismos con los factores Nod biosintetizados por *R. tropici* CIAT899 en las mismas condiciones. Estos resultados vienen recogidos en la figura 4.13..

Como podemos observar en el panel B de dicha figura, el perfil de los factores Nod sintetizados por la cepa *R. tropici* RSP900 pCV3804 en condiciones control (carril 2), muestra algunas diferencias puntuales con respecto al perfil de la cepa parental (panel A, carril 2). La más notable de entre éstas quizás sean la ausencia de factores Nod sulfatados (representados por la banda más elevada en la placa cromatográfica de *R. tropici* CIAT899, panel A, carril 2) debido a la falta en el cósmido pCV3804 de los genes que codifican para los mismos, así como la desaparición y aparición de determinadas bandas en un segundo lugar. Con respecto a la condición de estrés salino inducido (panel B, carril 4), el perfil cromatográfico es bastante similar al descrito para la condición control, si bien la tasa de síntesis de los factores Nod es un poco mayor, lo



cual dificulta el buen desplazamiento de los mismos a lo largo de la placa cromatográfica, dando lugar al esparcimiento de cada una de las bandas. Bajo condiciones de estrés salino y ausencia de inductor no se registró ningún tipo de señal radiactiva específica.



**Figura 4.13.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por: panel **A.**- *R. tropici* CIAT899, panel **B.**- *R. tropici* RSP900 pCV3804, panel **C.**- *R. tropici* RSP900 pCV38, panel **D.**- *R. tropici* RSP900 pCV61 y panel **E.**- *R. tropici* RSP900, bajo condiciones de crecimiento control (carriles 1 y 2) y de estrés salino (carriles 3 y 4, 300 mM de NaCl). Se empleó apigenina 1  $\mu$ M como inductor en los carriles 2 y 4.

A continuación se analizó el perfil cromatográfico de la cepa RSP900 pCV38 (panel C), el cual mostró varias similitudes con el descrito previamente para RSP900 pCV3804. De nuevo se observó un mayor número de factores Nod sintetizados en la condición de estrés salino inducida (carril 4) con respecto a la condición control (carril 2), hecho que originó nuevamente un desplazamiento lento de los factores de nodulación a lo largo de la placa cromatográfica. Tampoco se registró señal radiactiva alguna para las condiciones de ensayo no inducidas (carriles 2 y 4), de manera que, nuevamente, desaparece el fenómeno de síntesis de factores Nod bajo condiciones de estrés salino y ausencia de inductor, al igual que ocurriese con el cósmido pCV3804 (panel B).

Por este motivo, podemos confirmar que el factor molecular desconocido hasta la fecha que media en la regulación de la ruta de biosíntesis de factores Nod de *R. tropici* CIAT899, en condiciones de estrés salino y ausencia de inductor se encuentra codificado en la región del pSym no presente en el cósmido pCV3804 ni en el pCV38. De esta manera, los estudios que fueron propuestos en el apartado 4.1.3.2. se restringen

favorablemente a una determinada porción del plásmido simbiótico, descartando así tanto el resto del mismo como el posible papel mediador del cromosoma o del otro plásmido que *R. tropici* CIAT899 posee. Sin embargo, no podemos aun dilucidar con certeza la posible mediación del gen *nodDI* en el transcurso de este extraño fenómeno, puesto que el factor molecular que regula dicho fenómeno podrá disparar o no la expresión de los genes *nod* vía activación del *nodDI*.

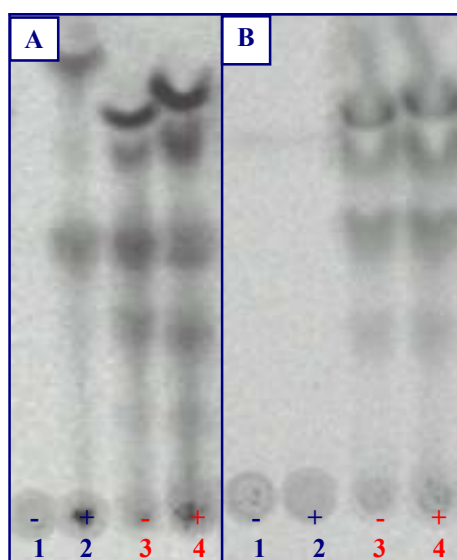
Por último, se estudió el perfil de los factores de nodulación del tercero de los cósmidos del banco de genes de *R. tropici* CIAT899 objeto de estudio, el pCV61 (panel D). Tal y como se recordó al inicio de este apartado, este cósmido posee el mismo inserto de genes que el pCV38, si bien el gen *nodDI* está reemplazado por un promotor constitutivo de kanamicina, lo cual explica la masiva producción de factores Nod en todas las condiciones ensayadas. Al tratarse de un proceso de síntesis independiente de flavonide, los perfiles registrados en las condiciones inducidas (carriles 2 y 4) son semejantes a las no inducidas (carriles 1 y 3). Sin embargo, debemos resaltar que la producción de factores Nod en condiciones de estrés salino (carriles 3 y 4) se vio incrementada levemente con respecto a la registrada en condiciones control (carriles 1 y 2), seguramente por la apertura de determinados canales de membrana. La cepa *R. tropici* RSP900 no sintetizó ningún factor Nod (panel E) puesto que carece de los genes que codifican para los mismo, agrupados en el pSym.

Ateniéndonos a los resultados mostrados, podemos establecer al menos tres puntos de regulación del proceso de síntesis de factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino y ausencia de inductor: canales de membrana, gen *nodDI* y factor molecular no determinado codificado en el pSym.

Con el fin de poder dilucidar el papel regulador que juega el gen *nodDI* en este proceso, empleamos un mutante del mismo creado a partir de la inserción de una cassette de Km en el propio gen, inserción comprobada posteriormente por técnicas de PCR (ver Material y Métodos, apartado 3.5.3.) y secuenciación. Se trata de la cepa *R. tropici* RSP82 (ver Material y Métodos, tabla II.2.), la cual tolera hasta 300 mM de NaCl al igual que su cepa parental. Se realizó un estudio por CCF de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 y RSP82, crecidas ambas bajo condiciones control y de estrés salino (300 mM de NaCl), en presencia y ausencia de apigenina 1  $\mu$ M. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 4.14. donde podemos observar una vez más el perfil ya descrito para *R. tropici* CIAT899 en estas condiciones de estudio: síntesis de factores Nod en condiciones control en presencia de apigenina (panel A,

carril 2) y en condiciones salinas, tanto en presencia como ausencia de inductor (panel A, carriles 3 y 4, respectivamente).

Por el contrario, no se registró este mismo perfil para la cepa mutante RSP82, puesto que no fue capaz de sintetizar factor alguno en condiciones control adicionada de apigenina, ya que, al estar el gen *nodDI* mutado, el flavonoide no pudo interaccionar adecuadamente con éste, suspendiéndose la posterior transcripción de los genes *nod* (panel B, carril 2). Sin embargo, bajo condiciones de estrés salino, tanto en ausencia como presencia del flavonoide, si se observó producción de factores Nod (panel B, carriles 3 y 4), siendo el perfil cromatográfico semejante al mostrado por la cepa parental *R. tropici* CIAT899 en condiciones salinas (panel A, carriles 3 y 4), por lo que podemos considerar en un principio que se trata de los mismos factores Nod.



**Figura 4.14.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por las cepas *R. tropici* CIAT899 (panel A) y *R. tropici* RSP82 (panel B) bajo condiciones de crecimiento control (indicado en azul) y de estrés salino (300 mM de NaCl, indicado en rojo). Los cultivos fueron inducidos con apigenina a la concentración final de 1  $\mu$ M (carriles con signo positivo (+)). Los carriles con signo negativo (-) indican ausencia de inductor.

En función de estos resultados podemos indicar que la expresión de los genes *nod* de la estirpe *R. tropici* CIAT899, bajo condiciones de estrés salino y ausencia de flavonoides, es totalmente independiente del gen *nodDI*. Por lo tanto, el factor molecular presente en el pSym y que media la síntesis de factores Nod en presencia de sal y ausencia de flavonoides, activará la expresión de los genes *nod* mediante otra vía que no sea la activación del gen *nodDI*.



## **4.2. Efecto del estrés salino sobre el macrosimbionte (leguminosa) y la simbiosis rizobio-leguminosa.**

- 4.2.1.** Efecto del estrés salino sobre la actividad inductora y composición de los exudados de raíces de *P. vulgaris* y *G. max*.
- 4.2.2.** Efecto del estrés abiótico sobre los estadíos iniciales de la interacción rizobio-leguminosa: estudio de la actividad biológica de los factores Nod de cepas nodulantes de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa y *G. max* cv. Osumi.

## ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS 4.2.

	Página
4.15. Efecto de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), sobre <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. etli</i> ISP42..	126
4.16. Efecto de los exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), sobre <i>E. fredii</i> SMH12 y HH103.....	128
4.17. Actividad $\beta$ -galactosidasa de la cepa <i>R. leguminosarum</i> RBL5280 inducida con exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa obtenidos en condiciones control y de estrés salino (0, 25, 35 y 50 mM de NaCl).....	130
4.18. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 crecida en medio mínimo B <sup>+</sup> o en exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa obtenidos a los 4 y 7 días.....	131
4.19. Cromatograma de HPLC de los flavonoides empleados como patrones de ensayo en el estudio de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL y <i>G. max</i> cv. Osumi.....	132
4.20. Estudio de actividad biológica de la estirpe <i>E. fredii</i> SMH12 sobre plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi.....	137
4.21. Estudio comparativo del desarrollo nodular de <i>E. fredii</i> SMH12 inoculada en plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi, bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	138
4.22. Estudio comparativo de la actividad biológica de los factores Nod sintetizados por <i>E. fredii</i> SMH12 bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl), en plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi.....	139
4.23. Estudio de actividad biológica de la estirpe <i>R. tropici</i> CIAT899 sobre plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa.....	141
4.24. Estudio comparativo del desarrollo nodular de <i>R. tropici</i> CIAT899 inoculada en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa, bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	142
4.25. Nódulos y primordios nodulares tras inocular con factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones control y de estrés salino (300 mM de NaCl).....	144
4.26. Raíz de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculada con factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899 obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl)..	146
4.27. Nódulos y primordios nodulares tras inocular con factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 en condiciones de estrés ácido (pH 4,5).....	147
4.28. Primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con diversas fracciones procedentes del HPLC de los factores Nod de <i>R. tropici</i> CIAT899, sintetizados en condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y en ausencia de inductor.....	150
4.29. Cromatograma de HPLC del segundo análisis de la fracción obtenida en el minuto 20 del HPLC de los factores Nod sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899, bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y ausencia de inductor.....	151
4.30. Nódulos y primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con factores Nod sintetizados bajo condiciones control por las cepas <i>R. tropici</i> RSP900 pCV61, pCV38 y pCV3804.....	156
4.31. Nódulos y primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con las cepas <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. tropici</i> RSP900 pCV3804.....	157

## ÍNDICE DE TABLAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS 4.2.

	<b>Página</b>
<b>IV.4.</b> Flavonoides identificados en exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl).....	133
<b>IV.5.</b> Flavonoides identificados en exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl).....	134
<b>IV.6.</b> Factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina.....	300
<b>IV.7.</b> Factores de nodulación biológicamente activos sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y ausencia de apigenina. Segundo análisis.....	152
<b>IV.8.</b> Factores de nodulación biológicamente activos sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,5) y ausencia de apigenina. Segundo análisis.....	153
<b>IV.9.</b> Factores de nodulación no activos biológicamente sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones control de estrés salino (300 mM de NaCl) o ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina.....	154
<b>IV.10.</b> Estudio comparativo de los factores de nodulación sintetizados por <i>R. tropici</i> CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) o ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina. Segundo análisis.....	300





## **4.2. Efecto del estrés salino sobre el macrosimbionte (leguminosa) y la simbiosis rizobio-leguminosa.**

En líneas generales, las leguminosas son plantas sensibles a la sal según la clasificación de Greenway & Munns (1980). No obstante, cada día son más los cultivares definidos como “tolerantes a la sal” gracias a la evolución de su propia naturaleza y/o a la perfección de técnicas de caracterización e ingeniería genética (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha de admitir que estos hospedadores son más sensibles al estrés salino y/u osmótico que sus propios rizobios nodulantes, los cuales muestran una amplia variedad de tolerancia al estrés salino.

Además de los efectos negativos que la sal común ejerce sobre el propio hospedador y su simbiote, ciertos parámetros característicos de la simbiosis establecida entre ambos se ven igualmente afectados. Tu (1981) demostró que el NaCl era capaz de inhibir los estadios iniciales de la simbiosis rizobio-leguminosa y, sucesivamente, diversos autores han ido estudiando otros parámetros afectados por el exceso de sal en el medio, como es el caso de la disminución de la tasa de nitrógeno fijado por el bacteroide (Bekki *et al.*, 1987; Abd-Alla *et al.*, 1998). Ateniéndonos a estos antecedentes, podemos afirmar que el éxito de una simbiosis rizobio-leguminosa bajo condiciones de estrés salino requiere principalmente de una adecuada selección tanto de las cepas de rizobio (Zahran, 1991) como de la planta hospedadora (Saadallah *et al.*, 2001b).

### **4.2.1. Efecto del estrés salino sobre la actividad inductora y composición de los exudados de raíces de *P. vulgaris* y *G. max*.**

Tal y como se indicó en el apartado 1.1. de la Introducción, los exudados son compuestos solubles en agua, de bajo peso molecular, y que se liberan en forma pasiva pudiendo modificar la rizosfera gracias a los cambios que originan en las características químicas, físicas y biológicas del suelo (El-Shatnawi & Makhadmeh, 2001). Si bien existen numerosos trabajos que analizan en los exudados la presencia de moléculas inductoras del tipo flavonoides, son escasos los estudios sobre el efecto del estrés salino en la exudación y sus posteriores consecuencias, tanto en el crecimiento bacteriano como en la inducción de genes de nodulación (Angelini *et al.*, 2003), debido

principalmente a la dificultad del estudio de sistemas que se encuentran bajo tierra, como es el caso de las raíces de la planta.

#### **4.2.1.1. Estudio de la actividad inductora de los exudados de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi sobre los genes *nod* de sus simbioses correspondientes, en condiciones control y de estrés salino.**

Sabemos ciertamente que, frente a una situación de estrés, las plantas activan ciertos mecanismos que les permitirán una futura adaptación al nuevo ambiente (Walker *et al.*, 2003), lo cual conllevará, seguramente, cambios en la composición de sus exudados. Mediante el empleo de técnicas de monitorización medioambiental, basadas en el uso de bacterias recombinantes portadoras de un gen informador específico de un determinado componente, se han incrementado en estos últimos años la cantidad y calidad de información de interés sobre las pautas de exudación de las raíces, desde un punto de vista espacial y temporal (Jaeger *et al.*, 1999; Bringhurst *et al.*, 2001).

Valorando estos antecedentes, se planteó el estudio de la capacidad inductora de las moléculas presentes en el exudado de judía y soja sobre los genes de nodulación de algunos de sus simbioses (*R. tropici* CIAT899 y *R. etli* ISP42 para judía, y *E. fredii* SMH12 y HH103 para soja), así como su posterior repercusión sobre la síntesis de los factores Nod bajo condiciones control y de estrés salino.

Al igual que en los apartados 4.1.3.2. y 4.1.4.1.2. de los Resultados, se emplearon las técnicas de análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa como medida de la expresión de los genes *nod* frente a la actividad inductora de los exudados (se utilizó el plásmido indicador pMP240, ver Material y Métodos, tabla III.2.) y los estudios por cromatografía en capa fina para examinar los factores Nod sintetizados por las cuatro cepas de rizobio en cada condición de ensayo. Ambos estudios se llevaron a cabo con exudados obtenidos de plantas crecidas bajo condición de crecimiento control y de estrés salino (50 mM de NaCl), estableciéndose como control del ensayo el medio mínimo B<sup>-</sup> (control y salino).

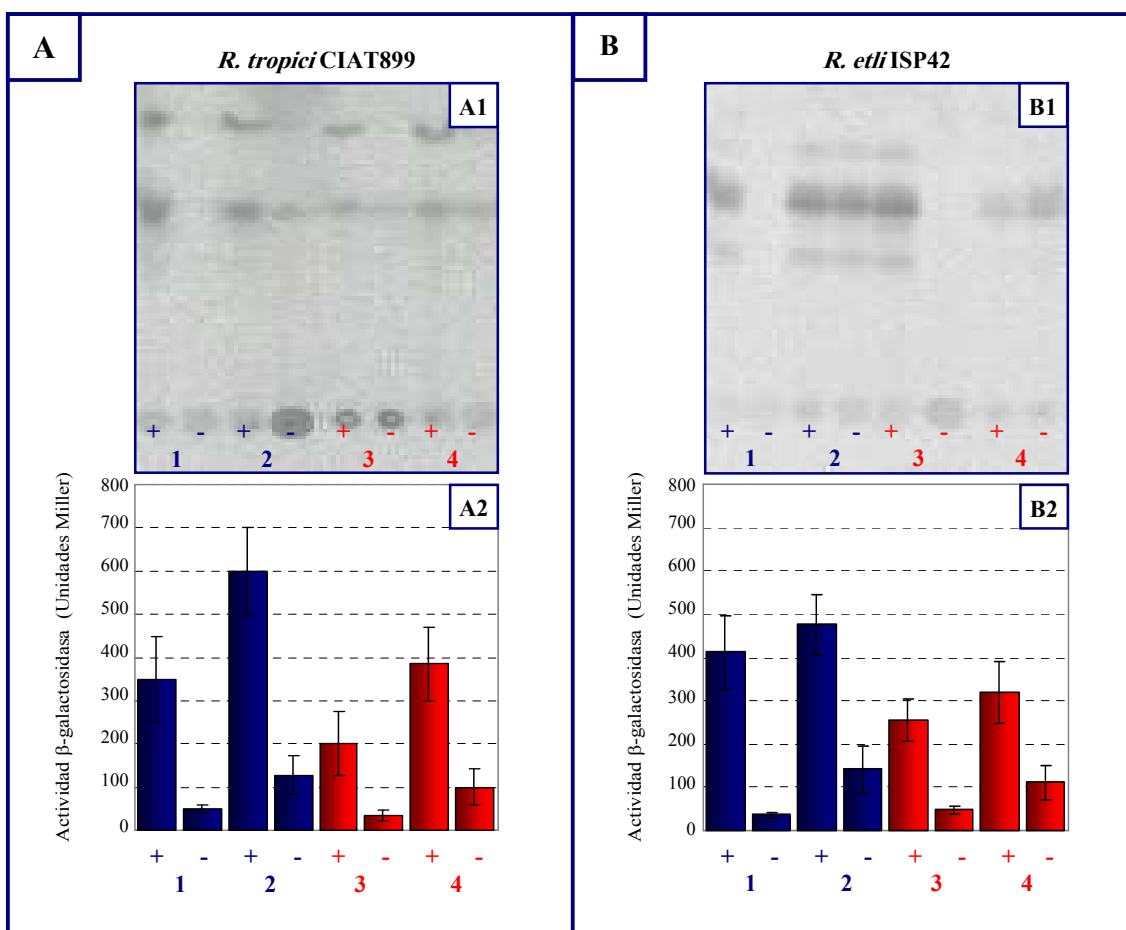
Primeramente, se realizó la puesta a punto de la metodología utilizada, dado que los datos bibliográficos en este tema son escasos y, por lo general, para estudiar la inducción de genes de nodulación se utilizan fracciones purificadas de exudados (Burdam *et al.*, 1996).

La figura 4.15. nos muestra el estudio simultáneo de los perfiles cromatográficos de los factores Nod sintetizados por los rizobios que nodulan judía (*R. tropici* CIAT899 (panel A1) y *R. etli* ISP42 (panel B1)), en relación con la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada uno (paneles A2 y B2, respectivamente), la cual nos informará de los niveles de expresión de sus correspondientes genes *nod* frente a los exudados de su hospedador. Las condiciones con signo positivo indican la adición del flavonoide comercial inductor seleccionado para cada cepa, a una concentración final de 1  $\mu$ M (apigenina para *R. tropici* CIAT899 y naringenina para *R. etli* ISP42). Se incluyeron igualmente las condiciones de estudio de medio mínimo B<sup>-</sup>, con o sin flavonoide, así como el exudado en cuestión adicionado de flavonoide, a modo de control interno del ensayo, y para determinar la existencia de moléculas inhibitoras de la expresión de los genes *nod* en los correspondientes exudados.

En primer lugar se analizó la capacidad inductora de los exudados de judía obtenidos tanto en condiciones control como de estrés salino (paneles A2 y B2, barras 2 y 4 negativas), en comparación con el medio B<sup>-</sup> libre de inductor (barras 1 y 3 negativas). Paralelamente, la comparación de los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa registrados en el medio B<sup>-</sup> adicionado de inductor (paneles A2 y B2, carril 1 positivo) con respecto a los obtenidos en los exudados de judía (control y salino) igualmente adicionado de inductor (paneles A2 y B2, carril 2 y 4 positivo) nos confirma la ausencia de moléculas inhibitoras de dicha expresión en los exudados estudiados, puesto que los niveles obtenidos en presencia de los mismos no decaen con respecto a los registrados en la condición de crecimiento control (medio mínimo B<sup>-</sup>).

Asimismo, hemos de destacar que, al añadir flavonoide comercial a los exudados control y salino, se registró un efecto sumatorio de la capacidad inductora de las moléculas presentes en el exudado y el inductor empleado. No obstante, este fenómeno únicamente fue significativo para el caso de *R. tropici* CIAT899 (panel A2, barra 2 y 4 positiva), doblando la actividad registrada en esta condición los niveles obtenidos en el medio B<sup>-</sup> adicionado de flavonoide (panel A2, barra 1 y 3 positiva, respectivamente).

Un fenómeno similar nos encontramos para la expresión de los genes *nod* de *R. etli* ISP42, existiendo una disminución del 33% de la actividad  $\beta$ -galactosidasa entre la condición control y la condición de estrés salino.



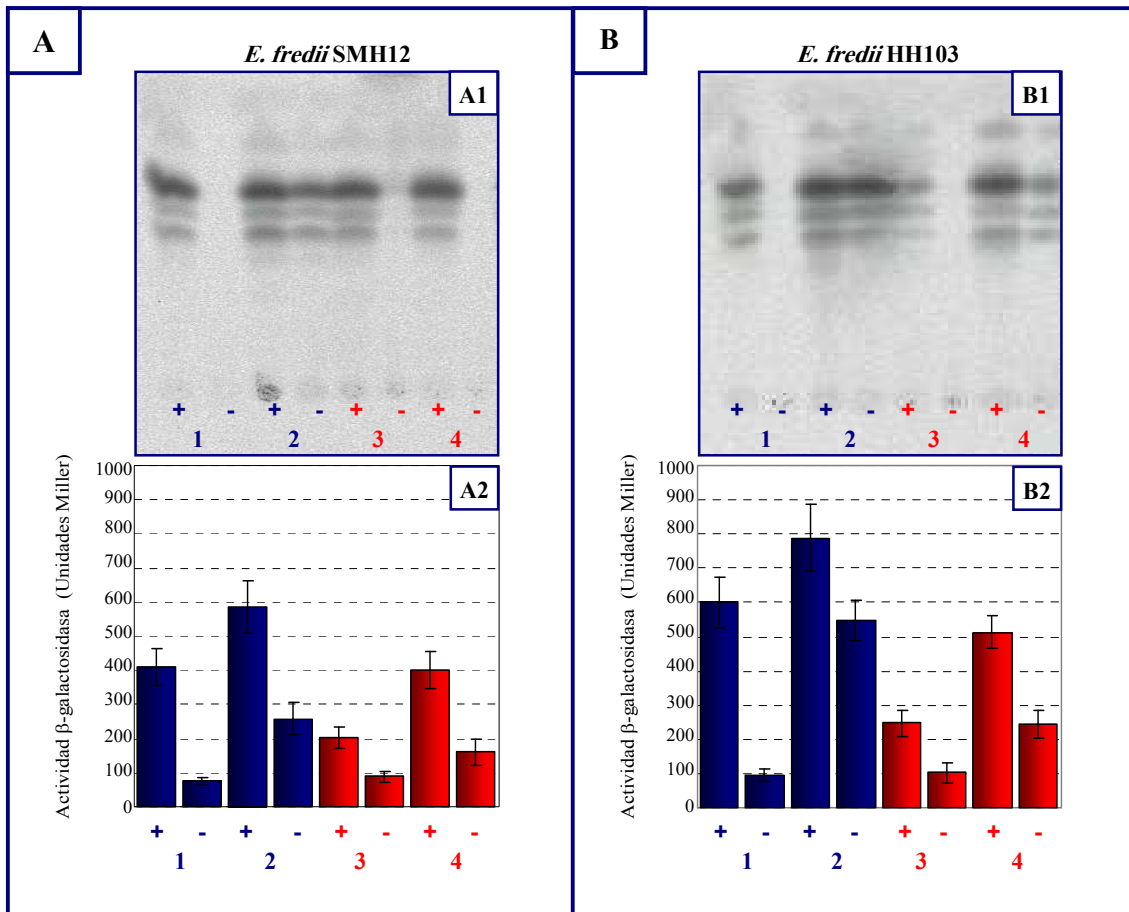
**Figura 4.15.** Efecto de los exudados de *P. vulgaris* cv. BBL obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), sobre *R. tropici* CIAT899 (panel A) y *R. etli* ISP42 (panel B). Paneles A1-B1.- Análisis de los factores Nod producidos en presencia de  $^{14}\text{C}$  *N*-acetilglucosamina. Paneles A2-B2.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional *nodA::lacZ* del plásmido pMP240. Condiciones: 1, medio mínimo B; 2, exudado control; 3, medio mínimo B 50 mM de NaCl y 4, exudado 50 mM de NaCl. Los valores señalados con signo positivo (+) aluden a condiciones inducidas con el flavonoide correspondiente 1  $\mu\text{M}$  (apigenina para *R. tropici* CIAT899 y naringenina para *R. etli* ISP42), los representados con signo negativo (-) carecen de inductor adicionado. Los datos se representan en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

En líneas generales, la capacidad inductora de los exudados sufrió cambios en función del medio de recolección, puesto que se observó una leve disminución de la actividad  $\beta$ -galactosidasa total de las dos cepas nodulantes de judía en presencia del exudado salino (figura 4.15., paneles A2 y B2, barra 4 positiva y negativa) con respecto al exudado control (paneles A2 y B2, barra 2 positiva y negativa). Esta disminución sólo fue significativa para los valores de actividad  $\beta$ -galactosidasa registrados con los exudados adicionados de flavonoide comercial (barra 4 positiva frente a 2 positiva). Este cambio en la expresión de los genes de nodulación podría verse reflejado en una

consecuente disminución de la cantidad de factores Nod sintetizados. Sin embargo, el perfil de CCF de *R. tropici* CIAT899 no sufrió modificación alguna en condiciones salinas con respecto a la condición control (figura 4.15., panel A1, carriles 3 y 4 frente a 1 y 2, positivos y negativos) mientras que la cepa *R. etli* ISP42 sí registró una disminución notable en la producción de factores Nod tras inducción por exudados salinos (figura 4.15., panel B1, carril 4 negativo) con respecto a la inducción por exudados control (panel B1, carril 2 negativo). No obstante, sí hemos de indicar un interesante cambio en el perfil de factores Nod de *R. tropici* CIAT899, puesto que no sintetiza factores Nod sulfatados (banda superior de la placa cromatográfica) en presencia de exudados de judía control y salinos y ausencia de flavonoide (carriles 2 y 4 negativos), a diferencia de lo observado en las condiciones adicionadas de flavonoide (medio B<sup>-</sup>, carriles 1 y 3 positivos; o exudado, carriles 2 y 4 positivos).

A continuación, se estudió el efecto de los exudados de plantas de soja (*G. max* cv. Osumi) sobre la expresión de los genes *nod* de sus simbioses (*E. fredii* SMH12 y HH103), siguiendo las mismas pautas establecidas para el ensayo anterior con los exudados de judía. Así, la figura 4.16. nos muestra los estudios de actividad  $\beta$ -galactosidasa (paneles A2 y B2) y CCF de los factores Nod de estas dos estirpes (paneles A1 y B1), en presencia de exudados de soja obtenidos en condición control (condición 2, positivo y negativo) y de estrés salino (50 mM NaCl, condición 4, positivo y negativo), así como en medio mínimo B<sup>-</sup> control y salino (condiciones 1 y 3, positivas y negativas respectivamente). Todas las condiciones indicadas se estudiaron en presencia y ausencia de genisteína 1  $\mu$ M como flavonoide inductor (signos positivo y negativo, respectivamente).

Al igual que ocurriese con los exudados de judía, se registró actividad inductora por parte de los exudados de soja control y salino sobre ambas cepas de *E. fredii*, mayor para la estirpe HH103 que para SMH12, desechando así la posibilidad de alguna molécula inhibidora presente en el exudado. Igualmente, se volvió a observar el efecto sumatorio en la expresión de los genes *nod* al añadir genisteína 1  $\mu$ M al exudado en cuestión, de forma más notable para los exudados salinos, quienes de nuevo registraron en conjunto valores de inducción más bajos que los exudados control. En líneas generales, las cepas nodulantes de soja mostraron unos niveles de inducción mayores que los anteriores obtenidos por CIAT899 e ISP42 frente a los exudados de judía, si bien registraron comportamientos distintos entre sí.



**Figura 4.16.** Efecto de los exudados de *G. max* cv. Osumi obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), sobre *E. fredii* SMH12 (panel A) y HH103 (panel B). Paneles A1-B1.- Análisis de los factores Nod producidos en presencia de  $^{14}\text{C}$  N-acetilglucosamina. Paneles A2-B2.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la fusión transcripcional *nodA::lacZ* del plásmido pMP240. Condiciones: 1, medio mínimo B<sup>-</sup>; 2, exudado control; 3, medio mínimo B<sup>-</sup> 50 mM de NaCl y 4, exudado 50 mM de NaCl. Los valores señalados con signo positivo (+) aluden a condiciones inducidas con genisteína 1  $\mu\text{M}$ , los representados con signo negativo (-) carecen de inductor adicionado. Los datos se representan en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

*E. fredii* SMH12 mostró una respuesta heterogénea frente a los distintos exudados empleados. En presencia de todos ellos se observó inducción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la cual disminuyó levemente en presencia de exudados salinos con respecto a los niveles registrados en presencia de exudados control (figura 4.16., panel A2, barras 4 y 2 respectivamente, ambas negativas), fenómeno extrapolable al resto de los rizobios estudiados tal y como ya hemos adelantado. Sin embargo, al analizar la CCF, no fue posible la visualización de banda alguna en la placa en presencia de exudados salinos (figura 4.16., panel A1, carril 4 negativo).

Por otro lado, *E. fredii* HH103 fue capaz de reconocer alguna molécula como inductora de sus genes de nodulación en todos los exudados utilizados, siendo considerablemente mayor el efecto registrado en presencia del exudado control que en el salino (figura 4.16., panel B2, barras 2 y 4 negativas respectivamente). Paralelamente, la CCF muestra producción de factores Nod en todas las condiciones ensayadas, donde la mayor intensidad de bandas se observó en presencia de exudados control (figura 4.16., panel B1, carril 2 positivo y negativo), fenómeno que justifica el nivel de expresión génica antes comentado.

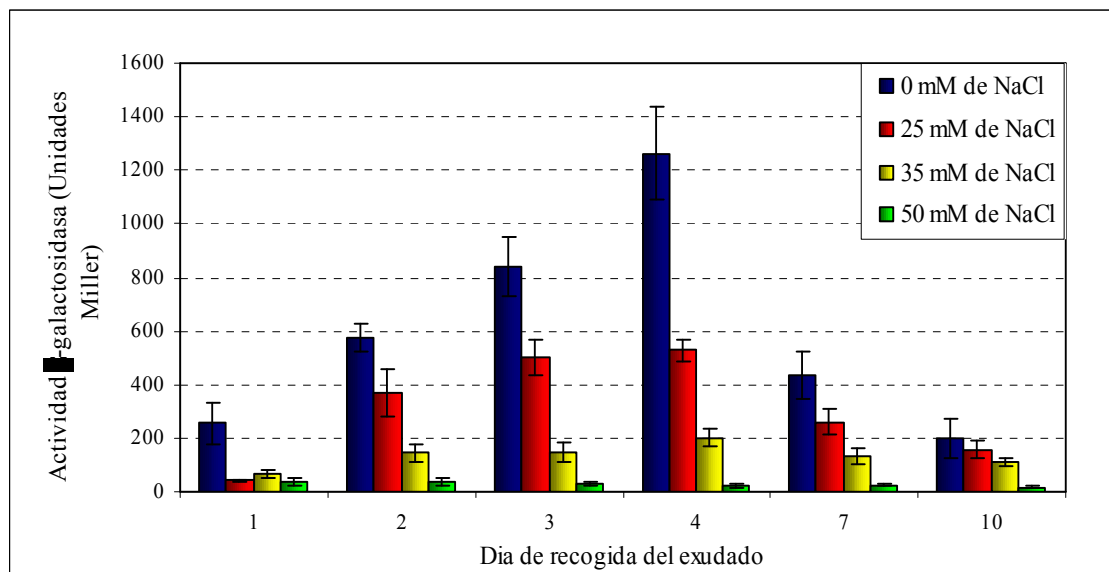
A pesar de la heterogenicidad de los resultados obtenidos de cada uno de los rizobios empleados en este estudio, podríamos resumir tres aspectos comunes a todos ellos: disminución de la actividad inductora de los exudados salinos con respecto a los obtenidos en condición control, efecto sumatorio del flavonoide comercial para con los exudados empleados y ausencia de moléculas inhibitorias en los exudados obtenidos de ambos cultivares.

#### **4.2.1.2. Estudio de la actividad inductora de los exudados de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa sobre los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899, en condiciones control y de estrés salino.**

Los resultados obtenidos para *R. tropici* CIAT899 sobre la producción de factores de nodulación con exudados de judía obtenidos después de 7 días (figura 4.15., panel A1, carril 2 y 4 negativos), donde se observó la pérdida de la banda sulfatada, nos hizo plantear el estudio de la actividad  $\beta$ -galactosidasa con exudados obtenidos a diferentes tiempos. Para estos estudios se utilizó el cultivar Negro Jamapa de *P. vulgaris*.

Se empleó una nueva cepa indicadora, *R. leguminosarum* RBL5280 (pMP280, pMP154, ver Material y Métodos, tablas III.1. y III.2.) la cual posee un plásmido portador del gen *nodD* de *R. leguminosarum* bv. *viciae* (pMP280) que nos permitirá un mejor registro de los niveles de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, codificada a su vez por un segundo plásmido (pMP154), portador de la fusión indicadora promotor *nodA::lacZ*. De este modo, se crecieron 6 plantas individuales por cada condición de ensayo (control y salina) y se recogieron alícuotas de 1 mL de los exudados radicales durante 10 días en 6 momentos distintos del ensayo (días 1, 2, 3, 4, 7 y 10), con el fin de comprobar en qué medida se modificaba la actividad inductora de los exudados de judía en función de las condiciones de crecimiento y del día de recolección. Así, la figura 4.17. nos muestra la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa indicadora *R. leguminosarum* RBL5280 inducida

con exudados de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa obtenidos en condiciones control y de estrés salino (25, 35 y 50 mM de NaCl).



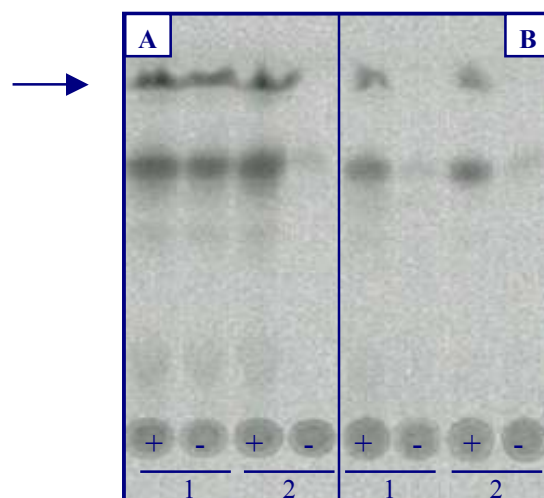
**Figura 4.17.** Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa *R. leguminosarum* RBL5280 inducida con exudados de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa obtenidos en condiciones control y de estrés salino (25, 35 y 50 mM de NaCl). Los datos se representan en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

En ella se observa como la capacidad inductora de los exudados aumenta desde el día primero de recogida hasta el cuarto, alcanzando entonces su máximo de inducción, para posteriormente ir disminuyendo hasta el décimo día, de forma semejante al fenómeno descrito por van Brussel *et al.* (1990) para *V. sativa* subsp. *nigra*. Al mismo tiempo, los valores registrados mostraron una tendencia indirectamente proporcional a la concentración salina del medio. Efectivamente, se observó una clara disminución de aproximadamente un 55% de los valores registrados en el cuarto día para los exudados 25 mM de NaCl con respecto a los controles, y así sucesivamente hasta alcanzar niveles mínimos de actividad inductora para los exudados en 50 mM de NaCl.

Esta mayor actividad inductora de los exudados recogidos al cuarto día, nos indujo a pensar que los análisis llevados a cabo con los exudados de judía obtenidos en el séptimo día (ver Material y Métodos, apartado 3.8.3.) podrían no representar el óptimo de la capacidad inductora de los mismos. Por ello, realizamos un estudio por CCF de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 inducida con exudados obtenidos de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa al cuarto y séptimo día (figura 4.18.). Efectivamente, gracias al ensayo mostrado en la figura 4.18. pudimos corroborar los datos anteriores de actividad  $\beta$ -galactosidasa (figura 4.17.) al observarse una mayor producción de factores Nod tras



inducción con exudados de cuatro días (panel A, carril 1 negativo) que con exudados de siete días (panel B, carril 1 negativo).



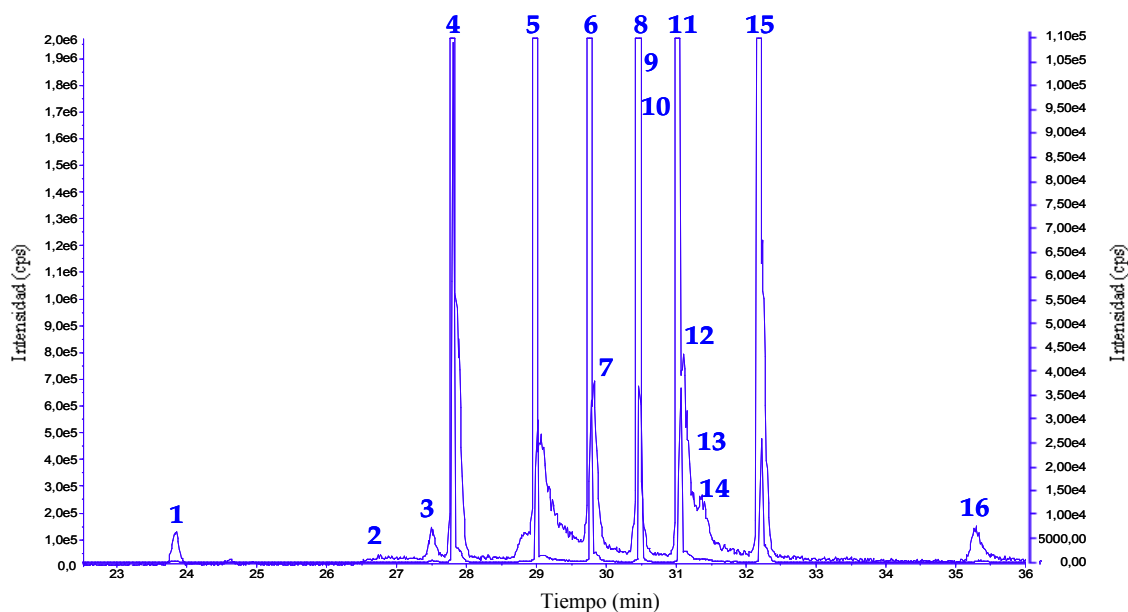
**Figura 4.18.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 crecida en exudados de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa (carril 1) o en medio mínimo B<sup>-</sup> (carril 2), obtenidos a los 4 (panel A) y 7 días (panel B). Se empleó apigenina 1 μM como inductor en los carriles con signo positivo (+).

Asimismo, la bacteria sintetizó factores Nod sulfatados (señalados con una flecha), lo cual nos corrobora los cambios cualitativos y/o cuantitativos de las moléculas inductoras presentes en el exudado a lo largo del tiempo. No obstante, podría tratarse de cambios en el fenómeno de biosíntesis de los factores Nod como consecuencia de cambios fisiológicos que afecten a la propia bacteria, ya que el pH de los exudados recogidos a 4 días (5,2) es menos ácido que el de los obtenidos a 7 días (4,5).

#### 4.2.1.3. Estudios por HPLC y Espectrometría de Masas de los exudados de raíces de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi, obtenidos en condiciones control y de estrés salino.

Los resultados del apartado anterior confirmaron la existencia de cambios en la actividad inductora de los exudados de judía y soja como consecuencia del estrés salino. Sin embargo, no se pudo precisar la naturaleza cuali o cuantitativa de estas modificaciones, por lo que sería necesario llevar a cabo estudios alternativos que demostraran si varía la composición química de dichos exudados según la condición ambiental en que se encuentre la planta. Con este fin, se recurrió en primer lugar al estudio mediante técnicas cromatográficas (HPLC) de la composición de los exudados obtenidos en ambas condiciones (control, 0 mM de NaCl, y estrés salino, 50 mM de NaCl), según el protocolo descrito por Dakora *et al.* (1993a) y modificado por el grupo

de investigación que dirige el Dr. A. Gil-Serrano (comunicación personal). Concretamente, se restringió el marco de búsqueda a aquellas regiones de absorbancia característica de los flavonoides (espectro UV), moléculas cruciales en el establecimiento de la simbiosis rizobio-leguminosa, por lo que constituirán el punto central del estudio de la composición química de los exudados. Estos análisis fueron realizados en colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. A. Gil-Serrano (Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de Sevilla). Según se describe en el apartado 3.8.7. de Material y Métodos, se estableció como punto de partida la realización de los cromatogramas de HPLC de flavonoides comerciales que serán empleados como patrones de estos ensayos. Los datos obtenidos se muestran en la figura 4.19..



**Figura 4.19.** Cromatograma de HPLC de los flavonoides empleados como patrones de ensayo en el estudio de los exudados de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi. 1, umbeliferona; 2, fisetina; 3, 4,7'-dihydroxiflavona; 4, daidzeína; 5, quercetina; 6, luteonina; 7, naringenina; 8, morina; 9, hesperetina; 10, genisteína; 11, apigenina; 12, kaempferol; 13, lisetina; 14, coumestrol; 15, isoliquiritigenina y 16, crisina. Los flavonoides 7 y 12 tienen como eje de ordenadas el situado a la derecha, los restantes el de la izquierda.

Una vez elaborados los perfiles cromatográficos de los patrones seleccionados, se procedió al análisis por HPLC de los exudados de judía y soja obtenidos en condiciones control y en 50 mM de NaCl. Sin embargo, con este tipo de análisis no se obtuvieron resultados adecuados dada la escasa resolución de los cromatogramas obtenidos, que no permitían una identificación fácil y precisa del perfil cromatográfico característico de cada flavonoide, dificultándose por lo tanto la identificación de los mismos. Por este

motivo recurrimos al diseño y optimización de protocolos alternativos de análisis de flavonoides más acordes con las nuevas metodologías empleadas en el estudio de la composición de exudados y basados en los principios analíticos de la Espectrometría de Masas (Fan *et al.*, 2001; Ríos *et al.*, 2005).

Gracias a esta nueva metodología que combina técnicas de RMN, CID y HPLC, puesta a punto por el grupo de investigación del Dr. A. Gil-Serrano y detallada ampliamente en el apartado 3.8.7. de Material y Métodos, se pudo identificar de forma más rigurosa determinados flavonoides presentes en las muestras de exudados. No obstante debemos de advertir la limitación que supone el empleo de una determinada base de datos de patrones de flavonoides, de manera que puede que omitamos determinada información acerca de la composición de la muestra por el mero hecho de carecer de patrones frente a los que comparar.

La tabla IV.4. nos muestra los flavonoides identificados en los exudados de *P. vulgaris* cv. BBL obtenidos en condiciones de crecimiento control y de estrés salino (50 mM de NaCl). Los números que se encuentran entre paréntesis nos indican la posible variación en el tiempo de retención que pueda sufrir cada componente dentro de su cromatograma de HPLC con respecto al valor característico que registre su patrón correspondiente. Este fenómeno se debe principalmente a la evaporación de solvente durante la manipulación de la muestra, que afectará levemente al perfil cromatográfico obtenido. Sin embargo, aquellas variaciones superiores a 2 minutos y 30 segundos sí constituyen cambios significativos, puesto que nos permiten la identificación de flavonoides que se encuentran glicosilados. Los azúcares con los que se encuentran conjugados fueron glucosa y ramnosa mayoritariamente.

**Tabla IV.4.** Flavonoides identificados en exudados de *P. vulgaris* cv. BBL obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl).

Judía Control	Judía Estrés Salino
Umbeliferona (+0,8 min)	Umbeliferona (+0,8 min)
Naringenina (+0,35 min)	Naringenina
Hesperetina	Hesperetina
Daidzeína (+2,4 min)	Daidzeína (+0,2 min)
4,7'-Dihydroxiflavona (+1,0; +2,8 min)	4,7'-Dihydroxiflavona (+0,8; +2,8 min)
Isoliquiritigenina (-4,4 min)	Isoliquiritigenina (-4,5 min)
Quercetina (+3,1 min)	Quercetina (+0,3 min)
Luteonina (+0,4 min)	

En condiciones control se registró un total de 8 flavonoides, de los cuales 7 fueron determinados igualmente en condiciones salinas, a excepción de la luteonina. Asimismo, la percepción anteriormente indicada acerca de la variación en los tiempos de retención nos permitió reconocer las estructuras glicosiladas de los flavonoides daidzeína y quercetina en el exudado control (con un monosacárido), y 4,7'-dihydroxiflavona e isoliquiritigenina en control y salino (con uno y dos respectivamente).

Seguidamente, se procedió al análisis de los exudados de *G. max* cv. Osumi, obtenidos igualmente en condiciones control y de estrés salino, empleándose la misma metodología detallada para los exudados de judía. Los distintos flavonoides identificados para soja se recogen en la tabla IV.5..

**Tabla IV.5.** Flavonoides identificados en exudados de *G. max* cv. Osumi obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl).

<b>Soja Control</b>	<b>Soja Estrés Salino</b>
Umbeliferona (+1,2 min)	Umbeliferona (+1,4 min)
Naringenina (+0,5 min)	Naringenina (+0,6 min)
Apigenina (-5,8; -3,5)	Apigenina (-3,4 min)
4,7'-Dihydroxiflavona (-1,9 min)	4,7'-Dihydroxiflavona (-1,8; +1,3; +3,1 min)
Isoliquiritigenina (-4,5 min)	Isoliquiritigenina (-4,0 min)
Quercetina (+1,0 min)	Quercetina (+0,3 min)
Genisteina (-5,2 min)	Morina
Daidzeína (-1,9 min)	

Nuevamente se registraron cambios en la composición del exudado de la leguminosa en función de las condiciones medioambientales de crecimiento de la planta, puesto que en los exudados control se determinaron 8 flavonoides, mientras que bajo estrés salino se observaron 7, que no siempre coincidieron con los anteriores. De hecho, bajo condiciones control se determinaron las isoflavonas daidzeína y genisteína, no presentes en exudados salinos, del mismo modo que en este último se identificó la morina, no presente en el control. También se modificó la glicosilación de la apigenina (glicosilada en ambos exudados, pero con un sólo monosacárido en exudado control, y con uno o dos en exudado salino), mientras que la genisteína se encontraba glicosilada únicamente en exudados control y la isoliquiritigenina en control y salino.

De los resultados obtenidos podemos confirmar que la composición de los exudados de judía y soja se ve modificada bajo condiciones de estrés salino.

#### **4.2.2. Efecto del estrés abiótico sobre los estadios iniciales de la interacción rizobio-leguminosa: estudio de la actividad biológica de los factores Nod de cepas nodulantes de *G. max* cv. Osumi y *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa.**

Numerosos son los trabajos que han estudiado a lo largo de los últimos años el efecto de determinados extractos moleculares sobre los estadios iniciales de la simbiosis rizobio-leguminosa. Entre éstos encontramos los denominados “ensayos de actividad biológica”, cuya base teórica consiste en la observación de respuestas específicas por parte de la planta frente a una muestra, biológica o no, que se desee ensayar (Reliç *et al.*, 1993; López-Lara *et al.*, 1995; Duzan *et al.*, 2006). El estudio se considera “positivo”, es decir, el extracto probado en la planta es “biológicamente activo” cuando se observa inicio de primordio nodular, primordio nodular y/o nódulo. Asimismo, también se designan como positivos aquellos ensayos que muestren los fenotipos “Hac” (root hair curling), “Had” (root hair deformation) o aquel fenotipo caracterizado por una cuantiosa formación de pelos radicales, si bien debemos advertir que se trata de un fenómeno altamente inespecífico que puede manifestarse como consecuencia de muchos otros factores que afecten al ensayo.

Para poder caracterizar en qué medida el estrés abiótico puede afectar a los primeros estadios del proceso simbiótico, los ensayos de actividad biológica se realizaron en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa y *G. max* cv. Osumi, bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino (25 mM de NaCl) puesto que era la concentración máxima tolerada por ambas plantas en el sistema hidropónico empleado (ver Discusión, apartado 5.2.). Se designaron como controles positivos de actividad biológica aquellas plantas inoculadas con su propio simbionte (nos restringimos al uso de *R. tropici* CIAT899 para judía y *E. fredii* SMH12 para soja) y como muestras a ensayar los extractos crudos de los factores Nod de los simbiontes, ante la dificultad, sobre todo para el caso de *R. tropici* CIAT899, de emplear factores Nod purificados (ver Discusión, apartado 5.2.). Estos ensayos se realizaron en

colaboración con el grupo de investigación dirigido por el Dr. A.A.N. van Brussel, de la Facultad de Biología de la Universidad de Leiden (Holanda).

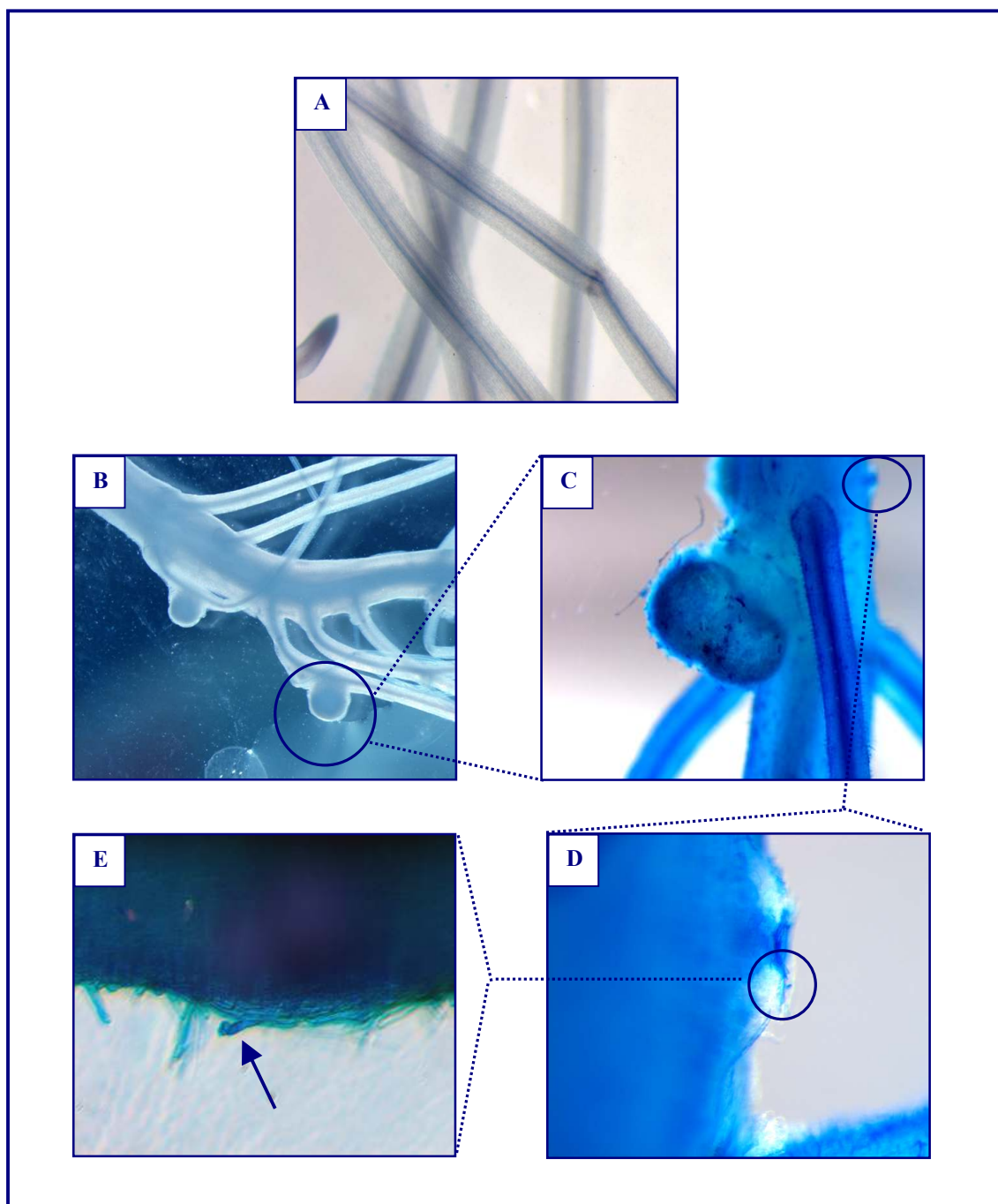
Los extractos crudos se fraccionaron en tres alícuotas en función del porcentaje de AcN de elución de los factores Nod (20, 45 y 60%), y se utilizaron 2 concentraciones distintas de los mismos,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M, estimadas en función del valor medio del peso molecular de los factores Nod (ver Discusión, apartado 5.2.). La metodología empleada se detalla ampliamente en el apartado 3.8.4. de Material y Métodos, aplicándose por igual para ambas cepas bacterianas y ambos cultivares.

#### **4.2.2.1. Estudio de la actividad biológica de los factores Nod de *E. fredii* SMH12, obtenidos en condiciones control y de estrés salino, en plantas de *G. max* cv. Osumi.**

Los ensayos de actividad biológica de los factores Nod de *E. fredii* SMH12 se realizaron en plantas de soja con el fin de concretar si los estadios iniciales de la simbiosis entre ambas especies se ven afectados o no como consecuencia del estrés salino del entorno que los rodea. Se ensayó tanto la actividad biológica de la propia estirpe bacteriana *E. fredii* SMH12 como de sus factores Nod, sintetizados en condiciones de crecimiento control (medio mínimo B<sup>-</sup> 0 mM de NaCl) y de estrés salino (medio mínimo B<sup>-</sup> 300 mM de NaCl). Paralelamente, se seleccionaron tres plantas inoculadas con la propia estirpe bacteriana (20  $\mu$ L de un cultivo  $10^8$  UFC/mL) a modo de control positivo del ensayo, tanto en condiciones de crecimiento control para la planta (0 mM de NaCl, pH 7,0), como de estrés salino (25 mM de NaCl, pH 7,0), y plantas inoculadas con el mismo volumen de DMSO empleado, como control negativo. La solución nutritiva empleada fue Fåhraeus (1957) (ver Material y Métodos, apartado 3.8.1.2.) y la metodología del ensayo se detalla en el apartado 3.8.4. de Material y Métodos.

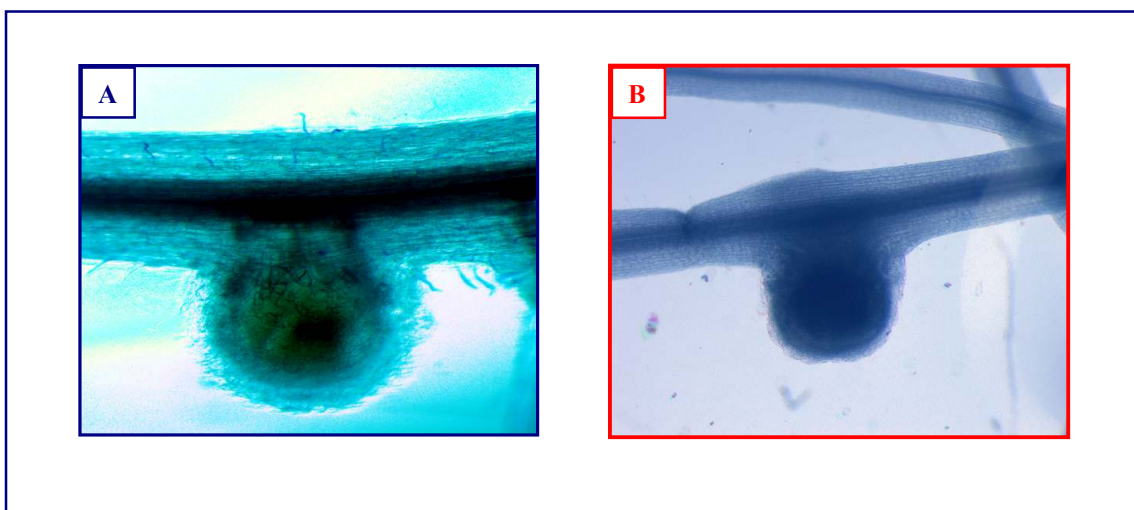
La figura 4.20. nos muestra en detalle ambos tipos de controles realizados, donde puede observarse como para el caso del control negativo (panel A) no existe evidencia alguna de actividad biológica. Las raíces se muestran sin ningún tipo de cambio, lisas y sin formaciones pilosas llamativas. Por el contrario, en el control positivo (panel B) se observa claramente la presencia de nódulos desarrollados, de morfología esférica levemente achatada, aún más detallados en el panel C. También podemos resaltar la presencia de primordios nodulares (panel D), fácilmente identificables por la división masiva de las células del córtex externo de la raíz, con una hendidura central

característica de las plantas de soja. Por último, ampliado en el panel E, se puede finalmente observar un pelo curvado (indicado con una flecha), que constituirá probablemente el inicio de un cordón de infección.



**Figura 4.20.** Estudio de la actividad biológica de la estirpe *E. fredii* SMH12 sobre plantas de *G. max* cv. Osumi crecidas en condición control (0 mM de NaCl, pH 7,0). Panel A.- control negativo (ausencia de inóculo), panel B.- nódulos de *E. fredii* SMH12, panel C.- detalle de nódulos, panel D.- detalle de primordio y E.- detalle de pelo radical curvado.

Seguidamente, se realizó el mismo ensayo de actividad biológica bajo condiciones de máxima tolerancia salina para el cultivar Osumi, esto es 25 mM de NaCl. La tasa de nodulación y el desarrollo de los nódulos y primordios se vieron levemente disminuidos con respecto a la condición control, por efecto de la sal. La figura 4.21. nos muestra un estudio comparativo del desarrollo nodular de plantas de soja crecidas bajo condiciones salinas (25 mM de NaCl, **panel B**) frente a la condición de crecimiento control (0 mM de NaCl, **panel A**), donde se puede apreciar en el mismo día de inoculación un leve retraso del desarrollo nodular como consecuencia de la sal presente en el medio de ensayo, acentuado en un menor desarrollo del nódulo.



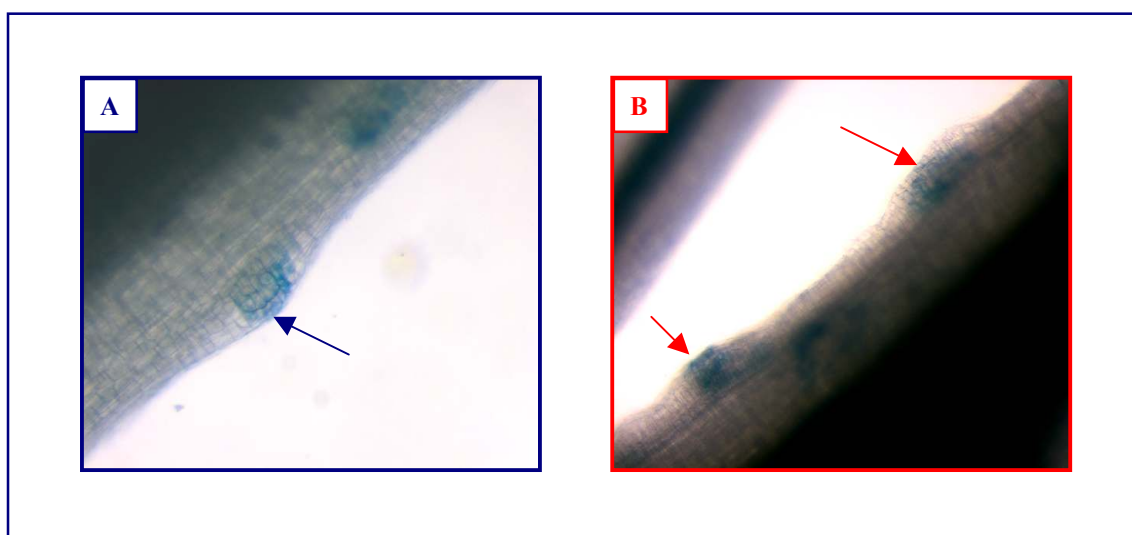
**Figura 4.21.** Estudio comparativo del desarrollo nodular de *E. fredii* SMH12 inoculada en plantas de *G. max* cv. Osumi, bajo condiciones de crecimiento control (**panel A**, 0 mM de NaCl) y de estrés salino (**panel B**, 25 mM de NaCl), ambas fotografiadas a los 10 días de la inoculación.

Una vez optimizado el ensayo de actividad biológica para el propio cultivo bacteriano *E. fredii* SMH12, se procedió a ensayar directamente sobre la planta los extractos crudos de sus factores Nod, a la espera de registrar una respuesta semejante a la obtenida cuando la bacteria está presente. De este modo, se ensayaron los factores de nodulación sintetizados por *E. fredii* SMH12 en condiciones de crecimiento control y de estrés salino (300 mM de NaCl, ver figura 4.1.), tanto inducidos como no con genisteína 1  $\mu\text{M}$  y empleados a una concentración final de  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  M. Las plantas de soja se mantuvieron en solución nutritiva Fårhaeus 0 mM de NaCl, puesto que estudios preliminares de tolerancia a la sal de este cultivo nos indicaron que el cultivar Osumi no tolera concentraciones de sal tan elevadas como 300 mM de NaCl, restringiendo de este modo el estudio del efecto del estrés salino únicamente al microsimbionte. Se registró



actividad biológica para las fracciones de 45 y 60% AcN del extracto crudo de los factores Nod inducidos, ensayados a una concentración final  $10^{-5}$  M, semejantes entre ellas en cuanto al número y desarrollo de nódulos. Sin embargo, la fracción del 20% no resultó ser biológicamente activa puesto que, por su naturaleza ligeramente hidrofóbica, la gran mayoría de los factores Nod no son solubles en porcentajes de agua tan elevados. Tampoco se registró actividad biológica al emplear factores Nod a una concentración de trabajo de  $10^{-6}$  M. Igualmente, nunca se observó actividad biológica alguna de los factores Nod sintetizados en ausencia de inductor, puesto que, tal y como nos mostraban las figuras 4.2. y 4.3., realmente *E. fredii* SMH12 no es capaz de producir factores Nod en ausencia de flavonoide bajo ninguna de las condiciones ensayadas, tanto control como de estrés salino.

Anteriormente hemos indicado que los factores Nod de *E. fredii* SMH12 sintetizados tras inducción por genisteína  $1 \mu\text{M}$  son activos biológicamente. No obstante, debemos indicar que dicha actividad no fue tan intensa como la registrada en los ensayos donde se inoculó la cepa productora (figura 4.20.), puesto que sólo se pudo observar primordios nodulares en distintos grados de desarrollo, pero que nunca dieron lugar a la formación de nódulos. La figura 4.22. nos muestra los primordios nodulares desarrollados por *G. max* cv. Osumi en respuesta a la inoculación con factores Nod sintetizados por *E. fredii* SMH12 en condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl, **panel A**) y de estrés salino (300 mM de NaCl, **panel B**).



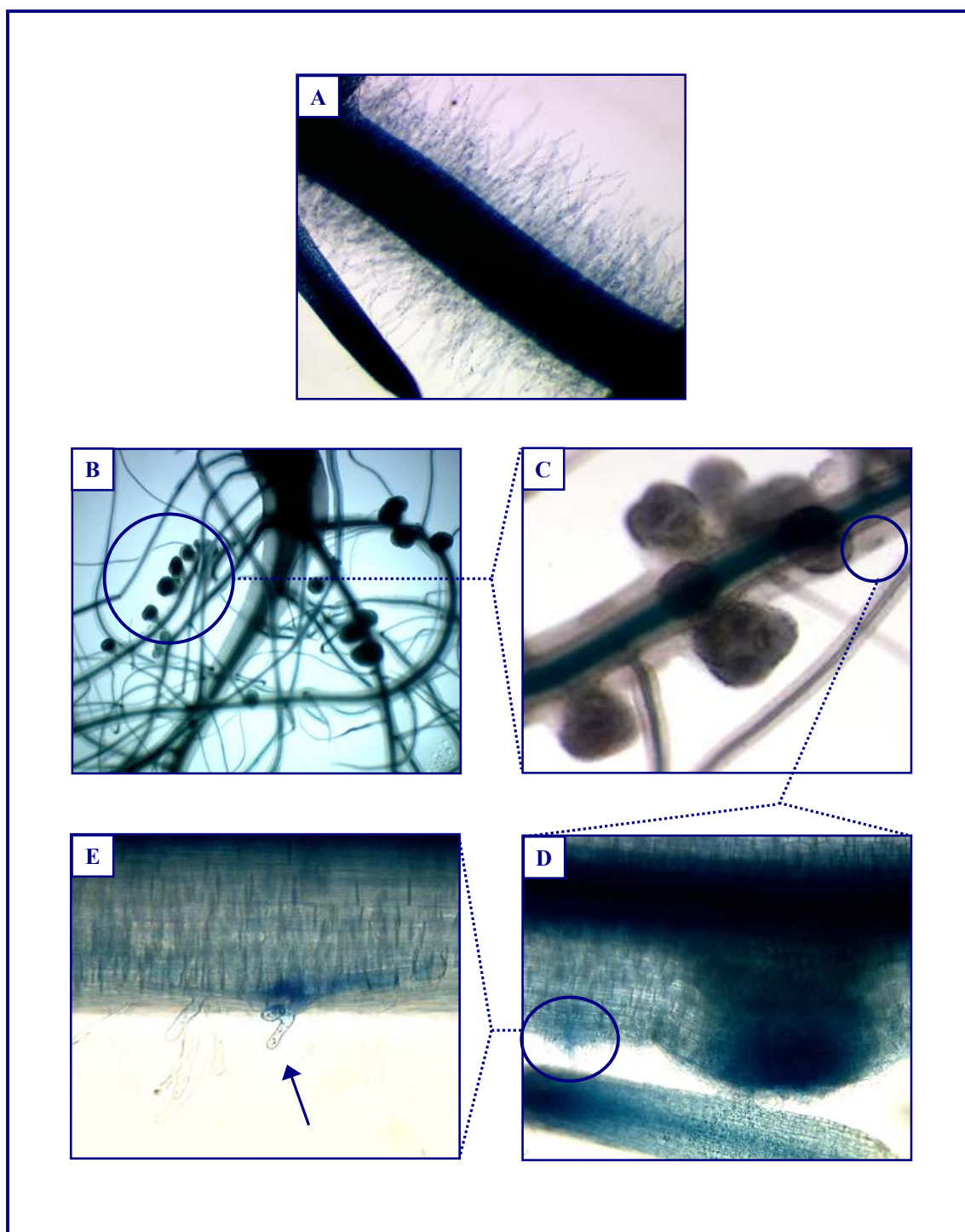
**Figura 4.22.** Estudio comparativo de la actividad biológica de los factores Nod (fracciones 45% AcN,  $10^{-5}$  M) sintetizados por *E. fredii* SMH12 bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl), en plantas de *G. max* cv. Osumi en condiciones control (0 mM de NaCl, pH 7,0).

#### 4.2.2.2. Estudio de la actividad biológica de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899, obtenidos en condiciones control y de estrés abiótico, en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa.

Tal y como se adelantó previamente, se seleccionó la cepa *R. tropici* CIAT899 para los ensayos de actividad biológica en *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa por su favorable respuesta frente a numerosos tipos de estrés ya mencionados (ver apartado 4.1.3.). Por ello, resolvimos ampliar los ensayos de actividad biológica en judía a un estudio sobre los estadios iniciales de la simbiosis *R. tropici* CIAT899-*P. vulgaris* que abarcase tanto los efectos del estrés salino como del estrés ácido (pH del medio de ensayo 4,5). De esta manera, se englobaron ambos tipos de estrés en una denominación común: estrés abiótico.

Se estableció como control positivo del ensayo plantas inoculadas con *R. tropici* CIAT899 (20  $\mu$ L de un cultivo  $10^8$  UFC/mL), con vistas al posterior test de actividad biológica de los factores Nod de dicha cepa, siguiendo las pautas descritas en el apartado 3.8.4. de Material y Métodos. Paralelamente, se fijó como control negativo plantas de judía inoculadas con el mismo volumen de DMSO que en los ensayos anteriores, carente de bacteria o factor Nod alguno.

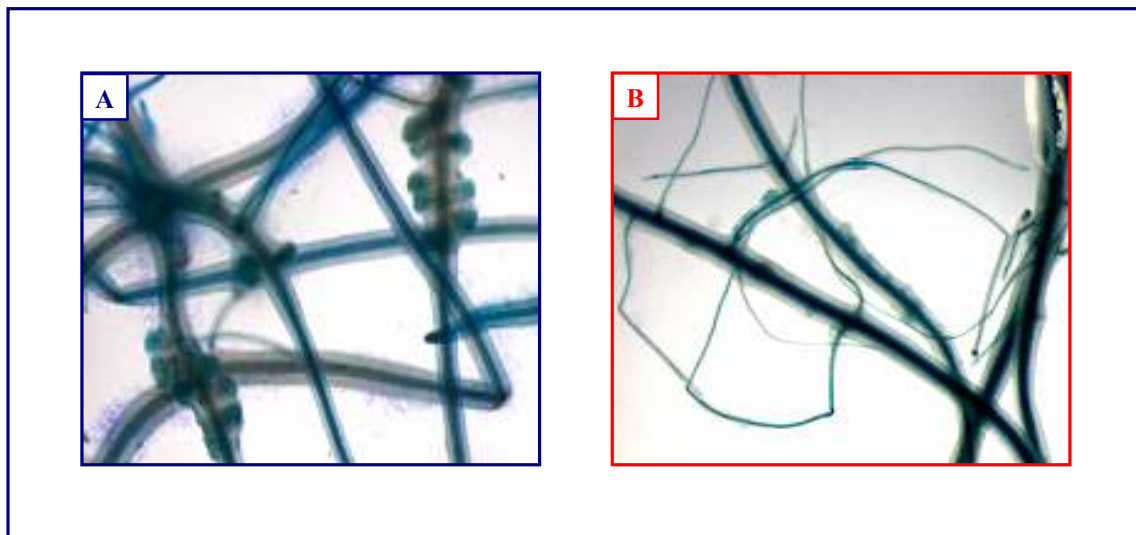
La figura 4.23. nos muestra los primeros estadios de la nodulación de *R. tropici* CIAT899 en *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. En el panel A de dicha figura (control negativo del ensayo) se confirma la ausencia total de primordios o nódulos, así como cualquier tipo de deformación específica de los pelos radicales. Por el contrario, en el panel B, correspondiente a plantas inoculadas con *R. tropici* CIAT899, se observan claramente numerosos nódulos, situados a lo largo de las raíces principal y secundarias. Estos nódulos se pueden observar con mayor detalle en el panel C, donde se aprecia claramente la morfología con forma de corazón de los mismos, adheridos a la raíz por un apéndice de diámetro pequeño y en mayor número que los registrados para la nodulación de *E. fredii* SMH12 en soja. Igualmente, difieren de éstos últimos en las morfología de los primordios nodulares, puesto que los inóculos de *R. tropici* CIAT899 en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa dan lugar a primordios puntiagudos en su inicio (panel D), levemente piramidales, carentes de la hendidura central típica de los que se observan en soja. Sin embargo, el curvamiento de los pelos sí es similar entre ambos cultivares (panel E, indicado con una flecha).



**Figura 4.23.** Estudio de la actividad biológica de la estirpe *R. tropici* CIAT899 sobre plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa crecidas en condición control (0 mM de NaCl, pH 7,0). Panel A.- control negativo (ausencia de inóculo), panel B.- nódulos de *R. tropici* CIAT899, panel C.- detalle de nódulos, panel D.- detalle de primordios y panel E.- detalle de pelo radical curvado.

Seguidamente, se repitió este mismo estudio de actividad biológica de *R. tropici* CIAT899 en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, pero esta vez en condiciones de estrés abiótico: salino y ácido. Estas condiciones de ensayo hacen referencia al empleo

de solución nutritiva Fårhaeus para la planta 25 mM de NaCl, pH 7,0 en condiciones de estrés salino y solución pH 4,5, 0 mM de NaCl en condiciones de estrés ácido, en base a estudios previos llevados a cabo con *P. vulgaris* por nuestro grupo de investigación. No se registraron cambios significativos en los ensayos llevados a cabo en medio ácido (0 mM de NaCl, pH 4,5) con respecto a los ensayos realizados en condiciones control (0 mM de NaCl, pH 7,0), a excepción de un leve retraso en el desarrollo de los nódulos, así como una leve disminución en la tasa de nodulación. Sin embargo, estos cambios fueron más significativos cuando el medio de ensayo fue salino (25 mM de NaCl, pH 7,0). La figura 4.24. nos muestra un retraso evidente en la tasa de nodulación y desarrollo de los nódulos de plantas de judía inoculadas con *R. tropici* CIAT899, crecidas en condiciones de estrés salino (25 mM de NaCl, pH 7,0, **panel B**) frente a plantas crecidas en condición control (0 mM de NaCl, pH 7,0, **panel A**).



**Figura 4.24.** Estudio comparativo del desarrollo nodular de *R. tropici* CIAT899 inoculada en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, bajo condiciones de crecimiento control (**panel A**, 0 mM de NaCl, pH 7,0) y de estrés salino (**panel B**, 25 mM de NaCl, pH 7,0), ambas fotografiadas a los 10 días de la inoculación.

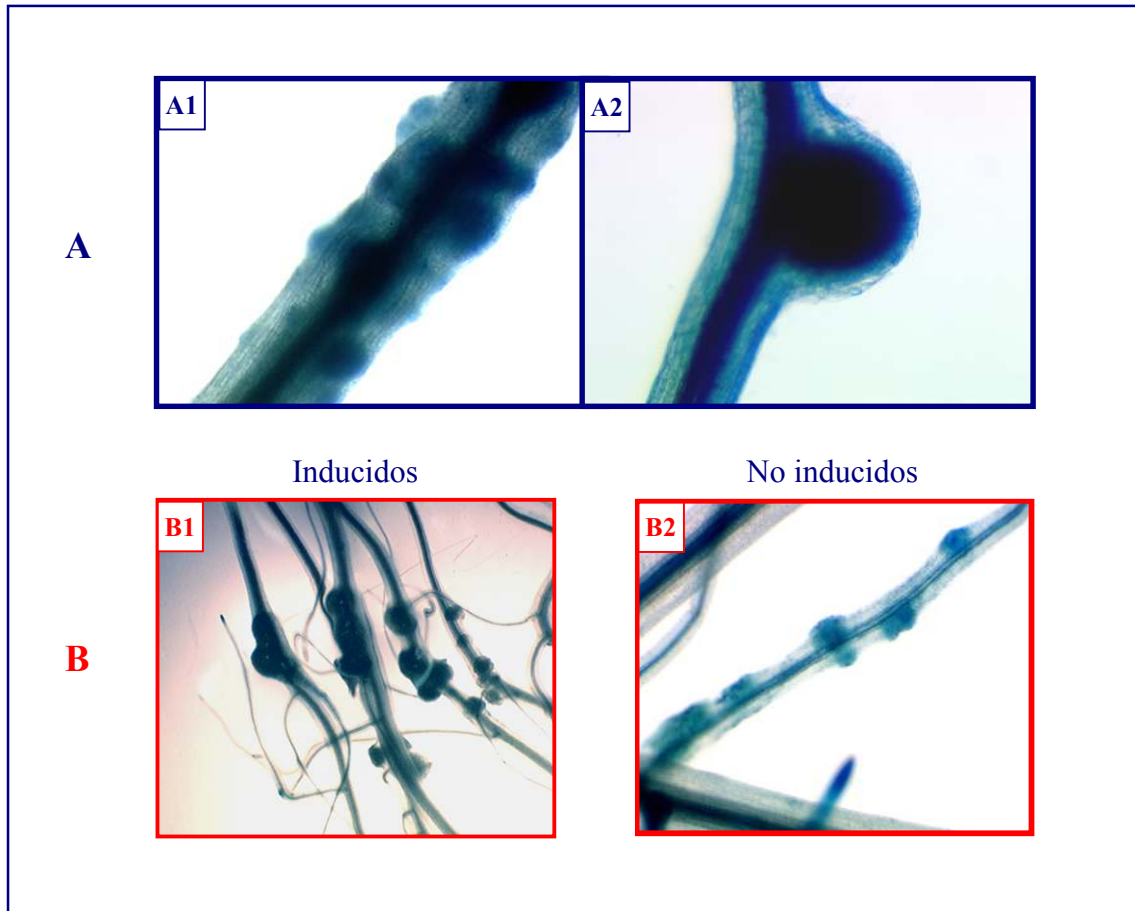
Tal y como se describe en el apartado 3.8.4. de Material y Métodos, y al igual que se realizó para el ensayo de los factores Nod producidos por la estirpe *E. fredii* SMH12 (apartado 4.2.2.1.), se purificaron los factores de nodulación de *R. tropici* CIAT899 (sintetizados tanto en condiciones control como de estrés abiótico, inducidos o no por apigenina 1  $\mu$ M), mediante técnicas de HPLC y se probó el extracto crudo de los mismos en plantas de judía, fraccionados en 3 alícuotas en función del porcentaje de AcN empleado en el proceso de elución (20, 45 y 60%). Se consideraron factores Nod

“control” aquellos obtenidos a partir de un cultivo de *R. tropici* CIAT899 crecido en medio mínimo B<sup>-</sup>, 0 mM de NaCl y pH 7,0; factores Nod “salinos” los sintetizados en medio mínimo B<sup>-</sup>, 300 mM de NaCl y pH 7,0; y factores Nod “ácidos” los producidos en medio mínimo B<sup>-</sup>, 0 mM de NaCl y pH 4,5. La producción de estos factores, y en especial bajo las dos últimas condiciones, se realizó tanto en presencia como ausencia de apigenina 1  $\mu$ M, puesto que recordemos que *R. tropici* CIAT899 sintetiza factores Nod en condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) en ausencia del inductor (ver apartado 4.1.3.).

Asimismo, hemos de indicar que en condiciones de estrés ácido (pH 4,5) se registra igualmente síntesis de factores de nodulación por parte de esta cepa en ausencia de inductor (Belén Morón, Tesis Doctoral). Dicho fenómeno se presenta independientemente de la naturaleza del tampón empleado para mantener estable el valor del pH del medio de cultivo, si bien es moderadamente más intenso cuando el buffer utilizado es de naturaleza inorgánica (citrato-fosfato) en vez de orgánica (HOMOPIPES), ya que el empleo del primero combina efectos de estrés ácido e iónico sobre la cepa bacteriana. En condición control y ausencia de inductor nunca se observó síntesis de factores Nod (figura 4.2., panel A, carril negativo); aun así se realizaron los ensayos correspondientes en esta condición a modo de control negativo del estudio.

La figura 4.25. nos muestra en primer lugar un estudio comparativo de la actividad biológica de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899, obtenidos en condiciones de estrés salino, inducidos o no por apigenina 1  $\mu$ M, frente a los sintetizados en condiciones control.

La primera sección de esta figura (paneles A1 y A2) muestra la actividad biológica registrada por los factores Nod “controles” de *R. tropici* CIAT899, sintetizados tras inducción por apigenina 1  $\mu$ M. En el panel A1 se presenta la actividad de la fracción del 45% AcN de los factores Nod a una concentración de  $10^{-5}$  M, donde se observan claramente numerosos nódulos y primordios a lo largo de toda la raíz, a semejanza del control positivo (inóculo bacteriano de  $10^8$  UFC/mL de *R. tropici* CIAT899, figura 4.23., paneles C y D). Paralelamente, el panel A2 muestra con mayor detalle el sistema vascular de uno de estos nódulos en avanzado estado de desarrollo, demostrando la potente capacidad de los factores Nod empleados de inducir estructuras nodulares de morfología muy similar a las que origina el propio inóculo bacteriano.



**Figura 4.25.** Nódulos y primordios nodulares tras inocular plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa con factores Nod  $10^{-5}$  M sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en condiciones control y de estrés salino. Fila **A.**- condiciones control (0 mM de NaCl, pH 7,0, fracciones del 45% (panel A1) y 60% (panel A2) de AcN). Fila **B.**- condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl, fracción del 45% AcN), inducido con apigenina 1  $\mu$ M (panel B1) o carente de ella (panel B2). Las plantas se crecieron bajo condición control (0 mM de NaCl, pH 7,0).

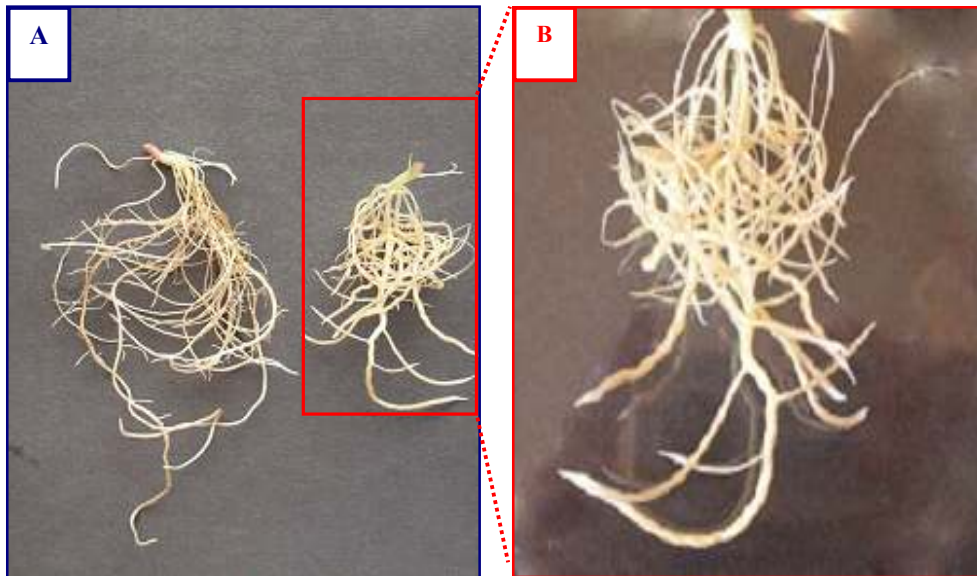
De entre todos los factores Nod ensayados en judía, fueron los sintetizados en condición control los que mostraron mayor actividad biológica puesto que se mostraron activos en concentraciones relativamente bajas ( $10^{-6}$  M) y originaron primordios y estructuras pseudonodulares al quinto día de ensayo. Además, la fracción del 45% AcN fue igual de activa que la del 60%, lo cual nos indica que tanto los factores Nod de naturaleza relativamente hidrofílica (disueltos en la fracción del 45%) como los relativamente hidrofóbicos (presentes en la fracción del 60%) son equiparables en cuanto a su actividad biológica.

Seguidamente, se procedió a analizar la actividad biológica de los factores Nod “salinos” de *R. tropici* CIAT899, es decir, sintetizados en medio B<sup>-</sup> a 300 mM de NaCl, inducidos o no por apigenina 1  $\mu$ M, representados en la figura 4.25., paneles B1 y B2 respectivamente.

Así, en el panel B1 se analiza la actividad biológica en plantas de judía tras ser inoculada con factores Nod “salinos” inducidos. Se observa claramente la formación de primordios nodulares y nódulos, cuya cantidad, morfología y distribución fue equivalente a los observados en los ensayos de los factores Nod “control” (figura 4.25., paneles A1 y A2), independientemente de la fracción del extracto crudo empleada (45 ó 60% AcN). Asimismo, se observaron primordios nodulares al quinto día de ensayo utilizando una concentración final de factores Nod  $10^{-6}$  M, del mismo modo que al emplear factores de nodulación “controles”, por lo que en principio se podrá equiparar la actividad de los factores Nod obtenidos en ambas condiciones de cultivo.

Los mismos resultados se observaron cuando los ensayos se realizaron con los factores Nod “salinos” obtenidos en ausencia de inductor (no inducidos, figura 4.25., panel B2). Este análisis nos permite confirmar que los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino y ausencia de inductor son, efectivamente, activos en plantas de judía, en la misma magnitud que sus homólogos inducidos. Esta característica podría suponer una ventaja para el cultivo bacteriano en vistas a potenciar la comunicación con su hospedador en condiciones medioambientales adversas, evitando el probable deterioro de la misma, y asegurando en la medida de lo posible la eficacia de la simbiosis que ha establecido con la leguminosa.

Tras inocular plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa con extractos crudos de factores Nod  $10^{-5}$  ó  $10^{-6}$  M, obtenidos en condiciones de estrés salino (figura 4.26., **panel B**) se observaron interesantes cambios en la morfología de la raíz con respecto a las inoculadas con extractos crudos de factores Nod “control” en la misma concentración (figura 4.26., **panel A**). La raíz se observó mas gruesa, corta y sinuosa que en condiciones control, característica del fenotipo “Tsr” descrito en otras leguminosas (del inglés “thick and short root”) (van Brussel *et al.*, 1982; van Spronsen *et al.*, 1995). Dicho fenómeno, característico de una respuesta frente al estrés, podría derivarse del efecto ejercido por los nuevos factores Nod existentes en el extracto (ver apartado 4.1.3.4.), por moléculas de naturaleza desconocida o por las trazas de sal que queden solubles en la fracción empleada tras la purificación del extracto butanólico.



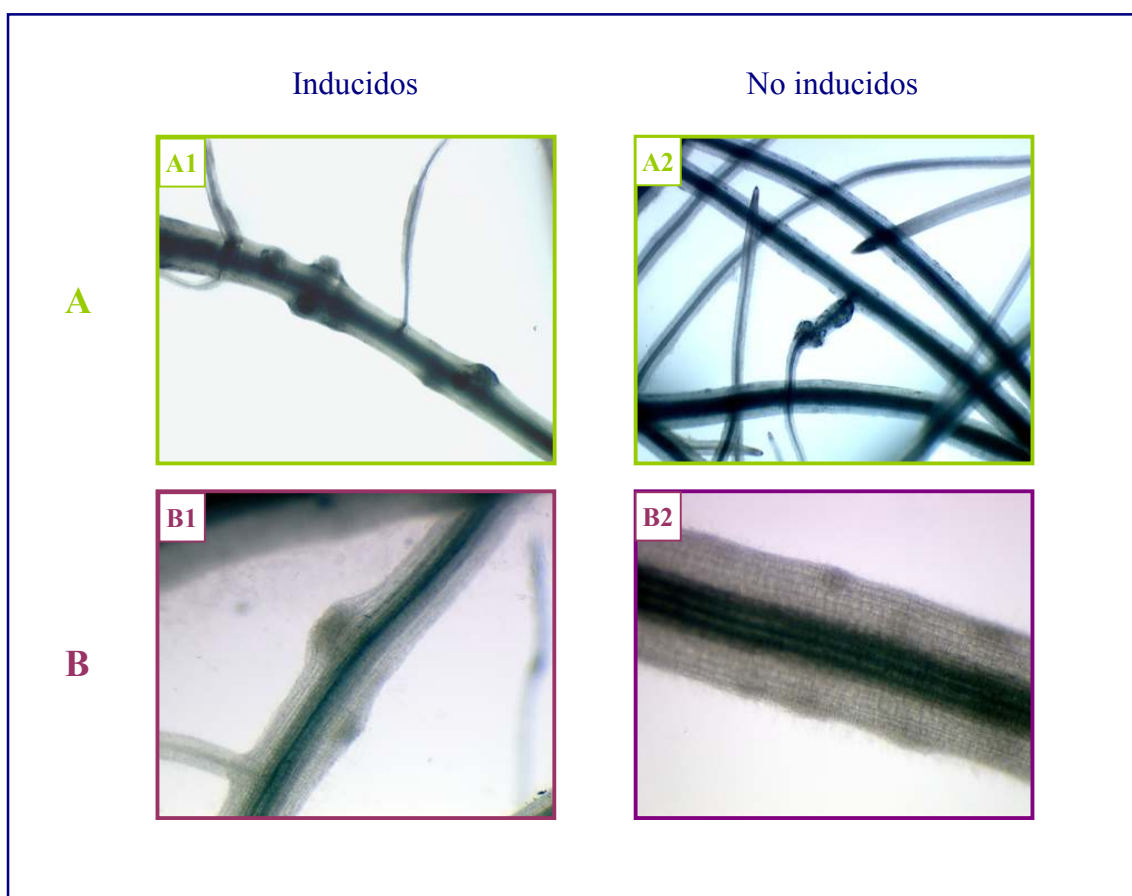
**Figura 4.26.** Raíz de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa crecida en condiciones control (0 mM de NaCl, pH 7,0), inoculada con factores Nod de *R. tropici* CIAT899 (fracción de 45% AcN,  $10^{-6}$  M) obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl, **panel A**) y de estrés salino (300 mM de NaCl, **panel B**).

Por este motivo, se realizaron estudios paralelos con medio mínimo B<sup>-</sup> 300 mM de NaCl, procesado del mismo modo que si se tratase de un cultivo bacteriano. Así, se purificó dicho extracto butanólico y sus fracciones se probaron en plantas tal y como se indicaba en los ensayos de factores Nod. Sin embargo, no se observó el fenotipo “Tsr” en este caso, descartando de este modo las posibles trazas de sal presentes en las fracciones como causantes del mismo. Por ello, en estudios futuros se deberían aplicar técnicas de distinta índole que permitan identificar el origen de este nuevo fenotipo (p. ej. microarrays de genes que se inducen por efecto del estrés en la planta como los realizados por Ueda *et al.* (2004)).

En tercer lugar se ensayaron los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido (medio mínimo B<sup>-</sup> pH 4,5), denominados comúnmente factores Nod “ácidos”. Siguiendo las indicaciones descritas al inicio de este apartado, se distinguieron dos tipos de factores a ensayar en función del buffer empleado en el medio de cultivo bacteriano: factores de nodulación sintetizados en un medio ácido tamponado con citrato-fosfato (figura 4.27., paneles A1 y A2), o tamponado con HOMOPIPES (figura 4.27., paneles B1 y B2). Se estudiaron igualmente tanto los obtenidos en presencia de inductor (apigenina 1  $\mu$ M, inducidos) como en ausencia del mismo (no inducidos) y se incluyeron dos nuevas condiciones de estudio dentro de este mismo



ensayo, en función del pH de la solución nutritiva en el que se crezca la planta. De esta forma, se ensayaron los factores Nod “ácidos” en plantas de judía crecidas en solución nutritiva pH 7,0 y en plantas en solución nutritiva pH 4,5, gracias a que la leguminosa tolera valores tan bajos de pH como su simbiote. No se logró realizar este desdoble en las condiciones del test de los factores Nod “salinos” debido a que los cultivares de *Phaseolus* que conocemos hasta el presente no toleran una concentración salina tan elevada (ver Discusión, apartado 5.2.).



**Figura 4.27.** Nódulos y primordios nodulares tras inocular plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa con factores Nod (fracción 45% AcN,  $10^{-5}$  M) sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés ácido. Fila **A**.- condiciones de estrés ácido (pH 4,5, tampón citrato-fosfato) y fila **B**.- condiciones de estrés ácido (pH 4,5, tampón HOMOPIPES). Los cultivos bacterianos fueron inducidos con apigenina  $1 \mu\text{M}$  (columna de la izquierda). Las plantas se crecieron bajo condición control (0 mM de NaCl, pH 7,0).

La figura 4.27., paneles A1 y A2, nos muestra el ensayo de actividad biológica realizado con los factores Nod “ácidos” de *R. tropici* CIAT899 obtenidos en medio ácido (pH 4,5) tamponado con citrato-fosfato, en plantas de judía crecidas a pH 7,0. Efectivamente, tanto los inducidos como los no inducidos mostraron actividad por igual,

independientemente de la fracción del extracto crudo empleada, aunque la fracción del 60% AcN pudiese ser considerada un poco más activa que la del 45%. Sin embargo, la actividad biológica de estos factores Nod no fue tan intensa como la registrada para los factores de nodulación “control” y “salinos” (ver figura 4.25.), pues únicamente dieron lugar a primordios y nódulos cuando la concentración de uso fue de  $10^{-5}$  M, nunca  $10^{-6}$  M. Asimismo, estos nódulos y primordios se encontraban en números relativamente bajos y en una fase de desarrollo temprana, apareciendo por lo general a partir del séptimo día de ensayo. No obstante, hemos de indicar que la actividad biológica se incrementó cuando el valor del pH de la solución nutritiva de la planta fue 4,5, el mismo que el del medio de producción de los factores Nod.

En la figura 4.27., paneles B1 y B2, se muestran por último los ensayos de actividad biológica de los factores Nod producidos por *R. tropici* CIAT899 en un medio ácido (pH 4,5) tamponado con HOMOPIPES. En líneas generales, no se observaron diferencias significativas con respecto a los factores Nod “ácidos” obtenidos en medio tamponado con citrato-fosfato, a excepción de una ligera disminución en la intensidad de su actividad en cuanto al número de primordios observados. Todas las demás observaciones fueron semejantes a las ya descritas en el ensayo anterior.

#### **4.2.2.3. Estudio de la actividad biológica de las fracciones purificadas de los factores Nod no inducidos de *R. tropici* CIAT899: determinación de los factores Nod sintetizados en condiciones de estrés abiótico en ausencia de flavonoide.**

Los apartados incluidos en el epígrafe 4.1. de los Resultados justificaron el fenómeno de síntesis de factores Nod por *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino y ausencia de inductor. Igualmente, se informó en el apartado anterior que este mismo comportamiento también se obtuvo bajo condiciones de estrés ácido. Si bien estos hechos se consideraron ciertamente interesantes, más extraordinaria fue aún la confirmación de que, efectivamente, estos factores Nod resultasen ser activos biológicamente.

Teniendo en cuenta estas premisas, se realizó un exhaustivo análisis de estos factores, de manera que pudiésemos confirmar la estructura de los mismos mediante técnicas de Espectrometría de Masas, ya adelantadas para los factores Nod “salinos” en

el apartado 4.1.3.4.. Con el fin de optimizar el trabajo propuesto, se fraccionaron en primer lugar los extractos crudos de los factores Nod “salinos” y “ácidos” no inducidos, por separado, mediante HPLC, recogiendo fracciones en intervalos de 5 minutos para ser probadas directamente en plantas de judía. Aquellas que resultaron ser biológicamente activas fueron las que se analizaron primeramente para caracterizar los factores Nod que serán considerados de aquí en adelante como biológicamente activos. De las restantes fracciones no activas de cada uno de los HPLC, se escogieron seis alícuotas al azar, tres del HPLC “salino” y tres del HPLC “ácido”, con el fin de confirmar paralelamente la ausencia de factores Nod en ellas.

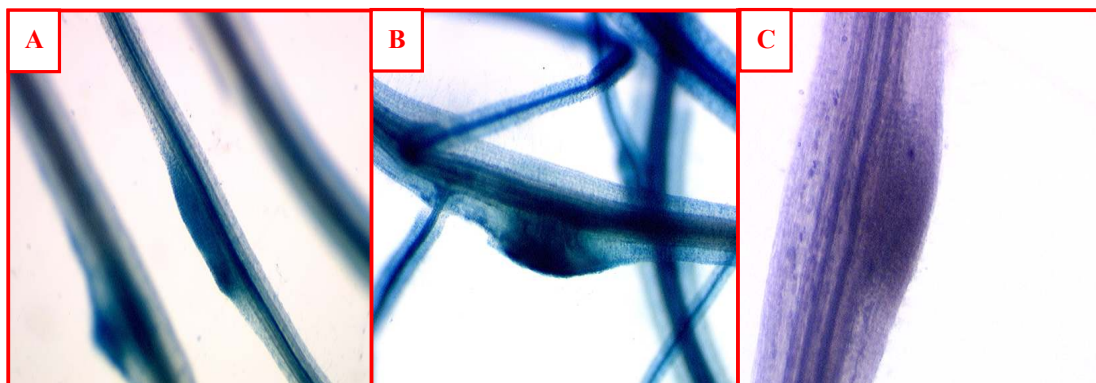
Las fracciones obtenidas del HPLC de los factores Nod “salinos” no inducidos que presentaron actividad biológica fueron las recolectadas en los minutos 10, 20, 25, 30, 50, 55 y 70 ,(la fracción del minuto 10 se corresponde con la recogida de muestra entre los minutos 10 y 14, y así sucesivamente en intervalos de 5 minutos). Al realizar el ensayo de actividad biológica, todas ellas fueron capaces de formar primordios en mayor o menor grado de desarrollo, más nunca se alcanzó el estadio final de nódulo tras 10 días de ensayo.

Si retomamos los datos recogidos en la tabla IV.3. (ver Apéndice, p.: 299) podemos observar cómo las fracciones del HPLC correspondientes a los minutos 10, 50 y 55 no presentan ningún factor Nod, sin embargo alguna molécula con capacidad inductora debe estar presente en dichas fracciones. No obstante, éste/os pudieron no ser identificados en el primer análisis estructural que se detalla (tabla IV.3.), bien por una baja concentración de la muestra o bien por un excesivo “ruido de fondo” del análisis. Por este motivo, se repitió el análisis estructural de las fracciones para reconfirmar los datos previos del análisis de Espectrometría de Masas de la tabla IV.3., a fin de establecer una relación razonable entre la composición de dichas fracciones y sus respuestas en los ensayos de actividad biológica en plantas.

Por el contrario, las fracciones correspondientes a los minutos 20, 25, 30 y 70 sí contienen factores Nod descritos en la tabla IV.3., y efectivamente mostraron actividad biológica, si bien fueron igualmente seleccionadas para el segundo análisis de Espectrometría de Masas que corroborase los datos ya presentados.

La figura 4.28. muestra varios ejemplos de la actividad biológica registrada por estas fracciones no inducidas en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, donde se manifiesta claramente la similitud de la morfología de cualquiera de estos primordios

con alguno de los observados en los ensayos de los factores Nod obtenidos en condiciones control (figura 4.25., paneles A1 y A2).

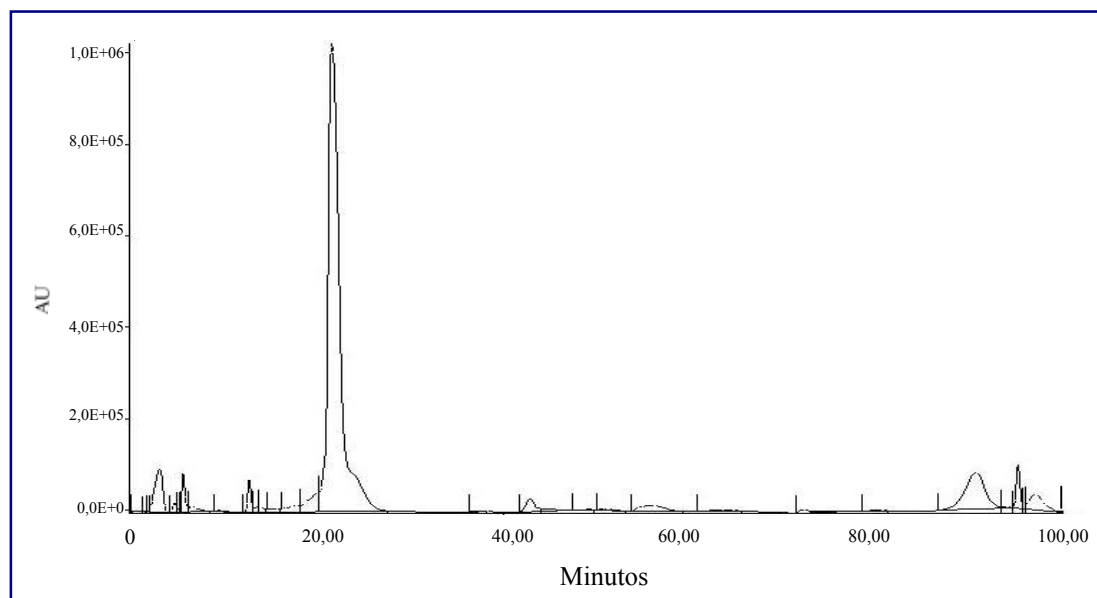


**Figura 4.28.** Primordios nodulares de plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa inoculadas con las fracciones obtenidas en los minutos **A.-** 20, **B.-** 30 y **C.-** 55, procedentes del HPLC de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 obtenidos en condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y en ausencia de inductor.

A continuación, se realizó el ensayo de las fracciones recogidas del HPLC de los factores Nod “ácidos” no inducidos, siguiendo las mismas pautas que para el ensayo anterior. Únicamente las fracciones de los minutos 10, 15, 25 y 50 mostraron esta vez actividad biológica, originando primordios en fase de desarrollo muy temprana que nunca llegaron a constituir nódulos tras 10 días de ensayo, y cuya estructura fue muy semejante a la observada en la figura 4.27. para el extracto crudo de los factores Nod “ácidos” no inducidos. Puesto que se identificó nuevamente una fracción (minuto 10) que no reportaba factor Nod alguno en un primer análisis estructural realizado por nuestro grupo de trabajo (ver Apéndice, p.: 300, tabla IV.6.), y sin embargo presentaba actividad biológica, se procedió nuevamente a un segundo análisis de Espectrometría de Masas de las estructuras moleculares contenidas en estas fracciones, a la espera de encontrar nuevos factores Nod y/o verificar los que ya estaban descritos.

Con el fin de optimizar este segundo estudio estructural de los factores Nod no inducidos “salinos” y ácidos”, se purificaron cada una de las fracciones activas o no, mediante un segundo análisis de HPLC, de manera que se introdujo de nuevo cada fracción recogida del primer HPLC individualmente en el cromatógrafo para poder eliminar impurezas presentes en la muestra y posibles contaminaciones procedentes de las alícuotas flanqueantes. De este modo se obtuvieron nuevos cromatogramas de cada una de las fracciones a analizar, que nos permitiesen desde un principio certificar la pureza de la muestra. La figura 4.29. nos muestra un ejemplo del cromatograma

obtenido tras el segundo análisis de la fracción recogida en el minuto 20 del HPLC correspondiente a los factores Nod “salinos” no inducidos de *R. tropici* CIAT899, la cual resultó ser biológicamente activa. En ella se puede apreciar el alto grado de pureza de la muestra, puesto que el máximo de señal se registra efectivamente en torno al minuto 21, minimizándose el resto de señales dispuestas a lo largo del cromatograma.



**Figura 4.29.** Cromatograma de HPLC del segundo análisis de la fracción obtenida en el minuto 20 del HPLC de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899, bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y ausencia de inductor.

Este segundo análisis estructural de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés abiótico y ausencia de inductor, se realizó en colaboración con el grupo dirigido por el Dr. Paul Hensbergen, del Departamento de Parasitología del Centro Médico Universitario de Leiden (Holanda). La metodología empleada fue similar a la utilizada en el primer análisis estructural de estos factores, detallada ampliamente en el apartado 3.6.2. de Material y Métodos y en el epígrafe 4.1.3.4. de los Resultados, basada en los principios químicos del análisis por MALDI-Q-o-Tof-MS. Los datos obtenidos se recogen en las tablas IV.7. y IV.8., correspondientes a los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en ausencia de inductor y bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) o ácido (pH 4,5) respectivamente.

**Tabla IV.7.** Factores de nodulación biológicamente activos sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl), en ausencia de apigenina. Segundo análisis.

Fracción (min)	Estructura
10	IV(C <sub>16:0</sub> , NMe); V(C <sub>16:0</sub> , NMe); V(C <sub>16:0</sub> , S); V(C <sub>16:0</sub> , NMe, S); IV(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:0</sub> , NMe); V(C <sub>18:0</sub> , Nme, S); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:1</sub> , S); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:1</sub> ); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , S); V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>20:1</sub> , NMe); V(C <sub>20:1</sub> , NMe, S); IV(C <sub>22:3</sub> , NMe); IV-Hex(C <sub>22:3</sub> , NMe); V(C <sub>22:3</sub> , NMe); V(C <sub>22:3</sub> , NMe, S)
20	IV(C <sub>14:0</sub> ); V(C <sub>14:0</sub> ); V(C <sub>14:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:0</sub> -OH); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:2</sub> , NMe)
25	IV(C <sub>14:0</sub> ); IV(C <sub>16:0</sub> , NMe); V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); III-Hex(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:1</sub> ); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); IV(C <sub>20:0</sub> , NMe); V(C <sub>20:0</sub> , NMe); V(C <sub>22:3</sub> , NMe)
30	IV(C <sub>14:0</sub> ); IV-Hex(C <sub>14:0</sub> ); IV-Hex(C <sub>14:0</sub> , NMe); V(C <sub>14:0</sub> ); V(C <sub>14:0</sub> , NMe); V(C <sub>16:1</sub> ); III(C <sub>18:0</sub> -OH); III(C <sub>18:0</sub> -OH, NMe); III-Hex(C <sub>18:0</sub> -OH, NMe); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); IV(C <sub>18:1</sub> -OH, NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:2</sub> , NMe); V(C <sub>20:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>20:1</sub> )
50	III(C <sub>16:0</sub> ); IV(C <sub>16:0</sub> , NMe); III-Hex(C <sub>18:1</sub> ); III-Hex(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:0</sub> , NMe); IV(C <sub>18:1</sub> ); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV-Hex(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> ); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:2</sub> , NMe); V(C <sub>20:0</sub> ); V(C <sub>20:1</sub> ); V(C <sub>20:1</sub> , NMe, S); IV-Hex(C <sub>22:3</sub> , NMe); IV(C <sub>22:3</sub> , NMe); V(C <sub>22:3</sub> , NMe)
55	III(C <sub>16:0</sub> , NMe); IV(C <sub>18:0</sub> ); V(C <sub>18:0</sub> ); II-Hex(C <sub>18:1</sub> ); III(C <sub>18:1</sub> ); III(C <sub>18:1</sub> , NMe); III-Hex(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:1</sub> ); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:2</sub> , NMe); IV(C <sub>20:0</sub> ); V(C <sub>20:1</sub> ); V(C <sub>22:0</sub> -OH, NMe); III(C <sub>22:3</sub> , NMe); IV(C <sub>22:3</sub> , NMe); V(C <sub>22:3</sub> , NMe)
70	III(C <sub>16:0</sub> , NMe); IV(C <sub>18:0</sub> , NMe); III(C <sub>18:1</sub> ); III(C <sub>18:1</sub> , NMe); III-Hex(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); IV(C <sub>20:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>20:0</sub> , NMe, S)

**Tabla IV.8.** Factores de nodulación biológicamente activos sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina. Segundo análisis.

Fracción (min)	Estructura
10	IV(C <sub>10:0</sub> , NMe); V(C <sub>12:0</sub> ); V(C <sub>16:0</sub> , S); V(C <sub>16:0</sub> , NMe); V(C <sub>16:0</sub> , NMe, S); III(C <sub>18:0</sub> , S); V(C <sub>18:0</sub> , S); V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:1</sub> , S); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe, S); V(C <sub>20:1</sub> , S); V(C <sub>20:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>22:2</sub> , NMe); V(C <sub>22:2</sub> , NMe, S); V(C <sub>22:3</sub> , NMe); V(C <sub>22:3</sub> , NMe, S)
15	V(C <sub>12:0</sub> ); IV(C <sub>16:0-OH</sub> ); V(C <sub>16:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>16:0-OH</sub> ); V(C <sub>16:0-OH</sub> , NMe); V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe); IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:1</sub> , S); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)
25	IV(C <sub>12:0</sub> , NMe); V(C <sub>14:0</sub> ); V(C <sub>18:1</sub> , NMe)
55	IV(C <sub>16:0</sub> ); IV(C <sub>16:0</sub> , NMe); V(C <sub>16:0</sub> ); V(C <sub>16:0</sub> , NMe); V(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe, Cb); IV(C <sub>18:1</sub> ); IV-Hex(C <sub>18:1</sub> ); V(C <sub>18:1</sub> ); V(C <sub>18:1</sub> , NMe); V(C <sub>18:2</sub> )

Sorprendentemente, se identificaron numerosos factores de nodulación en todas y cada una de las fracciones analizadas, de estructuras muy variables, la mayoría ya publicadas para *R. tropici* CIAT899 (Morón *et al.*, 2005). Debido a esta gran producción de factores Nod, no se consiguió establecer patrones de síntesis específicos para cada fracción, a excepción de una mayor excreción de factores sulfatados en las fracciones correspondientes a los primeros minutos del HPLC, donde el porcentaje de agua es mayor y por lo tanto eluyen antes las estructuras más hidrofílicas. Asimismo, hemos de informar la presencia minoritaria de factores Nod de estructuras no descritas hasta la fecha, si bien se trata de estudios aún muy preliminares, por lo que se diseñarán trabajos futuros que permitan confirmar estas nuevas moléculas.

Tal y como se dispuso al inicio de este epígrafe, se seleccionaron paralelamente al azar 3 fracciones no activas biológicamente del HPLC de los factores Nod “salinos” no inducidos (minutos 15, 40 y 75) y 3 de los “ácidos” (minutos 20, 40 y 70) con el fin de someterlas igualmente a los estudios de análisis estructural detallados previamente. Este ensayo tenía como objetivo la confirmación de la ausencia de factores Nod en cada una de estas fracciones, ya que no mostraron actividad biológica alguna en las plantas donde fueron ensayadas. Sin embargo, se hallaron de nuevo factores Nod en todas las fracciones seleccionadas, a excepción de la fracción 70 ácida, de estructuras similares a

los ya caracterizados en las fracciones activas no inducidas e incluso a los factores Nod sintetizados en condiciones control e inducidos por apigenina. Los datos de este análisis vienen recogidos en la tabla IV.9. Paralelamente, la tabla IV.10. (ver Apéndice, p.: 300) recoge un estudio comparativo del conjunto de factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en ambas condiciones de estrés abiótico, en ausencia de inductor.

**Tabla IV.9.** Factores de nodulación no activos biológicamente, sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) o estrés ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina. Segundo análisis.

Condición	Fracción (min)	Estructura
300 mM de NaCl	15	IV(C <sub>16:0-OH</sub> , NMe); IV(C <sub>18:0</sub> , NMe); IV(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>18:0</sub> , NMe); V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S); V(C <sub>20:0</sub> , S); IV(C <sub>20:1</sub> , NMe, S); V(C <sub>20:1</sub> , NMe, S);
	40	IV(C <sub>14:0</sub> , NMe); IV(C <sub>16:0</sub> ); V(C <sub>16:0</sub> ); IV(C <sub>16:1</sub> ); IV(C <sub>16:1</sub> , NMe); V(C <sub>16:1</sub> , NMe)
	75	-
pH 4,5	20	IV(C <sub>12:0</sub> , NMe); V(C <sub>12:0</sub> , NMe); IV(C <sub>14:1</sub> ); V(C <sub>14:1</sub> ); IV(C <sub>18:1</sub> ); V(C <sub>18:2</sub> )
	40	IV(C <sub>14:0</sub> ); V(C <sub>14:0</sub> ); V(C <sub>14:0</sub> , NMe)
	70	IV(C <sub>18:0</sub> , NMe); V(C <sub>18:0</sub> ); V(C <sub>18:0</sub> , NMe); V(C <sub>20:1</sub> ); V(C <sub>20:1</sub> , NMe)

#### 4.2.2.4. Estudio de la actividad biológica de los factores Nod de *R. tropici* RSP900 pCV3804, pCV38 y pCV61, obtenidos en condiciones control y de estrés salino, en presencia y ausencia de inductor, en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa.

Los estudios llevados a cabo en el apartado 4.1.5. nos permitieron establecer las bases preliminares de la regulación de la síntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino. Gracias a los perfiles de CCF de los factores Nod codificados por determinados cósmidos del banco de genes de esta bacteria (pCV3804, pCV38 y pCV61) fuimos capaces de confirmar la existencia de cierto factor molecular presente en el pSym, de naturaleza aún desconocida e independiente del gen *nodDI*, crucial en la regulación de la síntesis de factores Nod por *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) y ausencia de inductor.



Como ya indicamos en la figura 4.13., las cepas *R. tropici* RSP900 (*R. tropici* CIAT899 curada de su pSym) con los cósmidos pCV3804 o pCV38 sintetizaban factores Nod únicamente en aquellas condiciones de estudio, tanto control como de estrés salino, inducidas por apigenina 1  $\mu\text{M}$ , y tan sólo el cósmido pCV61 sintetizó y excretó factores Nod en todas las condiciones de estudio, dado que presenta una expresión constitutiva que le confiere el promotor de Kanamicina que influye al gen *nodA*. Ante estas premisas, nos propusimos verificar si todos los factores Nod detallados anteriormente resultaban ser biológicamente activos o no en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, con el fin de corroborar mediante metodologías alternativas a la CCF la hipótesis expuesta acerca del proceso de regulación de los genes de nodulación bajo condiciones de estrés salino. Al mismo tiempo, estos ensayos nos permitirán discutir acerca de la especificidad y/o necesidad de ciertos radicales en la estructura de los factores Nod ensayados. La síntesis de dichos factores se llevó a cabo nuevamente bajo condiciones control y de estrés salino (300 mM de NaCl), en presencia y ausencia de inductor, empleando esta vez una única concentración de trabajo ( $10^{-5}$  M) para cada una de las fracciones del extracto crudo empleadas (20, 45 y 60% AcN). El estudio se realizó siguiendo la misma metodología ya empleada en los anteriores estudios de actividad biológica (apartados 4.2.2.1. y 4.2.2.2.).

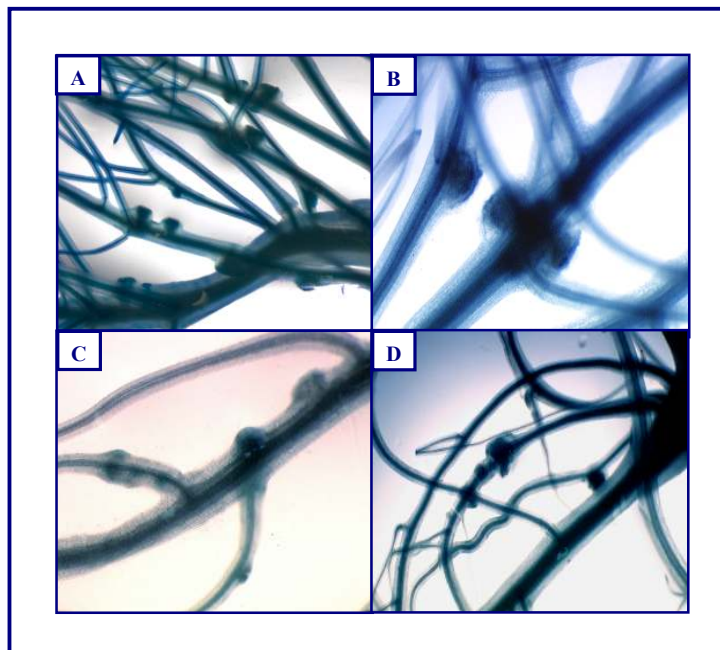
En primer lugar, se ensayaron sobre plantas de judía los factores Nod sintetizados por *R. tropici* RSP900 pCV61 bajo condiciones control y de estrés salino, inducidos o no por apigenina 1  $\mu\text{M}$ . Todos ellos registraron una intensa actividad biológica, mostrando numerosos nódulos para cada fracción del extracto crudo ensayada. De este modo, quedó confirmada la expresión constitutiva del cósmido pCV61 totalmente independiente de flavonoide, ya adelantada por las técnicas de CCF (figura 4.13., panel D) además de la extraordinaria capacidad de estos factores Nod de desarrollar estructuras nodulares en plantas de judía.

Seguidamente, se estudió la actividad biológica de los factores Nod de *R. tropici* RSP900 pCV38, el cual recordemos codifica para toda la región de los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899, incluido el gen *nodDI*. El ensayo de los factores sintetizados tanto en condiciones control como de estrés salino (300 mM de NaCl) mostró un perfil similar al registrado para los factores Nod “control” de la cepa parental (figura 4.25., paneles A1 y A2): numerosos nódulos y primordios tras añadir los factores Nod (fracciones del 45 y 60% AcN) sintetizados tras inducción con apigenina, y ausencia total de los mismos al emplear las fracciones del extracto crudo de los no

inducidos. De hecho, no existe producción de factores Nod por parte de esta cepa en ausencia de inductor, bajo condiciones control o de estrés salino (ver figura 4.13., panel C, carriles 1 y 3).

En último lugar se ensayaron los factores de nodulación sintetizados por la cepa *R. tropici* RSP900 pCV3804, la cual exclusivamente porta los genes *nodDInodABCS* y parte de *nodU*. Este ensayo registró un perfil de actividad biológica idéntico al observado para *R. tropici* RSP900 pCV38: formación de nódulos y primordios únicamente al emplear factores Nod (fracciones del 45 y 60% AcN) sintetizados tras inducción con apigenina 1  $\mu\text{M}$ , tanto en condiciones control como de estrés salino. Recordemos de nuevo que *R. tropici* RSP900 pCV3804 no sintetiza factores de nodulación en ausencia de flavonoide bajo ninguna condición de ensayo (ver figura 4.13., panel B, carriles 1 y 3).

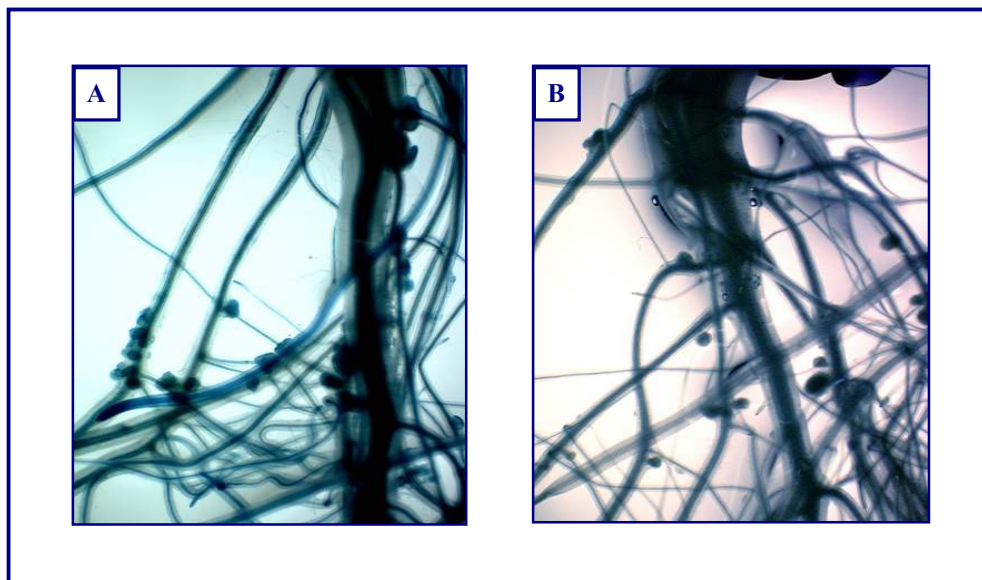
La figura 4.30. muestra varios ejemplos de la actividad biológica registrada por los factores Nod de *R. tropici* RSP900 pCV61, pCV38 y pCV3804 en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, sintetizados bajo condición control adicionada de apigenina 1  $\mu\text{M}$ . En ella podemos comprobar la similitud de la morfología de cualquiera de estos primordios con alguno de los registrados por los factores Nod “control” de *R. tropici* (figura 4.25., paneles A1 y A2).



**Figura 4.30.** Nódulos y primordios nodulares de plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, inoculadas con factores Nod (fracción 45% AcN,  $10^{-5}$  M), sintetizados bajo condiciones control, y tras inducción por apigenina 1  $\mu\text{M}$ , por las cepas: panel **A.**- *R. tropici* CIAT899, panel **B.**- *R. tropici* RSP900 pCV61, panel **C.**- *R. tropici* RSP900 pCV38 y panel **D.**- *R. tropici* RSP900 pCV3804.

Los resultados obtenidos nos permitieron no sólo corroborar los datos mostrados en el apartado 4.1.5. referentes a la regulación del proceso de síntesis de los factores Nod, sino también ratificar los resultados descritos por Folch-Mallol *et al.* (1996), quien postulaba que el grupo sulfato no era imprescindible para la nodulación de *R. tropici* CIAT899 en *P. vulgaris*. Esta afirmación se puede ratificar gracias al empleo de la bacteria *R. tropici* RSP900 pCV3804, la cual contiene únicamente los genes *nodD1nodABCS* y parte de *nodU* y carece, por lo tanto, de los genes *nodHPQ* que codifican para el radical sulfato.

Esta cepa sintetiza factores Nod que son biológicamente activos aún careciendo del grupo sulfato (ver figura 4.13., panel B, carril 2), al mismo tiempo que es capaz de nodular plantas de judía de forma semejante a la cepa parental, *R. tropici* CIAT899, tal y como se puede observar en la figura 4.31..



**Figura 4.31.** Nódulos y primordios de plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa crecidas en condiciones control (0 mM de NaCl, pH 7,0) inoculadas con 20  $\mu$ L de un cultivo  $10^8$  UFC/mL de las cepas: Panel **A.**- *R. tropici* CIAT899 y panel **B.**- *R. tropici* RSP900 pCV3804.



### **4.3. Estudio del empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la simbiosis rizobio-leguminosa, bajo condiciones control y de estrés salino.**

- 4.3.1. Estudio de la interacción rizobio-PGPR bajo condiciones control de crecimiento.
- 4.3.2. Estudio de la interacción leguminosa-PGPR en condiciones control y de estrés salino.
- 4.3.3. Estudio de la interacción rizobio-PGPR-leguminosa en condiciones control y de estrés salino.

## ÍNDICE DE FIGURAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS 4.3.

	<b>Página</b>
4.32. Curvas de crecimiento de <i>R. tropici</i> CIAT899 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	305
4.33. Curvas de crecimiento de <i>R. etli</i> ISP42 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	306
4.34. Curvas de crecimiento de <i>E. fredii</i> SMH12 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	307
4.35. Curvas de crecimiento de <i>E. fredii</i> HH103 en distintas proporciones de los LM de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>A. brasilense</i> Sp7.....	308
4.36. Curvas de crecimiento de <i>P. fluorescens</i> WCS417r en distintas proporciones de los LM de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	309
4.37. Curvas de crecimiento de <i>C. balustinum</i> Aur9 en distintas proporciones de los LM de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	310
4.38. Curvas de crecimiento de <i>A. brasilense</i> Sp7 en distintas proporciones de los LM de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	311
4.39. Efecto de los LM de las PGPRs <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 y <i>A. brasilense</i> Sp7 sobre la expresión de los genes de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899, <i>R. etli</i> ISP42, <i>E. fredii</i> SMH12 y <i>E. fredii</i> HH103.....	168
4.40. Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan plantas de <i>P. vulgaris</i> y <i>G. max</i> , en presencia de <i>P. fluorescens</i> WCS417r, <i>C. balustinum</i> Aur9 y <i>A. brasilense</i> Sp7.....	170
4.41. Efecto de los exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de <i>C. balustinum</i> Aur9, sobre <i>R. tropici</i> CIAT899 y <i>R. etli</i> ISP42.....	173
4.42. Efecto de los exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi, obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de <i>C. balustinum</i> Aur9, sobre <i>E. fredii</i> SMH12 y HH103.....	175
4.43. Desarrollo vegetativo de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con <i>R. tropici</i> CIAT899 + <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>R. tropici</i> CIAT899, bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl.....	182
4.44. Detalle de raíz y nódulos y/o primordios nodulares de plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa inoculadas con <i>R. tropici</i> CIAT899 + <i>C. balustinum</i> Aur9 o con <i>R. tropici</i> CIAT899, ambas bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl.....	183
4.45. Desarrollo vegetativo de plantas de <i>G. max</i> cv. Osumi inoculadas con <i>E. fredii</i> SMH12 + <i>C. balustinum</i> Aur9 o <i>E. fredii</i> SMH12, bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl.....	184
4.46. Plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL crecidas bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	186
4.47. Estudio de la cinética de nodulación de <i>R. tropici</i> CIAT899 en plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL, en ausencia o presencia de la PGPR <i>C. balustinum</i> Aur9, bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl).....	190

### ÍNDICE DE TABLAS EN EL APARTADO DE RESULTADOS 4.3.

	<b>Página</b>
<b>IV.11.</b> Flavonoides identificados en exudados de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia de <i>C. balustinum</i> Aur9.....	178
<b>IV.12.</b> Flavonoides identificados en exudados de <i>G. max</i> cv. Osumi obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia de <i>C. balustinum</i> Aur9.....	179
<b>IV.13.</b> Parámetros de nodulación de <i>P. vulgaris</i> cv. BBL en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl), con inóculos simples ( <i>R. tropici</i> CIAT899 o <i>R. etli</i> ISP42) o dobles ( <i>R. tropici</i> CIAT899 o <i>R. etli</i> ISP42 + <i>C. balustinum</i> Aur9)....	187
<b>IV.14.</b> Parámetros de nodulación de <i>G. max</i> cv. Osumi en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl), con inóculos simples ( <i>E. fredii</i> SMH12 o HH103) y dobles ( <i>E. fredii</i> SMH12 o HH103+ <i>C. balustinum</i> Aur9).....	188





### **4.3. Estudio del empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en la simbiosis rizobio-leguminosa, bajo condiciones control y de estrés salino.**

La duplicación en la producción de alimentos agrícolas durante los últimos años estuvo asociada con incrementos en la fertilización de nitrógeno, de fósforo, en la irrigación y en la expansión del área de siembra de cultivos. Sin embargo, el empleo irracional de estas estrategias ha ocasionado a menudo daños significativos sobre la salud del suelo (Tilman, 1999). Todos estos efectos podrían ser minimizados si se desarrollasen prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente, que incorporasen técnicas como la utilización de agentes biofertilizadores y de biocontrol (Bloemberg & Lugtenberg, 2001).

En este sentido, se ha observado que ciertas bacterias rizosféricas, denominadas PGPR, son capaces de actuar como coadyuvantes en el establecimiento de la simbiosis sin que se hayan determinado exactamente todos los mecanismos moleculares por los que se produce dicho efecto. Este desconocimiento impide establecer procedimientos de manejo y desarrollo de inoculantes mixtos que serían de gran ayuda para incrementar la producción de leguminosas como *P. vulgaris* (judía) y *G. max* (soja), quienes, tal y como se adelantó en los apartados 1.2.3. de Introducción y 4.1.1. de Resultados, gozan de gran importancia a nivel mundial al constituir parte de la dieta fundamental para la alimentación de la población de muchos países de forma directa o indirecta.

Por este motivo, se estableció como tercer objetivo de esta Tesis Doctoral la caracterización de la interacción rizobio-PGPR-leguminosa, tanto de forma conjunta como entre rizobio-PGPR y leguminosa-PGPR.

#### **4.3.1. Estudio de la interacción rizobio-PGPR bajo condiciones control de crecimiento.**

Determinadas ramas científicas dedicadas al estudio de la simbiosis rizobio-leguminosa, como el caso de la biología, bioquímica y genética, han experimentado un




gran auge durante la última década (Smith & Fedoroff, 1995; Flores *et al.*, 1999). Por el contrario, procesos referentes a la comunicación entre las distintas bacterias que se encuentran en la rizosfera no han recibido la suficiente atención. De hecho, la mayoría de las interacciones consideradas hasta hoy engloban únicamente un patógeno y un rizobio o bacteria PGPR, lo cual pone de manifiesto la simplicidad con la que se afronta el estudio de estas relaciones. Sin embargo, una alternativa para la mejora de la comunicación interbacteriana y sus consecuentes efectos beneficiosos en la rizosfera sería el empleo de combinaciones adecuadas de rizobacterias, particularmente aquellas que mostraran mecanismos de acción complementarios y/o habilidades distintas (Whipps, 2001).



#### **4.3.1.1. Estudio del crecimiento de cepas que nodulan *P. vulgaris* y *G. max* en presencia del líquido metabólico (LM) de PGPRs y viceversa.**

Con el fin de caracterizar las posibles interacciones entre bacterias beneficiosas que pudieran cohabitar en la rizosfera de judía y soja, se estableció como primer punto de nuestro estudio el crecimiento bacteriano de cada una en presencia del LM obtenido de haber cultivado a otra bacteria. Se resolvió emplear el LM de cada bacteria ya que la mayoría de las interacciones bacterianas vienen mediadas por factores sintetizados y excretados por las propias bacterias que modulan determinadas rutas metabólicas en la pareja (Pace, 1997) (sirva de ejemplo el mecanismo de “quorum-sensing” (González & Marketon, 2003)).



Se seleccionaron como rizobios a estudiar las cuatro cepas indicadas en los apartados anteriores (*R. tropici* CIAT899, *R. etli* ISP42 y *E. fredii* SMH12 y HH103), y como bacterias PGPR las estirpes *Pseudomonas fluorescens* WCS417r, *Chryseobacterium balustinum* Aur9 y *Azospirillum brasilense* Sp7. La selección de dichas PGPRs se fundamentó en trabajos previos que demostraron su amplia y provechosa actividad promotora del crecimiento vegetal (Pieterse *et al.*, 1996; Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2003; Dobbelaere *et al.*, 2001).


De este modo, se establecieron diversas condiciones de estudio, de manera que se hizo crecer a cada uno de los rizobios en distintas combinaciones de los LM de las PGPR, y viceversa, todas en proporción 1:1 (1.- LM puro, 2.- LM + agua, 3.- LM + medio mínimo óptimo (MMO), 4.- MMO y 5.- MMO + agua). Las figuras 4.32., 4.33., 4.34. y 4.35. (ver Apéndice, pp.: 303-306) nos muestran las curvas de crecimiento

registradas para cada uno de los rizobios seleccionados, bajo las distintas combinaciones anteriormente establecidas de los LM de las PGPR. Los cuatro rizobios seleccionados para este estudio mostraron frente al LM de *P. fluorescens* WCS417r y *C. balustinum* Aur9 (curvas  , gráficos A y B, respectivamente) un crecimiento semejante al que desarrollaron dichos rizobios en su MMO (curva  ), aunque los valores de turbidez para *E. fredii* HH103 disminuyen a partir de las 50 horas de crecimiento posiblemente por agotamiento de algún nutriente esencial (figura 4.35., gráficos A y B, curva  ).



En las gráficas indicadas anteriormente, se puede observar que los LM de *P. fluorescens* WCS417r y *C. balustinum* Aur9, a pesar de estar diluidos en proporción 1:1 con agua (curvas  ) permiten el crecimiento de los cuatro rizobios con valores de D.O. semejantes a los registrados en la condición control (MMO, curva  ), fundamentalmente en etapas tempranas del crecimiento.






La selección del medio mineral B<sup>-</sup> como MMO de *P. fluorescens* WCS417r y de los cuatro rizobios podría considerarse una ventaja a la hora de la producción industrial de coinoculantes constituidos por estas estirpes, no sólo por tratarse del mismo MMO para ambos grupos de bacterias, sino también por la aparente ausencia de influencia negativa de *P. fluorescens* WCS417r sobre el crecimiento de los rizobios. Asimismo, los cambios efectuados en la composición de medio B<sup>-</sup> (sustitución del manitol por la glucosa y la adición de casaaminoácidos, ver Material y Métodos, apartado 3.3.1.) derivaron en el empleo de un nuevo MMO para la bacteria *C. balustinum* Aur9 (B<sup>-</sup> Glucos), cuyo LM tampoco modificó significativamente el crecimiento rizobiano, a excepción de la estirpe *E. fredii* HH103.

Sin embargo, cuando se crecieron los cuatro rizobios en presencia del LM de *A. brasilense* Sp7 (figuras 4.32., 4.33., 4.34. y 4.35., gráfico C, curvas  y diluido con agua 1:1, curvas  ), no se registraron cambios en la D.O.<sub>600nm</sub> de los cultivos durante el ensayo. Este hecho podría atribuirse a varias razones como, por ejemplo, la presencia en el LM de moléculas inhibitoras sintetizadas y excretadas por *A. brasilense* Sp7, o bien que los compuestos presentes en LM no pudiesen ser asimilados y degradados por los rizobios, o quizás ausencia de nutrientes por agotamiento de los mismos, o que el pH del LM limite el crecimiento.

Los resultados mostrados en las curvas correspondientes al crecimiento de cada uno de los rizobios en presencia de la combinación LM *A. brasilense* Sp7:MMO (B<sup>-</sup>) (ver Apéndice, pp.: 305-308, figuras 4.32., 4.33., 4.34. y 4.35., gráfico C, curva  )

confirman la necesidad por parte de los rizobios de moléculas presentes en su MMO que deben estar ausentes en el LM de la PGPR. De hecho, el MMO de Sp7 (Nfb) contiene ácido málico, que es una fuente de carbono utilizada por algunos rizobios. Sin embargo el crecimiento de los cuatro rizobios en medio con ácido málico como fuente de carbono descartó esta idea.

Se realizaron igualmente las curvas de crecimiento de las PGPRs en el LM de los rizobios, utilizando las mismas combinaciones establecidas para el estudio anterior. Así, se obtuvieron los distintos gráficos representados en las figuras 4.36., 4.37. y 4.38. (ver Apéndice, pp.: 309-311), donde el panel A corresponde al crecimiento de las PGPRs en el LM de *R. tropici* CIAT899, el B al LM de *R. etli* ISP42, C de *E. fredii* SMH12 y D de *E. fredii* HH103. Se observa claramente como para el caso de la cepa *P. fluorescens* WCS417r (figura 4.36.) su crecimiento en presencia del LM de cualquier rizobio (curva ) no sufrió modificación alguna con respecto a la condición de crecimiento control (MMO, curva ). Una posible explicación para este fenómeno podría ser el empleo del mismo MMO para los rizobios y la PGPR (medio mínimo B<sup>-</sup>), tal y como se indicó anteriormente, afianzando aún más su potencial como buena asociación desde el punto de vista de compatibilidad de crecimiento. Al mismo tiempo nos indica que los productos metabólicos eliminados por los rizobios al medio no afectan el crecimiento de *P. fluorescens* WCS417r.

Por el contrario, los perfiles de crecimiento de *C. balustinum* Aur9 y *A. brasilense* Sp7 (figuras 4.37. y 4.38.) sí registraron cambios significativos. Aquellas condiciones de estudio donde el medio de crecimiento constaba simplemente del LM del rizobio (curva ) , y diluido con agua 1:1 (curva ) resultaron ser un medio de crecimiento no adecuado para ambas PGPRs, puesto que los valores de D.O.<sub>600nm</sub> alcanzados difícilmente equipararon a los correspondientes a la condición control (MMO, curva ) . Sin embargo, bajo la combinación LM rizobio:MMO de PGPRs (curvas ) , tanto *C. balustinum* Aur9 como *A. brasilense* Sp7 mostraron un rápido crecimiento exponencial, mayor que el desarrollado en su medio control (MMO, curva ) , aunque posteriormente los valores disminuyen.

Paralelamente a los estudios de curvas de crecimiento, se realizaron ensayos de difusión en placas de agar para demostrar de una forma alternativa que los LM de cada una de las PGPR no afectasen significativamente al crecimiento de los rizobios, e inversa. La metodología empleada se describe ampliamente en el apartado 3.3.5. de Material y Métodos, donde se detallan extensamente todas las combinaciones

bacterianas empleadas. Tras 96 horas de incubación de cada una de las cepas en placas con medio sólido y el LM de la correspondiente pareja, no se observó ningún halo de inhibición del crecimiento, descartando nuevamente cualquier tipo de interacción negativa entre las bacterias objeto de estudio.

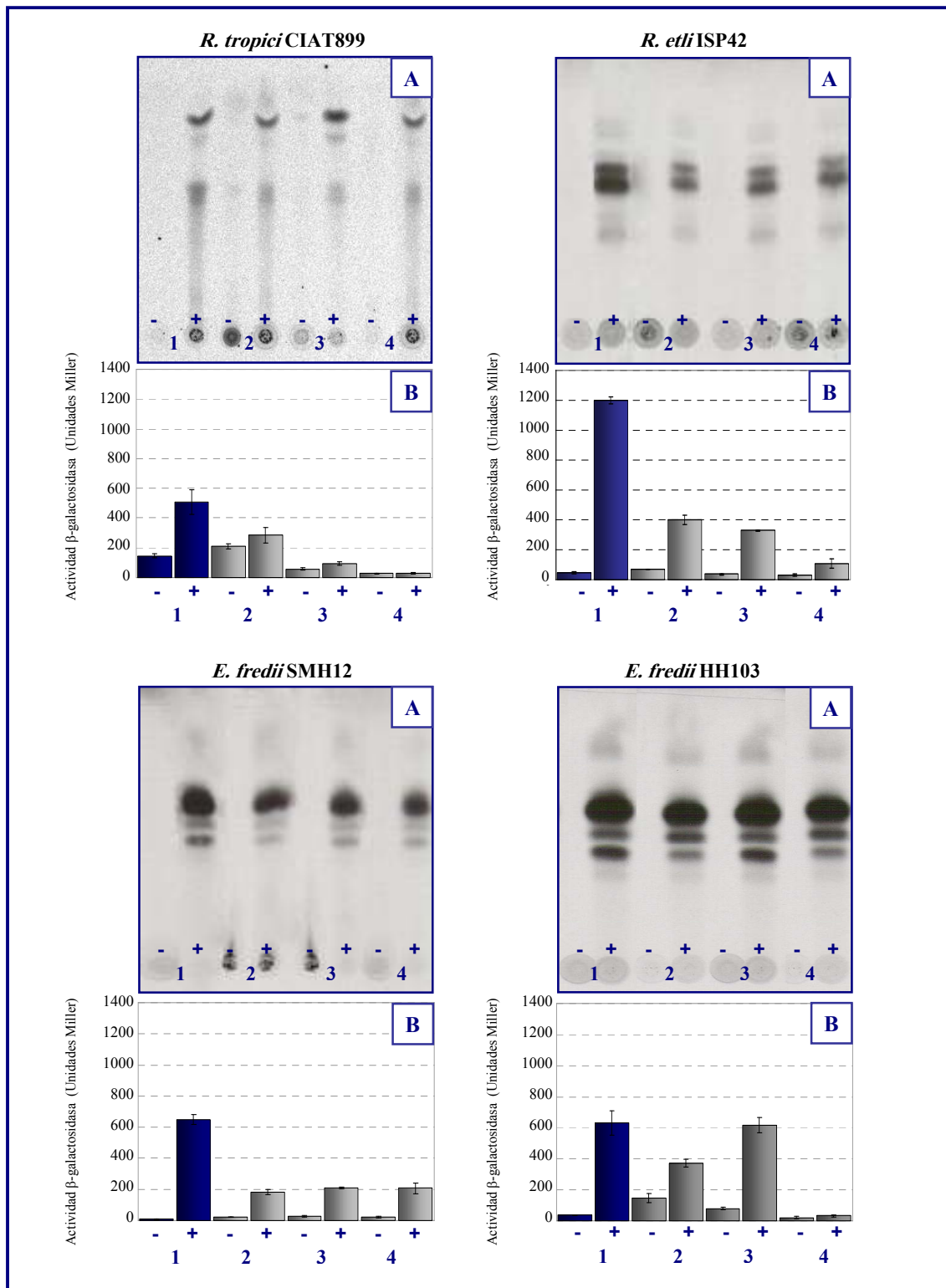
Los resultados obtenidos en este último ensayo, junto con los anteriores de las curvas de crecimiento, nos permiten apoyar la teoría expuesta por Cattelan *et al.* (1999), quienes postulaban que las PGPRs empleadas en coinoculación con rizobios no deben tener efectos negativos sobre éstos.

#### **4.3.1.2. Estudio de la expresión de los genes *nod* y la biosíntesis de los factores Nod de cepas que nodulan *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi, en presencia del LM de las PGPRs seleccionadas.**

Truchet *et al.* (1991) demostraron que los factores Nod sintetizados por los rizobios en respuesta a las moléculas reguladoras excretadas por la planta son esenciales para la inducción y posterior desarrollo del nódulo en el hospedador. En el apartado 4.1.1.2. se mencionaron diversos factores abióticos que puede modificar dichas moléculas y, consecuentemente, comprometer el desarrollo de la simbiosis. Sin embargo, también se han de tener en cuenta la posible influencia de factores bióticos como la coinoculación con PGPRs.

Los resultados anteriores mostraron que existe una compatibilidad mayor entre los cuatro rizobios y las PGPR *P. fluorescens* WCS417r y *C. balustinum* Aur9 que frente a *A. brasilense* Sp7. Estos hechos podrían ser de gran beneficio en el desarrollo de inoculantes mixtos para judía y soja empleando estas asociaciones compatibles. En base a estos resultados, se propuso determinar si la compatibilidad entre PGPR y rizobio existía también en la expresión de los genes *nod* y la posterior producción de factores Nod por los 4 rizobios, comprobando que los perfiles cromatográficos de los mismos no se vieran alterados por la presencia de la PGPR.

La figura 4.39. (paneles A) nos confirma que no existen cambios significativos en los perfiles de los factores Nod sintetizados por los rizobios en presencia del LM de cualquiera de las tres PGPR utilizadas (condiciones 2, 3 y 4, carriles positivos) con respecto a los producidos en condición control (carril 1 positivo).



**Figura 4.39.** Efecto de los LMs de las PGPRs *P. fluorescens* WCS417r, *C. balustinum* Aur9 o *A. brasilense* Sp7 sobre la expresión de los genes de nodulación de simbioses de judía y soja. Panel A.- Análisis por CCF de los factores Nod marcados radiactivamente con  $^{14}\text{C}$  N-acetilglucosamina. Panel B.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa de los rizobios, portadores del plásmido informador pMP240. Condiciones: 1, medio B<sup>+</sup>; 2, LM de *P. fluorescens* WCS417r; 3, LM de *C. balustinum* Aur9 y 4, LM de *A. brasilense* Sp7. Se añadió 1  $\mu\text{M}$  del inductor correspondiente en las condiciones con signo positivo (+) (apigenina para *R. tropici* CIAT899, naringenina para *R. etli* ISP42 y genisteína para *E. fredii* SMH12 y HH103). Los datos se obtuvieron en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

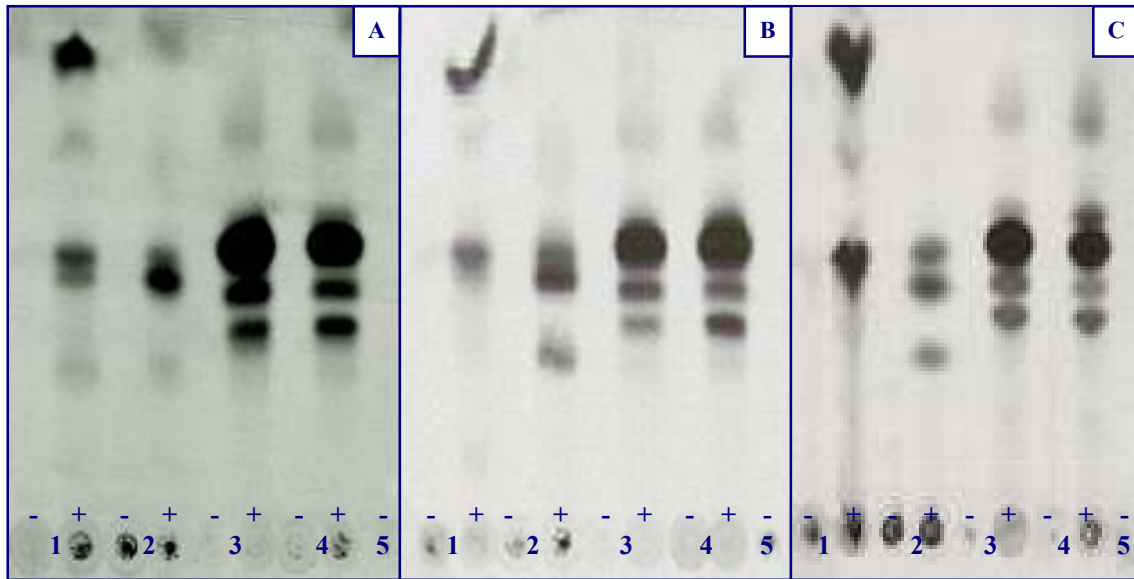
Adicionalmente, se estudió la expresión de los genes *nod* en estas mismas condiciones de estudio con el fin de establecer una correlación entre los factores Nod sintetizados y la actividad de los genes que los codifican, tal y como se realizó en el apartado 4.1.4.2.. De este modo, se incubaron los cuatro rizobios, portadores todos ellos del plásmido informador de la actividad  $\beta$ -galactosidasa (pMP240) que nos indicará el nivel de expresión de los genes *nod* en cada condición de estudio.

La figura 4.39., paneles B, barras 2, 3 y 4 positivas, muestra como la presencia de los LM de las PGPRs en el medio permite la expresión del sistema reportero, con algunas variaciones en los valores de la unidades Miller, siendo mayores en general cuando el LM es de *P. fluorescens* WCS417r y *C. balustinum* Aur9 que cuando es de *A. brasilense* Sp7. A pesar de esta inducción, los niveles de  $\beta$ -galactosidasa no alcanzaron valores semejantes a los de la condición control (figura 4.39., paneles B, barra 1 positiva). Asimismo, se corroboró que algunos de los LM utilizados podrían tener moléculas con capacidad de inducción de los genes *nod* de algunos de los rizobios en estudio (paneles B, barras 2, 3 y 4 negativas). Se observó como el LM de *P. fluorescens* WCS417r induce la expresión de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899 y *E. fredii* HH103, aunque en menor medida (figura 4.39., paneles B, carril 2 negativo).

En función de los datos mostrados podemos concluir que, efectivamente, los LM de las PGPRs estudiadas estarían afectando la expresión de los genes de nodulación, exceptuando el caso de *E. fredii* HH103 en el LM de *C. balustinum* Aur9 adicionado de genisteína 1  $\mu$ M, quien registró un nivel de expresión similar al obtenido en la condición control (figura 4.39., panel B, barras 3 y 1 positivas respectivamente). Igualmente, tampoco podemos establecer una relación entre la síntesis de factores Nod y actividad  $\beta$ -galactosidasa para ninguno de los rizobios estudiados.

En el apartado 4.3.1.1. de los Resultados se puntualizó cómo la mayoría de las interacciones microbianas que tienen lugar en la rizosfera están mediadas por componentes excretados por los propios microorganismos. Sin embargo, existen mecanismos alternativos de comunicación mediante los cuales estas poblaciones rizosféricas interactúan entre sí de una forma más directa, por ejemplo, mediante la formación de biofilms (Costerton *et al.*, 1995; Fujishige *et al.*, 2006), originando así posibles cambios sobre otros microorganismos.

Por este motivo, nos propusimos confirmar que la interacción directa entre las PGPRs y los rizobios no modifican la pauta de síntesis de sus factores de nodulación. En la figura 4.40. se nos muestran los perfiles cromatográficos de los factores Nod de cada rizobio coinoculados con cada una de las PGPRs estudiadas, donde ciertamente podemos observar que no existen cambios significativos en dichos perfiles como consecuencia de la presencia directa de las PGPRs en el medio de ensayo.



**Figura 4.40.** Cromatografía en capa fina de los factores Nod sintetizados por cepas que nodulan *P. vulgaris* y *G. max*, en presencia de *P. fluorescens* WCS417r (panel A), *C. balustinum* Aur9 (panel B) y *A. brasilense* Sp7 (panel C). Condiciones: 1, *R. tropici* CIAT899; 2, *R. etli* ISP42; 3, *E. fredii* SMH12; 4, *E. fredii* HH103 y 5, PGPR empleada en cada panel. Se añadió 1  $\mu$ M del inductor correspondiente a cada rizobio en los carriles positivos (+) (apigenina para *R. tropici* CIAT899, naringenina para *R. etli* ISP42 y genisteína para *E. fredii* SMH12 y HH103).

Resumiendo los resultados obtenidos en el conjunto del apartado 4.3.1. podemos concluir *a priori* que no existen interacciones negativas significativas entre ambos grupos de rizobacterias (rizobios y PGPRs) en parámetros determinantes de la eficacia de un inoculante (crecimiento bacteriano y síntesis de factores de nodulación).

#### 4.3.2. Estudio de la interacción leguminosa-PGPR en condiciones control y de estrés salino.

En el apartado 1.3.2. de la Introducción se detallaron ampliamente diversos mecanismos mediante los cuales las bacterias PGPRs pueden promocionar el



crecimiento vegetal. Entre ellos se especificaban algunos como la producción de auxinas, incremento de la fijación del nitrógeno o producción de antibióticos que protegen a la planta de microorganismos patógenos. Sin embargo, son pocos los mecanismos demostrados inequívocamente como protectores frente al estrés salino.

No obstante, aquellas PGPRs encontradas en asociación con plantas que crecen de forma permanente bajo condiciones de estrés, incluida una alta salinidad del medio, deben haberse adaptado a este entorno hostil y seguramente procuren un beneficio significativo a su hospedador, como es el caso de los ejemplos descritos por Mayak *et al.* (2004a, 2004b).

#### **4.3.2.1. Estudio de la actividad inductora de los exudados de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi sobre los genes *nod* de sus simbiontes correspondientes, obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9, en condiciones control y de estrés salino.**

La presencia de microorganismos en la rizosfera incrementa generalmente la exudación por parte de la planta, sobre todo por el consumo que hacen del exudado, lo cual conlleva un aumento en el gradiente de concentración que fuerza el proceso de exudación. No obstante, existen otros mecanismos por los cuales determinadas rizobacterias estimulan y modifican la exudación de la planta mediante, por ejemplo, un aumento de la permeabilidad de las células vegetales (Prikryl & Vancura, 1980), forzando la exudación de determinados compuestos como las opinas (Kim & Farrand, 1998) o simplemente metabolizándolos, como es el caso de ciertos rizobios (Steele *et al.*, 1999).

Ante estos antecedentes, no es de extrañar que el empleo de PGPRs como coinoculantes comerciales pueda modificar la exudación de la planta, y, consecuentemente, alterar positiva o negativamente la simbiosis rizobio-leguminosa. Por este motivo, resolvimos estudiar el posible efecto que las PGPRs incluidas en este trabajo pudiesen tener sobre la producción y funcionalidad de los exudados de judía y soja, obtenidos bajo condiciones control y de estrés salino. Puesto que los efectos de dicho estrés sobre la simbiosis rizobio-leguminosa constituyen el principal objeto de estudio de esta Tesis Doctoral, se centró este apartado en el estudio de la PGPR *C. balustinum* Aur9, la cual ha demostrado la capacidad de conferir resistencia al estrés salino en plantas de *Arabidopsis* (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 2003).

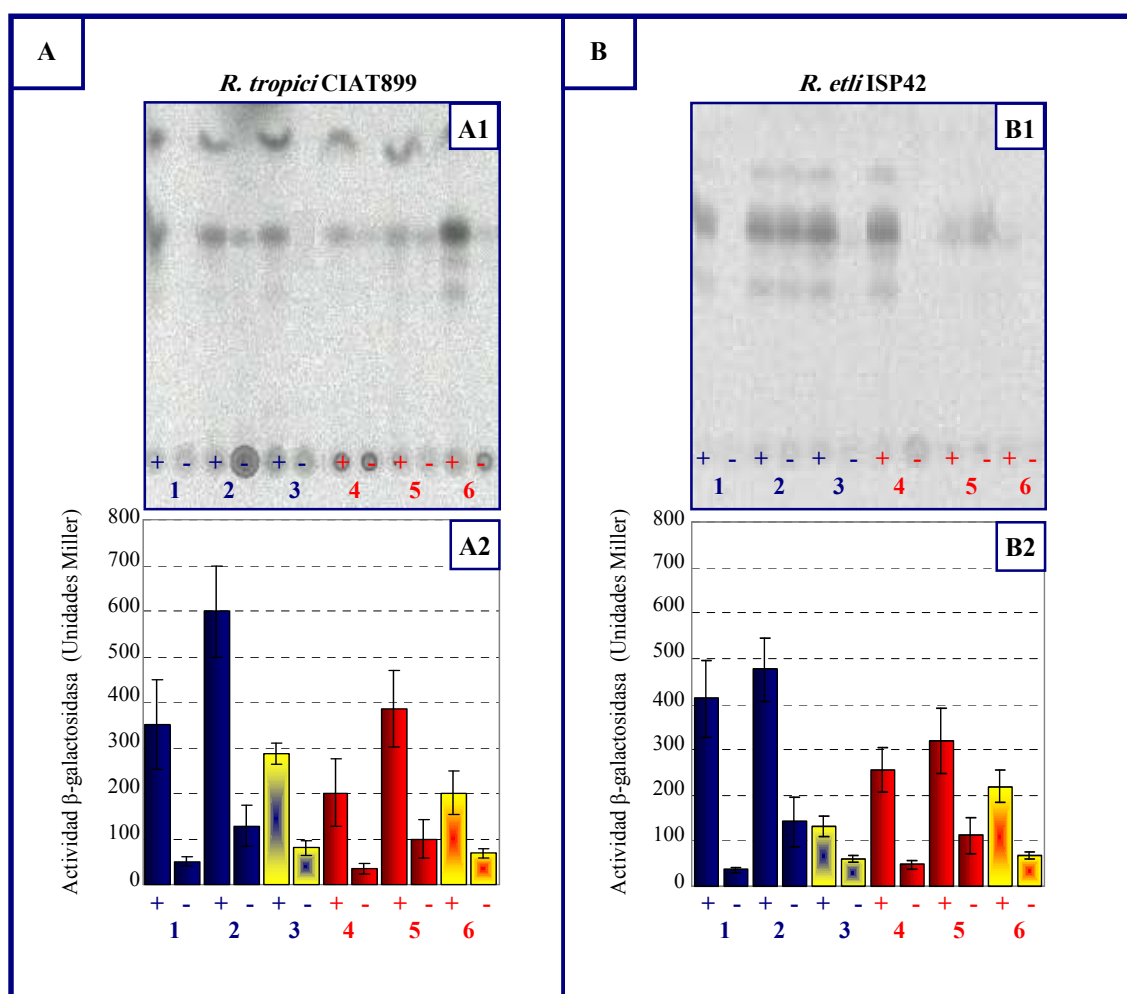
Para ello, se empleó la técnica de análisis de la actividad  $\beta$ -galactosidasa para estudiar el nivel de expresión de los genes de nodulación y los estudios por cromatografía en capa fina para examinar los factores Nod sintetizados por las cuatro cepas de rizobio en cada condición de ensayo, tal y como ya se determinó en el apartado 4.2.1.1.. Adicionalmente, se volvió a incorporar los datos de dicho apartado, a fin de facilitar el estudio comparativo de los resultados que se obtengan en presencia de la PGPR *C. balustinum* Aur9 con respecto a los ya registrados en ausencia de la misma.

La figura 4.41. nos muestra el estudio simultáneo de los perfiles cromatográficos de los factores Nod sintetizados por los rizobios nodulantes de judía *R. tropici* CIAT899 (panel A1) y *R. etli* ISP42 (panel B1), en relación con la actividad  $\beta$ -galactosidasa de cada cepa (panel A2 y B2 respectivamente), frente a exudados obtenidos de plantas de judía crecidas en presencia (**color amarillo**) o ausencia de *C. balustinum* Aur9, y bajo condiciones control (**0 mM de NaCl**) o de estrés salino (**50 mM de NaCl**). Los signos positivos indican la adición de flavonoide inductor de los genes *nod*, propio de cada cepa, a una concentración final de 1  $\mu$ M (apigenina para *R. tropici* CIAT899 y naringenina para *R. etli* ISP42). Asimismo, se incluyeron condiciones de estudio en el medio mínimo B<sup>-</sup>, con o sin flavonoide 1  $\mu$ M, y el exudado con flavonoide 1  $\mu$ M, a modo de control interno del ensayo.

Ya en el apartado 4.2.1.1. se pudo apreciar como la actividad de los genes de nodulación se afectó notablemente para los rizobios nodulantes de judía en presencia de estrés salino, originando un leve descenso en la producción de factores Nod, siendo mayor el efecto para la cepa *R. etli* ISP42 (figura 4.15., panel B1). De forma semejante, la presencia de la rizobacteria *C. balustinum* Aur9 en plantas de judía también podría modificar la exudación de la misma.

La estirpe *R. tropici* CIAT899 registró dos cambios significativos en el perfil cromatográfico de sus factores Nod cuando fue inducida por exudados de judía obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 con respecto a los exudados obtenidos en ausencia de la PGPR. En el panel A1, carril 2 negativo, correspondiente a los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 tras inducción con exudados de judía control, se puede observar una banda cromatográfica correspondiente a los factores Nod sintetizados. Sin embargo, cuando esta cepa fue inducida por exudados control obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 (panel A1, carril 3 negativo), no se observó producción alguna de factores de nodulación. Este fenómeno podría justificarse

por la disminución simultánea de la expresión de los genes *nod* en estas condiciones (panel A2, carril 3 negativo respecto a 2 negativo). No obstante, no se corresponde con lo observado en las mismas condiciones adicionadas de apigenina 1  $\mu$ M, donde también se registró una disminución en la actividad  $\beta$ -galactosidasa (panel A2, carriles 3 positivo frente a 2 positivo), más acusada incluso que en ausencia de flavonoide, y sin embargo *R. tropici* CIAT899 sí sintetizó factores Nod, al igual que ya hiciese en ausencia de *C. balustinum* Aur9 (panel A1, carril 3 positivo frente a 2 positivo).

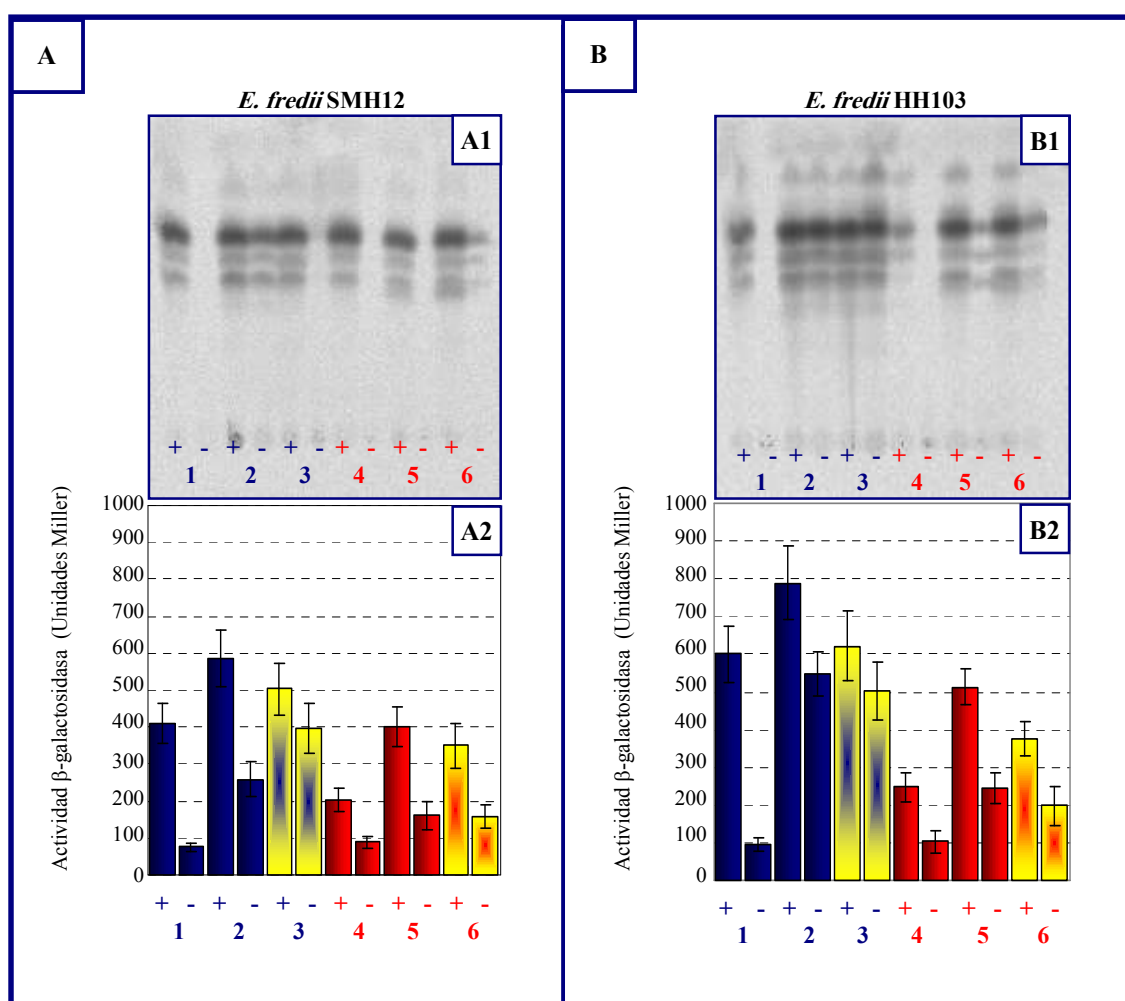


**Figura 4.41.** Efecto de los exudados de *P. vulgaris* cv. BBL obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de *C. balustinum* Aur9, sobre *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* ISP42. Paneles A1-B1.- Análisis de los factores Nod producidos en presencia de  $^{14}$ C N-acetilglucosamina. Paneles A2-B2.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas de rizobio, portadoras del plásmido informador pMP240. Condiciones: 1, medio mínimo B<sup>-</sup>; 2, exudado control (0 mM de NaCl); 3, exudado control + Aur9; 4, medio mínimo B<sup>-</sup> 50 mM de NaCl; 5, exudado 50 mM de NaCl y 6, exudado 50 mM de NaCl + Aur9. Se añadió 1  $\mu$ M del inductor correspondiente en las condiciones con signo positivo (+) (apigenina para *R. tropici* CIAT899 y naringenina para *R. etli* ISP42). Los datos se representan en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Cuando *R. tropici* CIAT899 fue inducido con exudados de judía salinos (50 mM de NaCl) obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9, los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa disminuyeron en la misma proporción que los exudados control. Sin embargo, no se registró una disminución paralela en la producción de factores Nod puesto que, en ausencia de inductor (panel A1, carril 6 negativo) *R. tropici* CIAT899 mostró síntesis de factores de nodulación, y en presencia de inductor (panel A1, 6 positivo) la capacidad de síntesis fue incluso superior a la registrada en la condición salina exenta de *C. balustinum* Aur9 (panel A1, carril 5 positivo).

Al igual que *R. tropici* CIAT899, *R. etli* ISP42 mostró cambios significativos en la pauta de síntesis de factores Nod bajo la influencia de exudados de judía obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9. Como puede observarse en la figura 4.41., *R. etli* ISP42 no sintetizó factores Nod tras ser inducida por exudados control obtenidos en presencia de la PGPR (paneles B1, carril 3 negativo) a diferencia de la inducción por exudados control obtenidos en ausencia de ella (panel B1, carril 2 negativo). De nuevo podemos relacionar este fenómeno con la disminución de la expresión de los genes *nod* inducidos por exudados obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 con respecto a los obtenidos en ausencia de la misma (panel B2, barra 3 negativa frente a 2 negativa). Por el contrario, no ocurre así en la condición adicionada de flavonoide, donde si bien los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa registrados por *R. etli* ISP42 tras ser inducida por exudados obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 disminuyen un 80% con respecto a los obtenidos en ausencia de la misma (panel B2, barras 3 y 2 positivas respectivamente), el perfil cromatográfico de los factores Nod sintetizados en dichas condiciones no varía (panel B1, carriles 3 y 2 positivos).

A continuación, se estudió el efecto de la presencia de *C. balustinum* Aur9 sobre la capacidad inductora de los exudados de plantas de soja (*G. max* cv. Osumi), siguiendo las mismas pautas establecidas para el ensayo anterior con los exudados de judía. Así, la figura 4.42. nos muestra los estudios de actividad  $\beta$ -galactosidasa (paneles A2 y B2) y CCF de los factores Nod (paneles A1 y B1) de las dos estirpes nodulantes de soja, *E. fredii* SMH12 y HH103, inducidas por exudados de soja obtenidos en presencia o ausencia de la PGPR, bajo condiciones control y de estrés salino (50 mM NaCl). Todas las condiciones indicadas se estudiaron en presencia y ausencia de genisteína 1  $\mu$ M como flavonoide inductor (signos positivo y negativo, respectivamente).



**Figura 4.42.** Efecto de los exudados de *G. max* cv. Osumi, obtenidos bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de *C. balustinum* Aur9, sobre *E. fredii* SMH12 y HH103. Paneles A1-B1.- Análisis de los factores Nod producidos en presencia de  $^{14}\text{C}$  *N*-acetilglucosamina. Panel A2-B2.- Actividad  $\beta$ -galactosidasa de las cepas de rizobio, portadoras del plásmido informador pMP240. Condiciones: 1, medio mínimo B<sup>-</sup>; 2, exudado control (0 mM de NaCl); 3, exudado control + Aur9; 4, medio mínimo B<sup>-</sup> 50 mM de NaCl; 5, exudado 50 mM de NaCl y 6, exudado 50 mM de NaCl + Aur9. Se añadió 1  $\mu\text{M}$  de genisteína en las condiciones con signo positivo (+). Los datos se representan en base a 8 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

*E. fredii* SMH12 mostró cambios significativos en la síntesis de factores Nod bajo la influencia de exudados de soja obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9. Como puede observarse en la figura 4.42., SMH12 no sintetizó factores Nod tras ser inducida por exudados control obtenidos en presencia de la PGPR (panel A1, carril 3 negativo) a diferencia de la inducción por exudados control obtenidos en ausencia de ella (panel A1, carril 2 negativo). Sin embargo, cuando el exudado probado fue obtenido bajo condiciones de estrés salino y presencia de la PGPR (panel A1, carril 6 negativo), *E.*

*fredii* SMH12 recobró la capacidad de síntesis de factores Nod. En cuanto a la actividad  $\beta$ -galactosidasa registrada por dicha cepa en estas condiciones, se observa nuevamente la débil correlación existente entre este parámetro y la tasa de producción de factores Nod, puesto que los elevados niveles de actividad enzimática que *E. fredii* SMH12 mostró tras ser inducida con exudados control obtenidos en presencia de la PGPR (panel B, barra 3 negativa) se contradicen con la carencia de factor Nod sintetizado en dicha condición (panel A, carril 3 negativo).

Por el contrario, *E. fredii* HH103 no sufrió cambios notables cuando fue inducida con exudados de soja obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 con respecto a los obtenidos en ausencia de los mismos. En la figura 4.42., panel B1, observamos efectivamente que el perfil de los factores Nod de HH103 permanece invariable tanto si se han empleado exudados control obtenidos en presencia de la PGPR (carriles 3 positivo y negativo) como en ausencia de la misma (carriles 2 positivo y negativo). Igual sucede con los exudados salinos (carriles 6 positivo y negativo frente a 5 positivo y negativo respectivamente), si bien hemos de indicar una menor intensidad de las bandas correspondientes a la condición no adicionada de flavonoide (carriles 6 y 5 negativos respectivamente), debido quizá a una disminución paralela de la expresión de los genes *nod*. Ciertamente, *E. fredii* HH103 resultó ser la estirpe que mostró mayor relación entre los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa y el perfil de factores Nod sintetizados, siendo al mismo tiempo la cepa que registró los mayores niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa de los cuatro rizobios estudiados.

Resumiendo los datos analizados en las figuras 4.41. y 4.42., podemos confirmar que la presencia de la rizobacteria *C. balustinum* Aur9 debe originar cambios, de naturaleza aún desconocida, en la composición de los exudados de judía y soja, puesto que la actividad inductora de los mismos sobre los genes *nod* rizobianos es diferente a la de exudados obtenidos en ausencia de dicha PGPR.

#### **4.3.2.2. Estudio por HPLC y Espectrometría de Masas de los exudados de raíces de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi, obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9, en condiciones control y de estrés salino.**

Puesto que el apartado 4.3.1.2. mostró que no existían relaciones negativas *a priori* entre los rizobios estudiados y *C. balustinum* Aur9 a nivel de síntesis de factores de nodulación, nos inclinamos a pensar que los cambios registrados en el apartado

anterior acerca de la inducción de los genes *nod* por exudados de judía y soja obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 sean consecuencia directa de cambios que la PGPR origine en la composición de los exudados. Varios autores indican que la presencia de ciertas bacterias en la rizosfera modifican la pauta de exudación de la planta (Cooper, 2004), y puesto que actualmente se consideran dichos cambios como el punto de partida de la regulación de la interacción tripartita rizobio-PGPR-leguminosa (Antunes *et al.*, 2006), se estimó conveniente el análisis por HPLC y Espectrometría de Masas de estos exudados, a fin de poder confirmar los cambios propuestos en la naturaleza y cuantía de sus flavonoides. La metodología empleada fue similar a la ya descrita en el apartado 4.2.1.2. y, nuevamente, se han incorporado los datos mostrados en dicho apartado para facilitar el estudio comparativo de la composición de los exudados obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 con respecto a los obtenidos en ausencia de la misma.

La tabla IV.11. recoge los flavonoides identificados en los exudados de *P. vulgaris* cv. BBL obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9, en condiciones control y de estrés salino, en contraste con los determinados en exudados recolectados en ausencia de la PGPR. Como puede observarse, los cambios en la composición del exudado de judía obtenido en presencia de *C. balustinum* Aur9 y bajo condiciones de crecimiento control son importantes en cuanto a su comparación con los recogidos en ausencia de la misma. Sólo se registraron 6 flavonoides en esta nueva condición frente a los 8 identificados en el control, de perfil de síntesis ligeramente distinto, puesto que desaparecieron los flavonoides daidzeína, isoliquiritigenina, quercetina y luteonina, mientras que al mismo tiempo se detectaron nuevos como la lisetina y apigenina. En cuanto a su pauta de glicosilación, no se registraron cambios significativos en la misma.

De forma semejante, la pauta de síntesis de flavonoides de los exudados obtenidos en condiciones salinas (50 mM de NaCl) y presencia de *C. balustinum* Aur9 también se vió alterada por acción de la rizobacteria, siendo ésta la condición que registró menor número de flavonoides de entre todas las estudiadas en los exudados de judía. Se determinaron únicamente 5, frente a los 7 correspondientes a la condición 50 mM de NaCl y ausencia de Aur9, desapareciendo la daidzeína y quercetina, y manteniéndose los cuatro flavonoides comunes a todas las condiciones de estudio: umbeliferona, naringenina, hesperetina y 4,7'-dihidroxi-flavona. Al igual que en la condición de ausencia de sal en el medio, no se modificó el perfil de glicosilación de los flavonoides, independientemente de la presencia o no de la PGPR.

**Tabla IV.11.** Flavonoides identificados en exudados de *P. vulgaris* cv. BBL obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de *C. balustinum* Aur9.

<b>Judía Control</b>	<b>Judía Estés Salino</b>
Umbeliferona (+0,8 min)	Umbeliferona (+0,8 min)
Naringenina (+0,35 min)	Naringenina
Hesperetina	Hesperetina
Daidzeína (+2,4 min)	Daidzeína (+0,2 min)
4,7'-Dihidroxi flavona (+1,0; +2,8 min)	4,7'-Dihidroxi flavona (+0,8; +2,8 min)
Isoliquiritigenina (-4,4 min)	Isoliquiritigenina (-4,5 min)
Quercetina (+3,1 min)	Quercetina (+0,3 min)
Luteonina (+0,4 min)	
<b>Judía Control + <i>C. balustinum</i> Aur9</b>	<b>Judía Estrés Salino + <i>C. balustinum</i> Aur9</b>
Umbeliferona (+1,3 min)	Umbeliferona (+1,3 min)
Naringenina (+0,4 min)	Naringenina (+0,5 min)
Hesperetina (+0,2)	Hesperetina (+0,7 min)
4,7'-Dihidroxi flavona (+1,0; +2,8 min)	4,7'-Dihidroxi flavona (+0,8; +2,8 min)
Lisetina	Isoliquiritigenina (-4,5 min)
Apigenina (+1,1 min)	

La tabla IV.12. nos muestra los flavonoides identificados en los exudados de *G. max* cv. Osumi obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9, bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino (50 mM de NaCl), en comparación con los determinados en los exudados recolectados en ausencia de la PGPR. Se puede apreciar cómo la tendencia de disminución en el número de flavonoides sintetizados por la planta en presencia de *C. balustinum* Aur9 es común a judía y soja, tanto en exudados obtenidos en condiciones control como de estrés salino. En condiciones de ausencia de sal y presencia de la PGPR, sólo se pudieron registrar 6 flavonoides frente a los 8 detectados en ausencia de la rizobacteria, si bien no se identificó ninguno nuevo.

Los cambios en el patrón de síntesis fueron aún más considerables para los exudados de soja obtenidos en condiciones de estrés salino y presencia de *C. balustinum* Aur9. En esta condición se identificaron únicamente 4 flavonoides, descritos previamente en la condición de estrés salino y ausencia de la PGPR, y que, al igual que



para los exudados de judía, resultaron ser los flavonoides comunes a las 4 condiciones de estudio. Su perfil de glicosilación fue idéntico al mostrado en presencia de sal y ausencia de *C. balustinum* Aur9.

**Tabla IV.12.** Flavonoides identificados en exudados de *G. max* cv. Osumi obtenidos en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (50 mM de NaCl), en presencia y ausencia de *C. balustinum* Aur9.

<b>Soja Control</b>	<b>Soja Estrés Salino</b>
Umbeliferona (+1,2 min)	Umbeliferona (+1,4 min)
Naringenina (+0,5 min)	Naringenina (+0,6 min)
Apigenina (-5,8; -3,5)	Apigenina (-3,4 min)
4,7'-Dihydroxiflavona (-1,9 min)	4,7'-Dihydroxiflavona (-1,8; +1,3; +3,1 min)
Isoliquiritigenina (-4,5 min)	Isoliquiritigenina (-4,0 min)
Quercetina (+1,0 min)	Quercetina (+0,3 min)
Genisteína (-5,2 min)	Morina
Daidzeína (-1,9 min)	
<b>Soja Control + <i>C. balustinum</i> Aur9</b>	<b>Soja Estrés Salino + <i>C. balustinum</i> Aur9</b>
Umbeliferona (+1,4 min)	Umbeliferona (+1,6 min)
Apigenina (-3,3)	Apigenina (-3,2 min)
4,7'-Dihydroxiflavona (-1,8 min)	4,7'-Dihydroxiflavona (-1,6; +1,4; +3,2 min)
Isoliquiritigenina (-4,0 min)	Isoliquiritigenina (-3,8 min)
Genisteína (-5,0 min)	
Daidzeína (-1,8 min)	

Analizando el conjunto de los datos presentados en ambas tablas, podemos confirmar finalmente que la presencia de la PGPR *C. balustinum* Aur9 modifica cualitativamente el perfil de producción de flavonoides de las plantas *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi, disminuyendo la diversidad de flavonoides sintetizados tanto en condiciones de exudación control (0 mM de NaCl) como de estrés salino (50 mM de NaCl). Ciertamente, esta modificación en la exudación de flavonoides por parte de la leguminosa, puede explicar los bajos niveles de inducción que muestran los ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de los exudados de judía y soja obtenidos en presencia de la PGPR (figuras 4.41. y 4.42., paneles A2-B2, barras 3 y 6 negativas) con respecto a los

obtenidos en ausencia de la misma (barras 2 y 5 negativas). Sin embargo, no consiguen explicar ciertos perfiles de producción de factores Nod como el mostrado por la cepa *E. fredii* SMH12 frente a exudados de soja obtenidos en presencia de Aur9 en condiciones salinas (figura 4.42., panel A1, carril 6 negativo).

### **4.3.3. Estudio de la interacción rizobio-PGPR-leguminosa en condiciones control y de estrés salino.**

El empleo de microorganismos rizosféricos beneficiosos, como inoculantes de diversos cultivos de interés agronómico, es una práctica bien conocida cuya finalidad principal es incrementar los rendimientos del cultivo. Si bien existe una larga experiencia muy positiva en la aplicación de los inoculantes de *Rhizobium/Bradyrhizobium* sp./leguminosas, el potencial de otros microorganismos rizosféricos sobre los vegetales, mediante mecanismos diferentes de la FBN, ha despertado un creciente interés científico y, en algunas situaciones, interés comercial. Por esta razón, en los últimos años, estudios dedicados a la caracterización de combinaciones adecuadas rizobio-PGPR que permitan un rendimiento mayor del cultivo de las leguminosas gracias a los efectos sinérgicos de ambos han ido en aumento (p. ej. Okon *et al.*, 1998; Lata Saxena & Tilak, 2000). Sin embargo, todos estos estudios deberían incluir necesariamente la leguminosa, puesto que el sistema triple rizobio-PGPR-leguminosa será el que finalmente determine la eficacia del empleo de estos coinoculantes, ya que existen muchos parámetros propios del hospedador (p. ej. exudación) que influyen positiva o negativamente sobre la actividad de la comunidad microbiana (Bertin *et al.*, 2003).

#### **4.3.3.1. Estudio de la actividad biológica de *R. tropici* CIAT899 y *E. fredii* SMH12, en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa y *G. max* cv. Osumi, preinoculadas con *C. balustinum* Aur9, bajo condiciones control y de estrés salino.**

Estudios de Antunes *et al.* (2006) proponen que el efecto de la comunidad adyacente al sistema tripartito rizobio-micorriza-leguminosa puede modificar los mecanismos de señalización entre los integrantes del sistema, manifestándose dichos cambios como alteraciones en los estadios iniciales de la simbiosis. Puesto que los

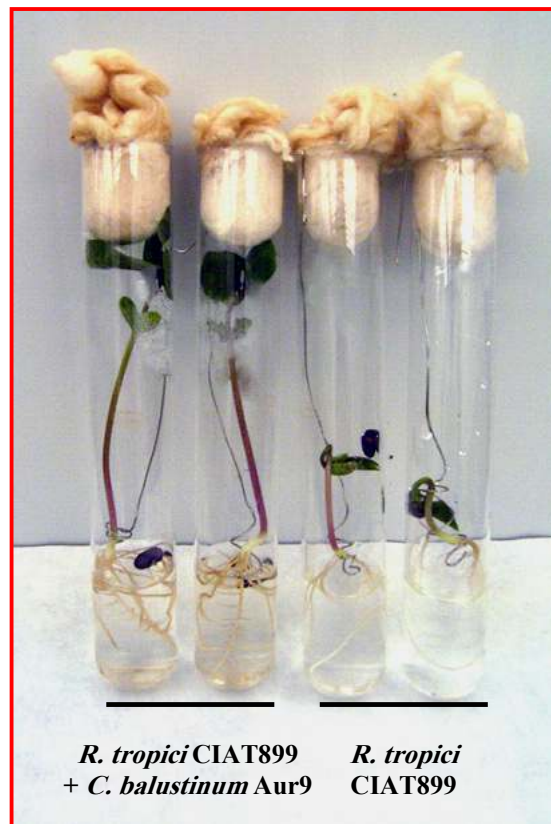
estudios llevados a cabo en el apartado 4.3.2. confirmaron que la presencia de la rizobacteria *C. balustinum* Aur9 altera significativamente el perfil de exudación de plantas de judía y soja (vía de comunicación de la leguminosa para con sus cepas nodulantes), resolvimos estudiar algunos aspectos de las fases iniciales de la simbiosis de los rizobios seleccionados para nuestro estudio con sus hospedadores correspondientes en presencia de dicha PGPR.

Para ello, se repitieron los ensayos de actividad biológica detallados en el apartado 4.2.2., empleando por segunda vez la estirpe *R. tropici* CIAT899 como cepa nodulante de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa y *E. fredii* SMH12 como nodulante de *G. max* cv. Osumi. Las condiciones de ensayo establecidas fueron nuevamente control (solución nutritiva Fåhraeus 0 mM de NaCl, pH 7,0) y de estrés salino (solución nutritiva Fåhraeus 25 mM de NaCl, pH 7,0). Tal y como se indicó previamente, la PGPR seleccionada fue la estirpe *C. balustinum* Aur9.

Bajo condiciones de crecimiento control, se inoculó un primer grupo de plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa con la PGPR *C. balustinum* Aur9. Tras un periodo mínimo de 15 horas, se inoculó con *R. tropici* CIAT899 este mismo grupo de plantas y otro semejante pero carente de la PGPR. A la finalización del ensayo (ver Material y Métodos, apartado 3.8.5.), no se observó diferencias significativas entre las plantas con inóculo simple (*R. tropici* CIAT899) y las plantas con inóculo doble (*C. balustinum* Aur9 + *R. tropici* CIAT899). Sin embargo, cuando las condiciones de estudio fueron estresantes para la planta, esto es solución de crecimiento Fåhraeus 25 mM de NaCl, la promoción por parte de la PGPR fue mucho más acusada que en condiciones control, puesto que permitió que la planta mantuviese, en líneas generales, las mismas características que ésta mostraba bajo condiciones control. Por el contrario, aquellas que carecían de la PGPR sufrieron un retroceso generalizado en su desarrollo como consecuencia del estrés salino, tal y como se detalló anteriormente en el apartado 4.2.2.2..

Efectivamente, parámetros indicativos de la eficacia de la simbiosis rizobio-leguminosa, como son el desarrollo nodular, número de primordios y nódulos y desarrollo vegetativo de la planta, resultaron favorecidos en aquellas condiciones de estrés salino en que la judía fue inoculada con la PGPR previo a la inoculación con el rizobio, en comparación con las que únicamente fueron inoculadas con *R. tropici* CIAT899. Así, a los cinco días del inicio del ensayo, las plantas de judía con el inóculo doble, crecidas en condiciones de estrés salino (25 mM de NaCl), mostraban un mayor

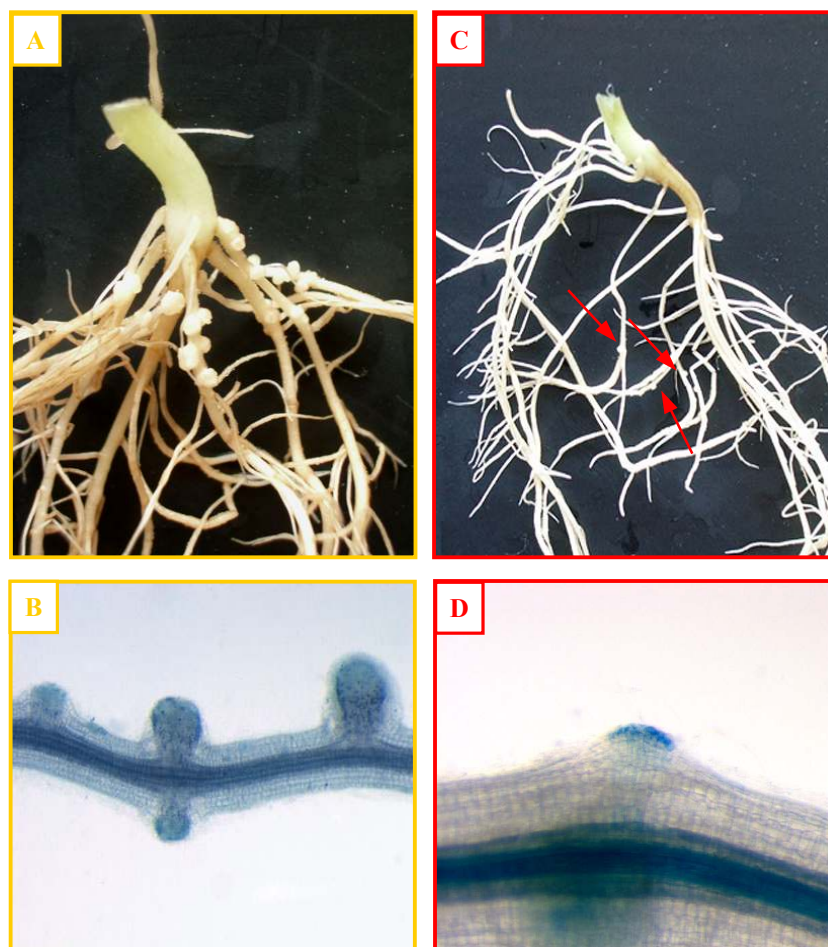
desarrollo vegetativo que aquellas que fueron inoculadas únicamente con *R. tropici* CIAT899, tal y como podemos observar en la figura 4.43..



**Figura 4.43.** Desarrollo vegetativo de plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa inoculadas con *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9 o *R. tropici* CIAT899. Las plantas, crecidas en solución Fåhraeus 25 mM de NaCl, fueron fotografiadas al quinto día de ensayo.

Seguidamente, la figura 4.44. nos muestra nuevos aspectos de la promoción del crecimiento de plantas de judía por parte de la PGPR *C. balustinum* Aur9, bajo condiciones de estrés salino. Se observa como la cantidad y el tamaño de los nódulos de las plantas de judía inoculadas con la mezcla *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9 (**panel A**) es significativamente mayor con respecto a los observados en plantas inoculadas exclusivamente con *R. tropici* CIAT899 (**panel C**, señalados con flechas).

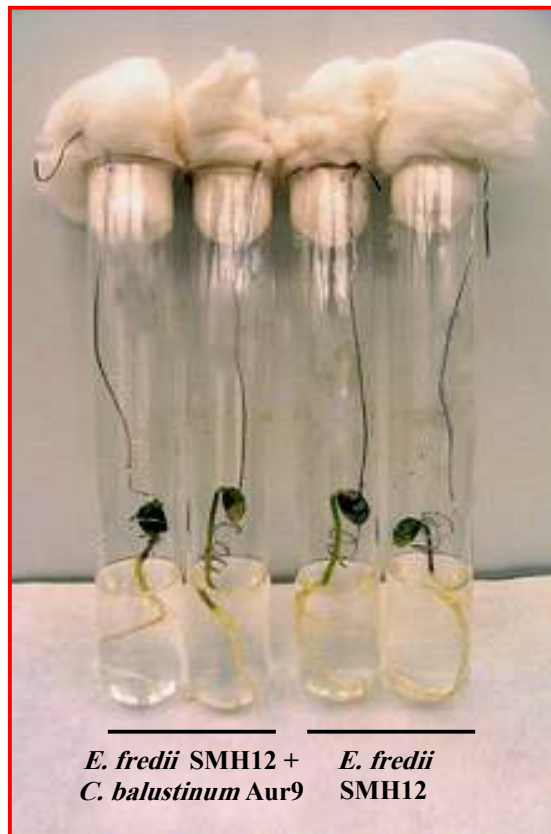
Paralelamente, esta promoción en la tasa de nodulación y tamaño de los nódulos se puede extrapolar a estadios más tempranos del proceso simbiótico rizobio-leguminosa, puesto que los primordios nodulares observados en las plantas inoculadas con la mezcla rizobio-PGPR (**panel B**) se encontraban mucho más desarrollados que los observados en aquellas plantas inoculadas únicamente con el rizobio (**panel D**), alcanzando la mayoría de ellos el estado final de nódulo.



**Figura 4.44.** Detalle de raíz (panel A-C) y nódulos y/o primordios nodulares (panel B-D) de plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa inoculadas con *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9 (columna izquierda, **recuadro amarillo**) o con *R. tropici* CIAT899 (columna derecha, **recuadro rojo**), ambas bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl. La duración de ambos ensayos fue de 10 días.

A continuación, se realizó el mismo ensayo de actividad biológica para plantas de soja con su inoculante correspondiente, *E. fredii* SMH12, en presencia de la rizobacteria *C. balustinum* Aur9. Igualmente, se volvieron a establecer las condiciones de estudio control y de estrés salino (25 mM de NaCl), manteniéndose el protocolo de inoculación con la PGPR mínimo 15 horas (generalmente 48 horas) antes de añadir el rizobio al soporte de ensayo. De forma similar a los resultados mostrados en el apartado 4.2.2.1., las plantas crecidas en condiciones estresantes mostraron un retraso del desarrollo vegetativo, con una leve disminución de la tasa de nodulación, y nódulos y primordios en fases de desarrollo más bien tempranas. Sin embargo, a diferencia de lo detallado anteriormente para el ensayo de judía, no se registraron diferencias significativas entre los inóculos dobles y simples, tanto en condiciones control como de estrés salino, para

ninguno de los parámetros objeto de estudio (biomasa, tamaño y número de nódulos y desarrollo de primordios nodulares). Las plantas crecidas en condiciones control con los inóculos dobles o simples no mostraron diferencias significativas entre ellas. La figura 4.45. nos muestra un ejemplo del desarrollo vegetativo de plantas de *G. max* cv. Osumi crecidas bajo condiciones de estrés salino (25 mM de NaCl) e inoculadas con *C. balustinum* Aur9 + *E. fredii* SMH12 o *E. fredii* SMH12 sólo.



**Figura 4.45.** Desarrollo vegetativo de plantas de *G. max* cv. Osumi inoculadas con *E. fredii* SMH12 + *C. balustinum* Aur9 o *E. fredii* SMH12. Las plantas, crecidas en solución Fåhraeus 25 mM de NaCl, fueron fotografiadas al quinto día de ensayo.

Los resultados mostrados nos permiten presuponer una posible actividad protectora de la PGPR *C. balustinum* Aur9 frente al estrés salino en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, si bien este efecto no es extrapolable a plantas de *G. max* cv. Osumi. No obstante, estos datos deberían ser corroborados a escalas superiores de experimentación y tiempos mas largos que permitan confirmar esta ventajosa cualidad de *C. balustinum* Aur9 en soportes de ensayo más en consonancia con los sistemas empleados en test de nodulación.

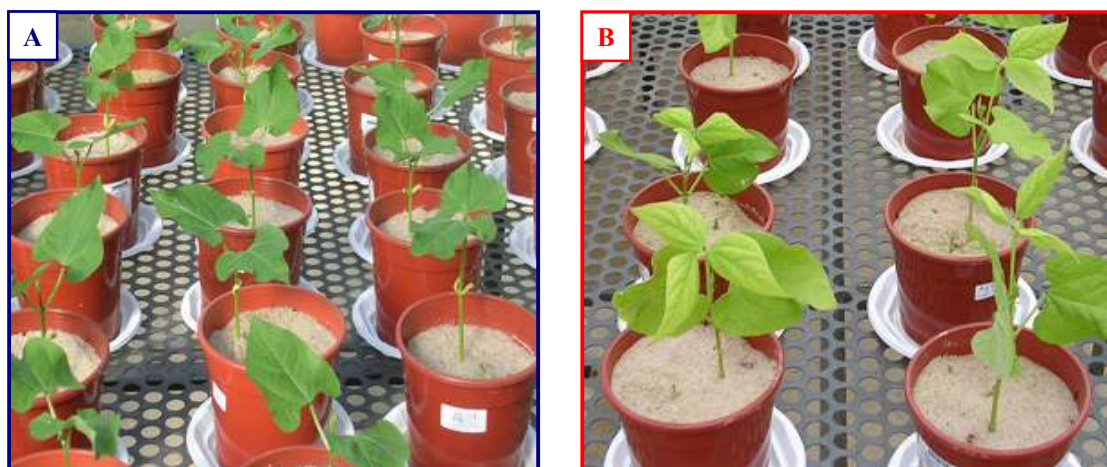
#### **4.3.3.2. Ensayos de nodulación de *R. tropici* CIAT899 y *E. fredii* SMH12 en plantas de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi, respectivamente, en presencia o ausencia de *C. balustinum* Aur9, bajo condiciones control y de estrés salino.**

En función de los resultados obtenidos en los epígrafes anteriores, nos propusimos como último apartado de esta Tesis Doctoral confirmar la actividad protectora frente al estrés salino de la PGPR *C. balustinum* Aur9 en plantas de judía y soja en niveles superiores de experimentación. Consecuentemente, se estudiaron diversos parámetros indicativos de la tasa de FBN, tanto en condiciones control como de estrés salino, con el fin de poder comparar la eficacia de los inoculantes simples y dobles en ambas condiciones. Así, se establecieron como nuevos soportes de ensayo macetas de arena de cuarzo estéril donde se realizaron ensayos de nodulación de 28 días de duración, cuya preparación y manejo vienen ampliamente detallados en el apartado 3.8.6. de Material y Métodos.

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos preliminares de tolerancia a la sal de cultivares de judía (*P. vulgaris* cv. BBL) y soja (*G. max* cv. Osumi), estableciéndose finalmente 25 mM de NaCl como la concentración de ensayo para condiciones de estrés salino, de forma que se puedan observar fácilmente los efectos negativos de la sal sobre ambos cultivares, sin llegar a comprometer en exceso su crecimiento.

Desafortunadamente, no se pudo unificar la condición de estrés salino en este caso con la establecida en los apartados 4.2.1. y 4.3.2. (50 mM de NaCl) como consecuencia de la larga duración de los ensayos de nodulación (mínimo 28 días) puesto que el desarrollo vegetativo de las plantas alcanzaba un estado crítico debido a un posible acumulación de la sal en el soporte de ensayo. Ciertamente, las condiciones de estrés salino que se fijan para un determinado estudio en un soporte concreto no deben ser siempre equiparables a las condiciones de otro ensayo de metodología diferente (ver Discusión, apartado 5.2.).

La figura 4.46. muestra detalles de las consecuencias negativas que la sal ejerce sobre plantas de judía como por ejemplo el color amarillo de las hojas, retraso en el desarrollo y disminución de biomasa entre otros. Estos efectos comenzaron a ser visibles a partir del 5 día de ensayo, y fueron en aumento sustancialmente con el paso del tiempo hasta la finalización del mismo. Por el contrario, las plantas de soja no mostraron un retraso en el crecimiento tan notable como las de judía en condiciones de estrés salino.



**Figura 4.46.** Plantas de *P. vulgaris* cv. BBL crecidas bajo condiciones de crecimiento control (0 mM de NaCl, **panel A**) y de estrés salino (25 mM de NaCl, **panel B**). El tiempo de ensayo mostrado es de 8 días para ambas condiciones.

Una vez establecido el valor de 25 mM de NaCl como la condición de estrés salino para las plantas de judía y soja, se inocularon ambos cultivares con sus respectivos simbiontes (*R. tropici* CIAT899 y *R. etli* ISP42 para judía y *E. fredii* SMH12 y HH103 para soja), en combinación o no con *C. balustinum* Aur9, tanto en condiciones de crecimiento control como de estrés salino. Nuevamente, la respuesta de ambas leguminosas a los inóculos dobles (PGPR + rizobio), creciendo tanto en condiciones control como salinas moderadas, mostraron una tendencia diferente.

La tabla IV.13. muestra en primer lugar los resultados obtenidos en los test de nodulación de plantas de judía, tanto en condiciones control como de estrés salino, con inóculos simples (rizobio) o dobles (rizobio + PGPR). En ausencia de sal, la capacidad de nodulación de la estirpe *R. etli* ISP42 fue superior a la de *R. tropici* CIAT899, si bien el peso unitario de los nódulos (PUNOD) de las plantas inoculadas con esta última fue significativamente mayor. Cuando se ensayaron los inóculos dobles, la tasa de nodulación de *R. etli* ISP42 disminuyó sorprendentemente, mientras que incrementó cuantiosamente el peso seco de la parte aérea (PSPA) en las plantas inoculadas con la mezcla *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9. Este parámetro siempre fue significativamente mayor para cualquier tratamiento que para las plantas no inoculadas (testigo).

En condiciones de estrés salino y ausencia de rizobio y/o PGPR, el cultivar BBL de *P. vulgaris* vio reducido su desarrollo vegetativo, tanto el PSPA como el peso seco



de la raíz (PSR), en comparación con las plantas control, de forma semejante a lo observado en los ensayos de actividad biológica del apartado anterior. Esta disminución se hizo extensiva a la mayoría de los tratamientos simples y dobles, siendo superior a un 40% para prácticamente todos los parámetros estudiados. El tratamiento con *R. etli* ISP42, con o sin *C. balustinum* Aur9, es un claro reflejo de este fenómeno. Todos sus parámetros de estudio se vieron disminuidos bajo condiciones de estrés salino frente a los registrados en condición control. Aún más, el tratamiento con el coinoculante *R. etli* ISP42 + *C. balustinum* Aur9 registró sólo el 55% de los nódulos contabilizados cuando se empleó el inoculante simple *R. etli* ISP42, indicativo de un efecto negativo de la PGPR sobre el proceso de nodulación bajo condiciones de estrés salino.

**Tabla IV.13.** Parámetros de nodulación de *P. vulgaris* cv. BBL en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl), con inóculos simples (*R. tropici* CIAT899 o *R. etli* ISP42) o dobles (*R. tropici* CIAT899 o *R. etli* ISP42 + *C. balustinum* Aur9). Los datos se representan en base a 6 ensayos independientes, con un análisis ANOVA de la desviación estándar ( $P < 0,05$ ). Las letras “a”, “b” y “c” identifican grupos de datos significativamente distintos dentro de una misma columna, las letras “A”, “B” y “C” grupos de datos significativamente distintos para una misma cepa en todas las condiciones ensayadas (tratamiento doble-simple y condición control-salina) para un determinado parámetro.

Inóculos	Condiciones Control (0 mM de NaCl)				Condiciones Salinas (25 mM de NaCl)			
	PSPA (mg) <sup>i</sup>	Nº NOD <sup>ii</sup>	PSR (mg) <sup>iii</sup>	PUNOD (mg) <sup>iv</sup>	PSPA (mg) <sup>i</sup>	Nº NOD <sup>ii</sup>	PSR (mg) <sup>iii</sup>	PUNOD (mg) <sup>iv</sup>
CIAT899	762 b B	242 b A	343 b A	577 a A	311 b C	253 a A	170 b B	401 a A
CIAT899 + Aur9	1027 a A	327 b A	377 b A	590 a A	487 a BC	119 b B	278 a A	186 b B
ISP42	647 b A	704 a A	380 b A	339 b A	312 b B	207 a BC	188 b B	169 b B
ISP42 + Aur9	657 b A	423 b B	317 b A	416 b A	279 bc B	87 b C	172 b B	199 b B
Testigo	420 c A	0	503 a A	0	240 c B	0	316 a B	0

- i. PSPA (peso seco de parte aérea)
- ii. Nº NOD (número de nódulos por planta)
- iii. PSR (peso seco de raíz)
- iv. PUNOD (peso seco unitario de nódulos)

Por otro lado, la respuesta de las plantas de judía bajo condiciones de estrés salino, frente al rizobio *R. tropici* CIAT899, con o sin *C. balustinum* Aur9, fue mucho más

heterogénea. Los parámetros de nodulación (N° NOD y PUNOD) en tratamiento con el inóculo simple se mantuvieron dentro de los mismos valores registrados en la condición control. Sin embargo, al ensayar el inóculo doble *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9, ambos parámetros sufrieron una acusada disminución por la presencia de la PGPR de aproximadamente un 60%. Por el contrario, los valores de los PSPA y PSR disminuyeron significativamente con respecto a los registrados en la condición control cuando se trataron las plantas con el inóculo simple, pero se recuperaron al ser inoculados con la mezcla *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9 hasta alcanzar niveles control.

A continuación, la tabla IV.14. muestra los datos obtenidos para el ensayo de nodulación en plantas de soja por las cepas *E. fredii* SMH12 y HH103, en combinación o no con *C. balustinum* Aur9.

**Tabla IV.14.** Parámetros de nodulación de *G. max* cv. Osumi en condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl), con inóculos simples (*E. fredii* SMH12 o HH103) y dobles (*E. fredii* SMH12 o HH103+ *C. balustinum* Aur9). Los datos se representan en base a 6 ensayos independientes, con un análisis ANOVA de la desviación estándar (P<0,05). Las letras “a”, “b” y “c” identifican grupos de datos significativamente distintos dentro de una misma columna, las letras “A” y “B” grupos de datos significativamente distintos para una misma cepa en todas las condiciones ensayadas (tratamiento doble-simple y condición control-salina) para un determinado parámetro.

Inóculos	Condiciones Control (0 mM de NaCl)				Condiciones Salinas (25 mM de NaCl)			
	PSPA (mg) <sup>i</sup>	N° NOD <sup>ii</sup>	PSR (mg) <sup>iii</sup>	PUNOD (mg) <sup>iv</sup>	PSPA (mg) <sup>i</sup>	N° NOD <sup>ii</sup>	PSR (mg) <sup>iii</sup>	PUNOD (mg) <sup>iv</sup>
SMH12	533 b AB	25 b B	201 c B	1709 a A	440 b B	17 b B	147 b B	859 a B
SMH12 + Aur9	703 a A	52 a A	402 a A	1663 a A	650 a A	64 a A	353 b A	985 a B
HH103	450 b B	35 b B	168 c B	840 b A	427 b B	28 b B	175 b B	860 a A
HH103 + Aur9	557 b A	82 a A	328 b A	741 b A	407 b B	35 b B	278 a A	745 a A
Testigo	455 b A	0	181 c A	0	407 b A	0	160 b A	0

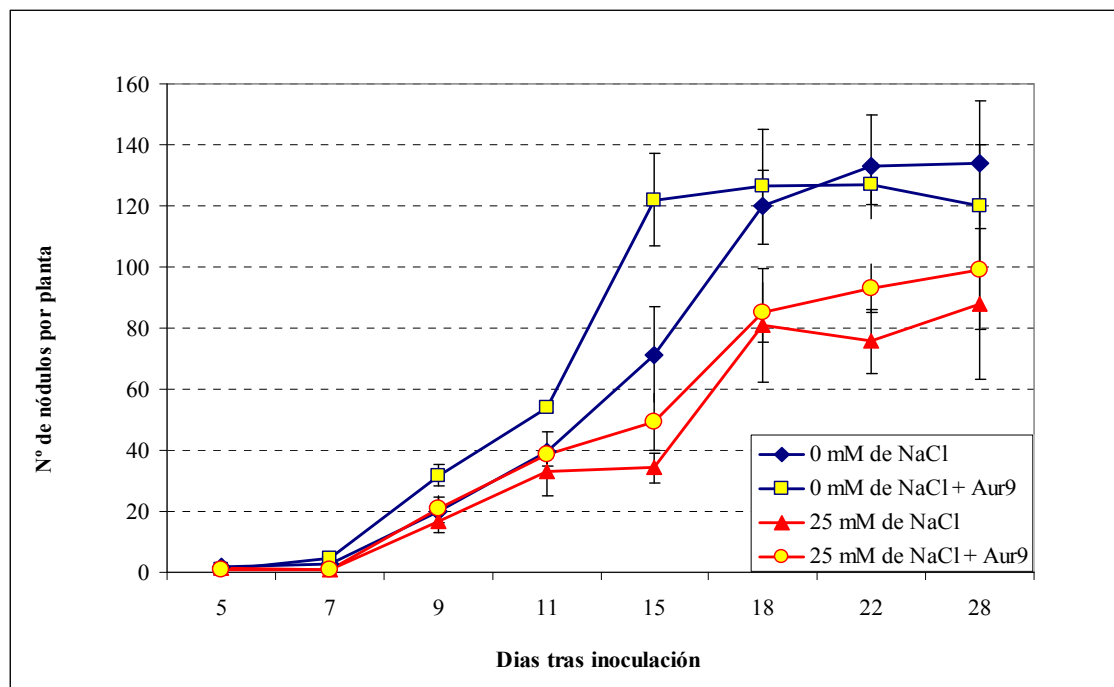
- i. PSPA (peso seco de parte aérea)
- ii. N° NOD (número de nódulos por planta)
- iii. PSR (peso seco de raíz)
- iv. PUNOD (peso seco unitario de nódulos)

Los datos mostrados indican que esta PGPR puede considerarse altamente eficaz en el cultivo de soja, puesto que el tratamiento con su inóculo doble en condiciones control duplicó los niveles registrados en el tratamiento con el inóculo simple, de forma mucho más acusada para la cepa *E. fredii* SMH12. Adicionalmente, ejerce un valioso efecto protector frente a la sal en este cultivar de soja, puesto que el tratamiento con la mezcla *E. fredii* SMH12 + *C. balustinum* Aur9 equiparó todos los niveles a los registrados al inocular con esta mezcla en condiciones control, menos el PUNOD, el cual fue el único parámetro que no se incrementó en la condición control al inocular las plantas con el tratamiento doble frente al simple. En función de los resultados presentados podemos afirmar que los inoculantes dobles son significativamente más efectivos que los simples en plantas de soja que en judía, y aun mejor la combinación *E. fredii* SMH12 + *C. balustinum* Aur9 que *E. fredii* HH103 + *C. balustinum* Aur9, hipótesis corroborada por los estudios de Lucas-García *et al.* (2004a).

En el apartado anterior indicábamos que la promoción del crecimiento y nodulación por parte del *C. balustinum* Aur9 se observó en plantas de judía y no de soja, al contrario que lo resultados de nodulación aquí referidos. Sin embargo, dicha promoción fue evaluada en cortos periodos de tiempo en comparación con los test de nodulación realizados, además de haberse empleado un cultivar distinto de *P. vulgaris*. Por este motivo, nos propusimos realizar una cinética de nodulación de *R. tropici* CIAT899 en plantas de *P. vulgaris* cv. BBL, en ausencia y presencia de la PGPR, con el fin de confirmar el efecto protector que *C. balustinum* Aur9 ejerce frente al estrés salino en los primeros 10 días del ensayo.

Así, la figura 4.47. nos muestra el número de nódulos contabilizados en plantas de *P. vulgaris* cv. BBL inoculadas con *R. tropici* CIAT899 exclusivamente o con la mezcla *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9, bajo condiciones de crecimiento control y de estrés salino (25 mM de NaCl), durante un periodo de tiempo de 28 días.

Como puede observarse en la figura 4.47., la combinación *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9, bajo condiciones control, registró un mayor número de nódulos que el inóculo simple del rizobio en las mismas condiciones durante los primeros 18 días del ensayo. A partir de este punto, y hasta la finalización del mismo, estos valores se equipararon. Bajo condiciones de estrés salino, también se observó una leve promoción de la PGPR en cuanto al número de nódulos contabilizados por el inoculante doble de *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9, si bien no existen diferencias significativas con respecto al inóculo simple.



**Figura 4.47.** Estudio de la cinética de nodulación de *R. tropici* CIAT899 en plantas de *P. vulgaris* cv. BBL, en ausencia o presencia de la PGPR *C. balustinum* Aur9, bajo condiciones control (0 mM de NaCl) y de estrés salino (25 mM de NaCl). Los datos se representan en base a 3 repeticiones independientes  $\pm$  la desviación estándar.

Estos resultados parecen indicar que el efecto promotor de la nodulación por parte de la PGPR *C. balustinum* Aur9 sobre plantas de *P. vulgaris*, crecidas en condición control, parece estar restringido a los primeros días de la inoculación, tal y como mostraban los ensayos de actividad biológica del apartado 4.3.3.1. y la cinética anterior. La nodulación se ve significativamente adelantada, si bien a la finalización del ensayo se equiparan los valores entre ambos inoculantes (simples y dobles).

DISCUSIÓN



## **5. Discusión.**

- 5.1. Efecto del estrés salino sobre el microsimbionte.
- 5.2. Efecto del estrés salino sobre el macrosimbionte (leguminosa) y la simbiosis rizobio-leguminosa.
- 5.3. Estudio del empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) en la simbiosis rizobio-leguminosa, bajo condiciones control y de estrés salino.

## ÍNDICE DE FIGURAS DE DISCUSIÓN.

### **Página**

5.1. Plantas de <i>P. vulgaris</i> cv. Negro Jamapa, crecidas en condiciones control y de estrés salino (25 y 50 mM de NaCl), en sistemas de recogida de exudados y tubos de ensayo de actividad biológica.....	217
---	-----



## 5.1. Efecto del estrés salino sobre el microsimbionte.

La familia de las fabáceas o leguminosas establece una relación simbiótica con el grupo de bacterias conocidas como “rizobios”, durante la cual las bacterias inducen la creación de unos órganos en los pelos radicales de la leguminosa (denominados nódulos), dentro de los cuales se produce la fijación del nitrógeno atmosférico. De esta forma, la planta incorpora el nitrógeno necesario para realizar sus funciones metabólicas, a cambio de sustancias carbonadas que ésta aporta al rizobio (Kahn *et al.*, 1998).

Estudios previos han indicado que las leguminosas que están en simbiosis con los rizobios son más susceptibles al estrés abiótico que aquellas suplementadas con nitrógeno mineral (Hungria & Franco, 1993; Hungria & Vargas, 2000). Esto es debido no sólo a la influencia de los factores ambientales sobre la planta hospedadora y la población de rizobios, sino también sobre la propia interacción simbiótica. En este trabajo hemos analizado qué efectos provoca la salinidad sobre el diálogo molecular, imprescindible para que se produzca el establecimiento de una simbiosis efectiva entre las leguminosas y los rizobios.

Se seleccionaron como leguminosas de estudio la judía (*P. vulgaris*) y la soja (*G. max*), por su extenso e importante cultivo a nivel mundial, y las cepas de rizobio *R. tropici* CIAT899 y *R. etli* ISP42 como nodulantes de judía, y *E. fredii* SMH12 y HH103 como nodulantes de soja. La elección de la cepa CIAT899 estuvo avalada por la amplia experiencia que nuestro grupo de trabajo tiene con ella, además de estar catalogada como una cepa altamente tolerante a distintos tipos de estrés (Hungria *et al.*, 2003), mientras que la estirpe ISP42 ha sido descrita como una muy eficaz nodulante de judía aislada del suelo de la provincia de Córdoba (Rodríguez-Navarro *et al.*, 2000). Paralelamente, se seleccionó como cepas nodulantes de soja la estirpe modelo HH103 (nodulante de soja de crecimiento rápido, considerada como buena alternativa al inoculante de soja tipo-USDA-) y la cepa SMH12, ambas *E. fredii*, si bien la segunda ha demostrado tener una mayor estabilidad genética, característica que favorece su empleo en estudios de nodulación (Buendía-Clavería *et al.*, 1989; Rodríguez-Navarro *et al.*, 2003).

En primer lugar se abordó el estudio del efecto que el estrés salino ejerce sobre el microsimbionte, estableciendo como punto de partida la determinación de los valores de

tolerancia a la sal de cada una de las cuatro cepas. La bibliografía consultada al respecto es muy heterogénea en cuanto a la definición de cepa tolerante, puesto que indican los cambios que se desarrollan en una cepa tolerante o sensible frente a determinado tipo de estrés (Galinski, 1995; Miller & Wood, 1996), pero no establecen un valor que limite las características de tolerancia y/o sensibilidad de una determinada cepa. Por ello, consideraremos que una estirpe bacteriana es tolerante cuando, a una determinada condición de estrés, los valores de las células viables del cultivo bacteriano no disminuyan en más de dos órdenes de magnitud exponencial con respecto a la condición de crecimiento control. Teniendo en cuenta esta premisa como punto de partida para la caracterización de los inoculantes, se determinó la tolerancia a la sal de las cepas creciendo las bacterias en medio mínimo líquido en distintas concentraciones de NaCl. La respuesta observada a la sal fue muy diversa puesto que la estirpe *E. fredii* HH103 toleró hasta 400 mM de NaCl, mientras que *R. tropici* CIAT899 y *E. fredii* SMH12 fueron tolerantes hasta valores de 300 mM, y la cepa *R. etli* ISP42 no superó la concentración de 100 mM. El recuento de células viables realizado paralelamente nos confirmaron que *R. tropici* CIAT899 y *E. fredii* SMH12 no disminuyeron de forma significativa cuando se cultivaron en condiciones salinas con respecto a la condición control. Sin embargo, las cepas *E. fredii* HH103 y *R. etli* ISP42 en presencia de sal sufren una drástica disminución en el número de células viables respecto al control sin estrés, en un 50 y 80% respectivamente.

En base a estos resultados, hemos conocido el comportamiento de las bacterias seleccionadas respecto al estrés abiótico estudiado, analizando a nivel básico la capacidad de respuesta que poseen estos rizobios en condiciones estresantes y la influencia del mismo en el proceso simbiótico con la leguminosa. No obstante, el crecimiento óptimo de estos cultivos bacterianos en condiciones de estrés salino no asegura un proceso de interacción eficaz entre el microsimbionte y su hospedador, ya que existen otros muchos parámetros que influyen en la efectividad de una determinada cepa como inoculante (Soria *et al.*, 2006). De hecho, algunas cepas, aunque toleren eficazmente el estrés salino, muestran una disminución significativa en su eficiencia simbiótica cuando los ensayos de interacción se realizan en presencia de dicho estrés (Nair *et al.*, 1993).

Es interesante destacar que el diálogo molecular establecido entre la bacteria y la planta puede verse afectado por el estrés abiótico, tanto a nivel de las moléculas excretadas por las plantas (flavonoides) como de las sintetizadas por los rizobios

(factores de nodulación). Efectivamente, trabajos previamente realizados en nuestro grupo de investigación (Morón *et al.*, 2005) indican que la acidez afecta a la biosíntesis de los factores Nod. Por este motivo, decidimos estudiar el efecto del estrés salino sobre la síntesis de los factores Nod de las cepas objeto de estudio. En la figura 4.3. se muestra como, únicamente la cepa nodulante de judía *R. tropici* CIAT899, presenta modificaciones en el perfil cromatográfico de sus factores Nod. En condiciones inducidas por apigenina, no sólo se incrementó la intensidad de las bandas cromatográficas ya caracterizadas en la condición control, indicativo de un aumento de la cantidad de factores Nod sintetizados, sino que también se observaron nuevas bandas no descritas anteriormente que podrían corresponderse con nuevos factores Nod de naturaleza aún no conocida. Al mismo tiempo, se observó cómo en condiciones no inducidas se sintetizaron factores Nod a pesar de la ausencia de flavonoide en el medio, fenómeno indicativo de una síntesis de factores Nod independiente de la presencia de inductores en el medio, mediante un mecanismo de desregulación desconocido.

Estos resultados son semejantes a los descritos por Morón *et al.* (2005) en esta misma cepa bajo condiciones de estrés ácido, donde se incrementaba la cantidad y naturaleza de los factores Nod sintetizados en condiciones de estrés ácido (pH 4,5) frente a las condiciones control. Por el contrario, McKay y Djordjevic (1993) indicaron como la síntesis de los factores de nodulación disminuía por efecto de las bajas temperaturas en *R. leguminosarum* bv. trifolii. Análogamente, el estrés salino podría tanto incrementar como disminuir la producción de los factores Nod de las cepas de rizobios.

Teniendo en cuenta que este fenómeno de incremento de los factores Nod fue observado únicamente en una estirpe nodulante de judía, nos propusimos ampliar el estudio a varias cepas pertenecientes a los géneros nodulantes de *Phaseolus*, para determinar si se trata de un fenómeno generalizado o no. De este modo, se seleccionaron como cepas a estudiar a un representante de cada uno de los géneros aislados de nódulos de judía: *R. etli* CFN42, *R. gallicum* bv. gallicum R602 y bv. phaseoli PhD12, *R. giardinii* bv. giardinii H152 y bv. phaseoli Ro84, *R. leguminosarum* bv. phaseoli TAL1121 y *R. tropici* CFN299 y CIAT899. Se determinó en primer lugar su tolerancia al estrés salino, la cual fue muy variable de unas cepas a otras.

Tal y como ya indicamos en el apartado 4.1.2.1. de los Resultados, *R. giardinii* bv. giardinii H152 y bv. phaseoli Ro84, *R. gallicum* bv. phaseoli PhD12 y *R. tropici* CFN299 y CIAT899 fueron capaces de crecer bajo condiciones de estrés salino 300 mM

de NaCl, mientras que *R. gallicum* bv. gallicum R602 sólo registró crecimiento hasta 200 mM, y *R. leguminosarum* bv. phaseoli TAL1121 y *R. etli* CFN42 no pudieron superar el valor de 100 mM. Esta heterogeneidad en la respuesta fue igualmente descrita para los estudios desarrollados en condiciones de acidez (Belén Morón, Tesis Doctoral). Sin embargo, no se pudo establecer correlación alguna entre los rangos de tolerancia de un estrés con respecto al otro. Sirva como ejemplo el comportamiento de la cepa *R. giardinii* bv. giardinii H152, cuya tolerancia a la acidez no abarcó más de una unidad (pH 7,0-8,0) a pesar de tolerar hasta 300 mM de NaCl.

Posteriormente, se estudió la síntesis de los factores Nod de estas cepas nodulantes de judía bajo condiciones de estrés salino para poder determinar si existe algún cambio significativo con respecto a los perfiles observados en condición control. Nuevamente, se observó una gran variabilidad en la respuesta frente a la sal, puesto que algunas cepas como *R. tropici* CFN299 y CIAT899 y *R. gallicum* bv. gallicum R602 vieron incrementada su producción de factores Nod de forma directamente proporcional a la concentración salina del medio, otras no registraron cambio alguno (*R. leguminosarum* bv. phaseoli TAL1121 y *R. gallicum* bv. phaseoli PhD12) y un tercer grupo sufrió una disminución en su producción con concentraciones crecientes de sal (*R. etli* CFN42, *R. giardinii* bv. giardinii H152 y *R. giardinii* bv. phaseoli Ro84). Esta respuesta tan heterogénea podría estar relacionada con sus diferentes rangos de tolerancia a la sal. Efectivamente, los recuentos de células viables de estas estirpes, llevados a cabo en cada una de las concentraciones salinas de estudio, indicaron que las cepas *R. etli* CFN42 y *R. giardinii* bv. giardinii H152 sufrieron una caída de más de dos órdenes en el número de sus células viables en la condición máxima de estrés salino con respecto a los registrados en condiciones control, fenómeno que justificaría la menor producción de factores Nod en estas condiciones de estrés. Sin embargo, la estirpe *R. giardinii* bv. phaseoli Ro84 no sufrió tal disminución en el número de células viables en condiciones salinas con respecto a las cuantificadas en condición control, a pesar de mostrar una caída paulatina en la producción de factores Nod en condiciones de estrés salino.

Asimismo, se realizó el recuento de células viables del resto de las estirpes estudiadas en condiciones control y de estrés salino, donde, por el contrario, los niveles de células viables registrados en la condición de estrés salino fueron semejantes a los registrados en la condición control.

El incremento en la síntesis de los factores Nod, observado bajo condiciones salinas para algunas de las cepas de *Rhizobium* estudiadas, podría ser una respuesta

desarrollada por las bacterias para atenuar en lo posible los efectos adversos del estrés salino sobre el establecimiento de la simbiosis, y ser, por lo tanto, efectiva en la nodulación bajo dichas condiciones de estrés. En este sentido, Mhadhbi *et al.* (2004) describieron como *M. ciceri* resultó ser el inoculante que incrementaba en mayor grado la tolerancia a la sal de plantas de garbanzo entre otras estirpes ensayadas, dando lugar un óptimo sistema simbiótico bajo condiciones adversas, tal y como podría suceder con la interacción *R. tropici* CIAT899-*P. vulgaris*. De hecho, otras cepas altamente productoras de factores Nod, como es el caso de las estirpes *R. etli* Sc15 y *R. tropici* PRF81, han demostrado ser muy eficientes en la nodulación de *P. vulgaris* en condiciones de campo, incluso en suelos en situaciones de estrés abiótico extremas (Aguilar *et al.*, 2001; Hungría *et al.*, 2003).

Igualmente podría tratarse de un mecanismo de protección desarrollado por la bacteria frente a las quitinasas secretadas por la planta, asegurando así una adecuada cantidad y proporción de factores Nod biológicamente activos (Staehelin *et al.*, 1994b, 1997, 2000). También cabe la posibilidad de que se trate de una respuesta bacteriana forzada por el empleo de condiciones de estudio excesivamente artificiales (Spaink *et al.*, 2000).

Por otro lado, Perret *et al.* (2000) indicaron que la cantidad de factores Nod sintetizados por una cepa es un factor más en la determinación del rango de hospedador, teoría que en nuestro caso parece ser más factible puesto que no se conocen, hasta la fecha, cultivares de judía que toleren niveles de sal tan elevados como 300 mM de NaCl. Por esta razón, deberíamos desestimar las hipótesis anteriormente expuestas que justifican el incremento en la producción de los factores Nod de los rizobios estudiados como una medida encaminada a optimizar la simbiosis con su hospedador.

Ciertos autores postulan que algunos de los cambios observados en la fisiología bacteriana bajo condiciones de estrés salino se deben a un fenómeno de shock osmótico. Sin embargo, en la figura 4.7. se observó como los cambios en el perfil cromatográfico de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 crecido bajo condiciones de estrés salino no comienzan a aparecer hasta transcurridas 8 horas de incubación, tiempo que se considera excesivo para respuestas desarrolladas por un fenómeno de shock. No obstante, se llevaron a cabo estudios preliminares semejantes a los realizados por Nagata *et al.* (1998), en los que se cultivó una alícuota de 100 µl de un cultivo fresco de *R. tropici* CIAT899 control (0 mM de NaCl, D.O.<sub>600nm</sub> = 0,2) en 5 mL de medio B<sup>-</sup> 300

mM de NaCl con apigenina y  $^{14}\text{C}$  NAcGlu durante 1 hora, para posteriormente proceder al análisis de sus factores Nod por CCF. Los factores Nod sintetizados presentaron el mismo perfil que los observados en condiciones control (datos no mostrados), por lo que debemos desestimar en un principio el shock osmótico como agente causante de los cambios observados.

Asimismo, en este trabajo hemos examinado los efectos del NaCl sobre la expresión de los genes de nodulación de *R. tropici* CIAT899, estableciendo como condiciones de estudio medio mínimo B<sup>-</sup> 0, 100, 200 y 300 mM de NaCl, en ausencia y presencia de flavonoide. Para los análisis de expresión génica se utilizaron fusiones del gen *lacZ* de *E. coli* con el gen *nodP* de *R. tropici* CIAT899. Los resultados obtenidos indican un incremento de dicha expresión directamente proporcional al aumento de concentración salina del medio, tanto para los cultivos inducidos como no, corroborando los resultados obtenidos del análisis del perfil de factores Nod mediante CCF, donde se observa un incremento en la incorporación de glucosamina marcada radiactivamente en los factores Nod producidos en condiciones salinas con respecto a la control (figura 4.7.). Ese fenómeno de incremento de la expresión de los genes *nod* ya fue informado, para condiciones de estrés ácido, por autores como Angelini *et al.* (2003) y Morón *et al.* (2005). Sin embargo, es la primera vez que se describe al estrés salino como otro tipo de estrés abiótico inductor de dicha expresión.

Los experimentos de marcaje radiactivo de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 sintetizados bajo condiciones de estrés salino mostraron, además del ya comentado incremento en la producción de factores Nod, la aparición de nuevas bandas, ausentes en los perfiles cromatográficos correspondientes a las bacterias crecidas en condiciones control, que podrían corresponderse con nuevos factores Nod (figura 4.7.). Curiosamente, son éstas nuevas bandas las que aparecen en primera instancia bajo condiciones de estrés salino, en vez de las comunes a la condición control. Al mismo tiempo, a pesar de que la producción en condiciones de estrés fuese mayor en su conjunto con respecto a la observada en la condición control, ésta sufrió un retraso en el tiempo, no atribuible a una disminución del número de células viables, tal y como nos indicaba la tabla IV.1., sino posiblemente a un desfase por la puesta en marcha de los mecanismos de tolerancia de la cepa. Boumahdi *et al.* (2001) describieron un mecanismo similar de adaptación para *E. meliloti*, *B. japonicum* y *B. elkanii*, que experimentaron un retraso de la fase inicial de crecimiento “lag” al verse sometidas a un estrés por desecación.

Con el fin de confirmar las posibles diferencias entre los factores Nod sintetizados en condiciones control y de estrés salino 300 mM de NaCl, se llevó a cabo el análisis de la estructura de los mismos mediante técnicas de Espectrometría de Masas. El análisis del cultivo inducido por apigenina de *R. tropici* CIAT899 reveló la existencia de 46 factores Nod distintos, en contraste con los 29 descritos en condiciones control, con los que únicamente comparte 15. Morón *et al.* (2005) describieron 52 factores de nodulación diferentes sintetizados por esta misma cepa en condiciones de acidez (pH 4,5), de entre los cuales encontramos 17 que son comunes con los sintetizados en estrés salino y que no están presentes en la condición control. En total, *R. tropici* CIAT899 puede sintetizar 73 factores Nod de composición estructural diferente.

Es probable que ambos tipos de estrés abiótico empleen la misma regulación de la ruta metabólica de síntesis de estos nuevos factores Nod. De hecho, se han descrito numerosas vías metabólicas de los estudios fisiológicos en rizobios que son inducidas por ambos tipos de estrés, como los datos obtenidos por Ricillo *et al.* (2000), quienes indicaban como el glutatión está implicado en respuestas frente a estrés osmótico y ácido en *R. tropici* CIAT899. Otro ejemplo lo constituye *E. fredii* P220, cuyos niveles celulares de hoshoperidina parecen estar igualmente regulados por mecanismos relacionados con su tolerancia al estrés osmótico y ácido (Fujihara & Yoneyama, 1993).

Bajo estrés por NaCl, la estructura de los factores Nod incluye modificaciones en los terminales reductor y no reductor, como p. ej. nuevos ácidos grasos saturados, insaturados e hidroxilados, de 10 a 22 átomos de carbono, considerados radicales imprescindibles para la nodulación de plantas de judía (Laeremans & Vanderleyden, 1998). De entre estos ácidos grasos, C<sub>22:0</sub> es sintetizado por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones control y de estrés salino, pero no fue identificado bajo condiciones de estrés ácido (Morón *et al.*, 2005). Se observaron otras diferencias relativas a los ácidos grasos producidos en condiciones de estrés salino y estrés ácido, puesto que en esta última condición predominan los ácidos grasos de cadena corta, siendo el C<sub>16</sub> el más común, mientras que bajo estrés salino predominan los de cadena larga, frecuentando el C<sub>18</sub> y el C<sub>20</sub>. Estas nuevas pautas de síntesis podrían jugar un papel crucial en la eficacia de la interacción rizobio-leguminosa bajo condiciones de estrés abiótico, puesto que es conocida la importancia de la estructura del ácido graso en procesos como el anclaje del factor Nod a la membrana vegetal (Goedhart *et al.*, 1999), identificación por el receptor del factor Nod (NFR) (Daeze & Holsters, 2000) o formación de micelas que faciliten o dificulten su percepción por el NFR. En este sentido, los estudios llevados a cabo por

Demont-Caulet *et al.* (1999) indicaron la importancia de la cadena hidrofóbica para la difusión lateral de los factores Nod, donde tanto la longitud como el número y la posición de los dobles enlaces de los ácidos grasos son importantes para la formación del primordio nodular. Los estudios realizados por Groves *et al.*, (2005) apoyan esta misma teoría, puesto que indican la importancia de la posición de los dobles enlaces para que el factor Nod pueda adoptar su estructura tridimensional característica, estructura que condicionará posteriormente la actividad biológica del mismo a nivel del hospedador. De hecho, en *E. meliloti*, la longitud óptima de la cadena acílica es C<sub>16</sub>, ya que los factores Nod con ácidos grasos de esta longitud fueron 10 veces más activos que aquellos que contenían ácidos grasos de 12 y 18 átomos de carbono (Demont-Caulet *et al.*, 1999). Quizá la predominancia de ácidos grasos de cadena larga en los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo estrés salino potencie la actividad biológica de los mismos.

De entre todos los ácidos grasos sintetizados por la bacteria bajo las tres condiciones, C<sub>18</sub> resultó ser el más frecuente. De hecho, el factor Nod considerado mayoritario en condiciones control, ácidas y salinas resultó ser el V(C<sub>18:0</sub>, NMe, S), seguido de su homólogo V(C<sub>18:1</sub>, NMe, S).

En cuanto a los factores Nod sulfatados, característicos de la especie *R. tropici* CIAT899 (Folch-Mallol *et al.*, 1996; Manyani *et al.*, 2001), éstos constituyeron el 30% del total. Se observó un incremento del 100% de los mismos con respecto a los sintetizados en condiciones control, fenómeno que puede tener cierta relevancia biológica en tanto que, al poseer más radicales hidrofílicos, los factores Nod serán más solubles en agua y quizás se facilite su detección por la planta. De entre todos ellos se identificó un factor Nod doblemente sulfatado V(C<sub>16:1</sub>, NMe, S, S), con ambos grupos repartidos entre el extremo reductor y el no reductor, distinto en el ácido graso del descrito bajo condiciones de estrés ácido por Morón *et al.* (2005), V(C<sub>18:1</sub>, NMe, S, S).

En tercer lugar se caracterizaron factores Nod metilados, quienes en un principio fueron considerados indispensables por Waelkens *et al.* (1995) para la nodulación de *R. tropici* CIAT899 en plantas de judía. Sin embargo, Laeremans y Vanderleyden (1998) informaron más tarde que una cepa mutante en la enzima metiltransferasa (*nodS*) de *R. tropici* CIAT899, carente por lo tanto del grupo metilo, originaba nódulos Fix<sup>-</sup> en plantas de judía. En este mismo sentido, Cárdenas *et al.* (2003) informaron que los factores no metilados de la cepa nodulante de judía *R. etli* C3 sólo mostraban un



pequeño retraso en el tiempo en su actividad Hab con respecto a los metilados, pero que podían considerarse igualmente activos.

De todo el conjunto de nuevos factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino, fueron los factores Nod fucosilados y metilfucosilados en el terminal reductor los que resultaron ser más novedosos, puesto que es la primera vez que se ha descrito este tipo de factores en una bacteria de la especie *R. tropici*, muy frecuente por el contrario en géneros como *Ensifer* (Lamrabet *et al.*, 1999). Se tratan de los factores V(C<sub>18:1</sub>, MeFuc), IV(C<sub>18:1</sub>, MeFuc) y IV (C<sub>18:1</sub>, Fuc), todos ellos portadores del ácido graso C<sub>18:1</sub>, quizá por cuestiones de especificidad de sustrato. Puesto que no se observó ningún grupo sulfato en alguno de estos factores, es probable que ambos radicales, sulfato y fucosilo, compitiesen por la posición C<sub>6</sub> del esqueleto glucosamínico, de forma semejante a como se describió para la estirpe *A. caulinodans*. Esta cepa produce un factor Nod fucosilado en el carbono 6 del extremo reductor, y arabinosilado en el carbono 3 del mismo extremo (Mergaert *et al.*, 1993; 1997a). Sin embargo, la introducción de los genes *nodHPQ* en esta estirpe provocó el bloqueo de la síntesis de los factores Nod fucosilados, debido a la anticipación del grupo sulfato en ocupar el carbono 6 del extremo reductor del factor Nod (Laeremans *et al.*, 1999), reduciendo consecuentemente la eficacia de nodulación en *Phaseolus*. En nuestro estudio con *R. tropici* CIAT899 se observó el caso inverso, ya que fue el grupo fucosil el que impidió la incorporación del sulfato (Hamid Manyani, Tesis Doctoral), fenómeno que puede ciertamente incrementar el rango de hospedador a otras leguminosas, pero que conllevará inevitablemente una disminución en la tasa de nodulación de plantas como *Leucaena* por la desaparición del dicho grupo, tal y como indicaron Folch-Mallol *et al.* (1996).

Estudios preliminares llevados a cabo por nuestro grupo de investigación comprobaron que el gen implicado en la síntesis del grupo fucosil (*nodZ*) no se encuentra en el pSym de *R. tropici* CIAT899, por lo que no se descarta la posibilidad de que sean las copias cromosomales de dicho gen las encargadas de sintetizar e incorporar dicho grupo al esqueleto glucosamínico (Lamrabet *et al.*, 1999).

Este radical es esencial en la determinación del rango de hospedador para numerosas plantas de la familia *Phaseoleae* (López-Lara *et al.*, 1995), característica que nos conduce a pensar acerca de una estrategia desarrollada por la bacteria para ampliar su rango de hospedador, bajo condiciones de estrés salino, a plantas que quizá puedan tolerar niveles de sal más elevados que *Phaseolus*. Y es que, a pesar de la

caracterización de especies de judía que toleran niveles alto de NaCl como las descritas por Bayuelo-Jiménez *et al.* (2002), la mayoría de ellas no toleran valores superiores a 50 mM de NaCl (Saadallah *et al.*, 1998).

Algunas de las estructuras sintetizadas por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones control, como es el caso de los factores Nod portadores de grupos acetilo o carbamoilos V(C<sub>10:0-OH</sub>, Cb), V(C<sub>10:0-OH</sub>, NMe, Cb), V(C<sub>20:0-OH</sub>, Ac) y IV(C<sub>18:0</sub>, NMe, Ac) no fueron halladas en condiciones de estrés salino ni ácido (Morón *et al.*, 2005), lo cual nos indica que estos substituyentes son sintetizados exclusivamente bajo condiciones control. Sin embargo, también es posible que grupos lábiles como el *O*-carbamoilo y el *O*-acetilo se pierdan durante el proceso de aislamiento (Spaink, 2000). No obstante, Cárdenas *et al.* (2003) indicaron que estos dos grupos no jugaban un papel importante en la formación del nódulo de la estirpe *R. etli* C3 en plantas de *Phaseolus*, al menos en el cv. Negro Jamapa, por lo que probablemente tampoco se trate de modificaciones estructurales relevantes para la estirpe *R. tropici* CIAT899.

Los análisis de CCF y HPLC de las figuras 4.2. y 4.9. indicaron en un principio que *R. tropici* CIAT899 sintetizaba factores Nod en condiciones de estrés salino y ausencia de inductor, por lo que resolvimos realizar igualmente la determinación estructural de dichos factores Nod mediante técnicas de Espectrometría de Masas. La tabla IV.3. recogía así la estructura de los 8 únicos factores Nod sintetizados bajo estas condiciones: V(C<sub>18:0</sub>, NMe, S), V(C<sub>18:0</sub>, S), V(C<sub>18:0</sub>, Ac, NMe, S), V(C<sub>20:1-OH</sub>, NMe, S), V(C<sub>20:0</sub>, S), V(C<sub>20:0</sub>, NMe, S), V(C<sub>18:0</sub>, NMe) y V(C<sub>18:0</sub>). Si elaborásemos un estudio comparativo entre los factores Nod inducidos frente a los no inducidos, sintetizados ambos bajo condiciones de estrés salino, podríamos afirmar que estos 8 factores Nod son los mayoritarios de todo el “pool” que *R. tropici* CIAT899 sintetiza. Esta observación nos anima a pensar que esta bacteria, bajo condiciones de estrés salino y ausencia de inductor, se sirve únicamente de la maquinaria básica de síntesis de factores Nod, sin añadir al esqueleto de NAcGlc ninguna estructura compleja. Es más, el metabolismo bacteriano está muy comprometido bajo estas condiciones tan extremas de estrés salino, tal y como indican los trabajos de Craig *et al.* (1991), Lata Saxena y Rewari (1991) y Zahran (1992).

Sin embargo, esta hipótesis no resultó acertada puesto que análisis posteriores de las mismas muestras realizados con equipamientos analíticos de mayor resolución mostraron la gran variabilidad de factores Nod sintetizados en ausencia de inductor, similar a la registrada en presencia del mismo (tablas IV.7. y IV.9.). Puesto que *R.*

*tropici* CIAT899 también sintetiza factores Nod en ausencia de inductor bajo condiciones de estrés ácido (Belén Morón, Tesis Doctoral), decidimos llevar a cabo igualmente el estudio estructural de dichos factores Nod. La tabla IV.6. nos mostraba los resultados de este primer análisis donde, de forma semejante a las condiciones salinas, sólo se describieron 5 factores Nod, que resultaron ser comunes a los ya descritos en condiciones salinas no inducidas. Sin embargo, volvió a ser el segundo análisis de estos factores Nod (tablas IV.8. y IV.9.) el que caracterizó nuevas y numerosas moléculas sintetizadas bajo las condiciones de estrés ácido establecidas (pH 4,5 sin inductor), en comparación con el primer análisis realizado en dicha condición. Al igual que ocurriese con los factores Nod identificados en condiciones salinas no inducidas, los factores Nod no inducidos sintetizados a pH 4,5 resultaron ser de estructura semejante a los descritos por Morón *et al.* (2005) en condiciones ácidas inducidas.

No es de extrañar que una misma técnica analítica aporte resultados diferentes si se lleva a cabo con equipamientos distintos aunque de metodología semejante (recordemos que el primer análisis fue realizado por el grupo de investigación dirigido por el Dr. Antonio Gil-Serrano, de la Universidad de Sevilla, mientras que el segundo lo llevó a cabo el grupo dirigido por el Dr. Paul Hensberger, de la Universidad de Leiden). Por lo tanto, ambos resultados son igualmente válidos, si bien el segundo análisis nos aporta más información acerca de la estructura de los factores Nod sintetizados. No obstante, estos resultados están siendo objeto de un tercer análisis con el fin de confirmar los datos mostrados.

Finalmente, podemos concluir que estamos ante un fenómeno de desregulación del proceso de síntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés abiótico (salino y ácido), el cual desemboca en la producción de factores de nodulación de forma independiente del inductor requerido hasta ahora para el proceso de síntesis.

Puesto que las concentraciones elevadas de NaCl pueden tener dos tipos de efectos sobre las células, uno osmótico y otro iónico (Miller & Wood, 1996), empleamos osmolitos iónicos y no iónicos para poder discriminar entre ambos tipos de efectos. Así, se seleccionaron como osmolitos no iónicos el PEG6000 y el manitol, para comparar sus efectos, a niveles semejantes de presión osmótica, con los ejercidos por el NaCl. El crecimiento de *R. tropici* CIAT899 en medio adicionado de manitol fue óptimo, si bien

se vio un poco disminuido con respecto a la condición control, aunque no tanto como bajo condiciones de estrés por NaCl (figura 4.10.).

Por el contrario, las curvas de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 en medio adicionado de PEG6000 no registraron cambio alguno, manteniéndose los valores de D.O.<sub>600nm</sub> invariables. Este resultado nos indica que, bajo condiciones de estrés osmótico por PEG6000, *R. tropici* CIAT899 se mantiene viable a lo largo del tiempo, más es incapaz de multiplicarse, quizá porque la viscosidad del medio mínimo B<sup>-</sup> 60 mM PEG6000 es excesivamente elevada y dificulta físicamente el crecimiento (Marta Susana Dardanelli, Tesis Doctoral). Busse y Bottomley (1989) informaron un hecho similar en cultivos de *E. meliloti* estresados con PEG4000, los cuales tenían valores de D.O. estacionarios muy por debajo de los valores de D.O. de las células no estresadas. Este estado del metabolismo bacteriano, conocido como VBNC (del inglés “viable but not culturable”, Weichart, 1999) hace referencia a un estado metabólico en que la bacteria ralentiza sus funciones metabólicas, tanto en condiciones de laboratorio como en el medio natural, al verse sometida a condiciones límites de estrés, entre las que se incluyen shocks por temperatura, sequía y elevada salinidad (Roszak & Colwell, 1987; Oliver *et al.*, 1991; Oliver, 1993; Biosca *et al.*, 1996; Jiang & Chai, 1996; Manahan & Steck, 1997). Sirva como ejemplo el estudio realizado por Lippi *et al.* (2000), quienes determinaron, al igual que en el presente trabajo, el crecimiento y la formación de células VBNC de la cepa tropical *Rhizobium* 1240, bajo condiciones control y de estrés salino.

Así, tras desestimar el empleo del PEG6000 como osmolito, se realizaron los estudios correspondientes de actividad  $\beta$ -galactosidasa y CCF de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés osmótico por manitol y NaCl. La figura 4.11. nos mostraba como, tanto un osmolito como otro, provocaban un incremento en la expresión de los genes *nod* y su posterior transcripción a factores Nod. Sin embargo, el efecto fue bastante más acusado para la condición de estrés por NaCl, cuya relación actividad  $\beta$ -galactosidasa-intensidad de la señal radiactiva es bastante más concordante que la observada bajo condiciones de estrés por manitol, donde la actividad  $\beta$ -galactosidasa sólo se incrementó un 50% con respecto a la condición control, si bien la cuantía de los factores Nod que se sintetizaron bajo dicha condición fue bastante mayor.

Diversos autores han discutido acerca de la poca fiabilidad, en ciertas condiciones de estudio, del sistema indicador *lacZ*, puesto que la relación entre la concentración de las moléculas inductoras empleadas y la expresión del gen reportero no es siempre la esperada. Una de las posibles causas de la falta de relación lineal puede ser la unión no específica o la degradación de inductores por parte de la bacteria (Cooper & Rao, 1995), hecho mantenido por la muy baja señal de  $\beta$ -galactosidasa en altas densidades de suspensiones bacterianas. Sin embargo, una inhibición de la actividad enzimática bajo un promotor simbiótico en una suspensión celular densa también se corresponde con la acción de una proteína represora, la Nwsb, la cuál media en el proceso de QS con Nola y NodD2 en *B. japonicum* (Loh *et al.*, 2002).

El incremento de los niveles de expresión de los genes *nod* bajo condiciones de estrés salino con respecto a los registrados en condiciones control coincide curiosamente con el incremento igualmente observado en estrés ácido (correspondiéndose con un aumento de cinco veces, Morón *et al.*, 2005). Esta observación nos permite volver a retomar la hipótesis del empleo de rutas metabólicas comunes por ambos tipos de estrés abiótico.

Los resultados anteriores confirmaron la combinación de un efecto osmótico e iónico por parte del NaCl, siendo este segundo efecto mayor en intensidad que el primero. Puesto que existen trabajos que proponen la especificidad iónica de los efectos atribuidos a una determinada sal (Killham & Firestone, 1984), al igual que estudios que indican que un efecto no es específico de cierto anión o catión (O'Connor & Csonka, 2003), resolvimos emplear solutos iónicos alternativos al NaCl con el fin de concretar si el incremento en la expresión de los genes *nod* era dependiente del Na<sup>+</sup>, del Cl<sup>-</sup> o de ambos. Así, se seleccionaron las sales KCl para emular el efecto del Cl<sup>-</sup>, y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> para el del Na<sup>+</sup>, al igual que ya hiciesen Abdelmoumen *et al.* (1999). Los estudios por CCF de la figura 4.12. confirmaron que el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> era capaz de ejercer el mismo efecto sobre la producción de los factores Nod que el NaCl, mientras que KCl no, tal y como se puede deducir de sus perfiles cromatográficos. Efectivamente, se observó como el Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no sólo originaba un incremento en la cuantía y naturaleza de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 en condiciones adicionadas de inductor, sino que al mismo tiempo emulaba el efecto del NaCl en condiciones carentes de inductor, donde igualmente se observaron bandas cromatográficas correspondientes a factores Nod.

De este modo, concluimos que el efecto de la sal común sobre la producción de factores de nodulación es un efecto iónico más que osmótico, de naturaleza sodio

dependiente, al igual que el efecto descrito por Shivprasad y Page (1989) para *Azotobacter chroococcum*, cuya formación de catecoles y proceso de melanización son igualmente dependientes del ión sodio.

Como se comentó en la Introducción, la expresión de los genes de nodulación se produce a través de los reguladores transcripcionales de la familia LysR (NodD, entre otros) en presencia de los inductores contenidos en los exudados de la planta (Megías *et al.*, 1993). Sin embargo, los datos mostrados en los epígrafes 1.3. y 1.4. de los Resultados nos indicaron que, para el caso de la estirpe *R. tropici* CIAT899 crecida bajo condiciones de estrés salino, no es necesaria la actuación de compuestos que induzcan la expresión de los genes *nod*, puesto que en ausencia de los mismos se observa producción de los factores de nodulación. Por este motivo, resolvimos estudiar el papel regulador que genes como *nodDI*, crítico en la nodulación de plantas de *Phaseolus* (van Rihjn *et al.*, 1994), pueda jugar en este proceso. McIver *et al.* (1989) adoptaron esta misma hipótesis de trabajo y observaron como, al mutar el gen *nodD* de *R. leguminosarum* bv. trifolli, la bacteria registró un incremento de diez veces con respecto a la cepa parental en la expresión del gen *nodA*, de forma totalmente independiente del inductor, lo cual conllevó a la extensión de su rango de hospedador a la planta no leguminosa *Parasponia*. Los resultados obtenidos del estudio por CCF de los factores Nod sintetizados por una cepa mutada de *R. tropici* CIAT899 en el gen *nodDI* confirmaron esta misma hipótesis: la no dependencia del gen. Efectivamente, la figura 4.14. mostraba como, en la condición control adicionada de flavonoide, *R. tropici* RSP82 era incapaz de sintetizar factores Nod debido a la mutación en el gen *nodDI*, que interacciona con dicho inductor y dispara la expresión de los genes *nod*. Por otro lado, bajo condiciones de estrés salino, esta misma cepa mutante sí sintetizó factores Nod, tanto en presencia como ausencia de inductor, confirmando por lo tanto la independencia del proceso de síntesis del gen *nodDI*. Este resultado propone ciertamente la existencia de una vía alternativa de regulación de la expresión de los genes *nod* activada por el estrés salino. De este modo, en ausencia de inductor, el NaCl deberá interactuar con un mediador de naturaleza desconocida que active la expresión de los genes *nod*, obviando el papel del gen *nodDI*, principal regulador de este proceso.

Los genes reguladores responden a señales específicas que inducen o inhiben la transcripción, transducción o algún otro evento involucrado en la expresión génica, modificándose adecuadamente la síntesis de productos génicos. Numerosos reguladores generales y factores sigma ( $\sigma$ ) alternativos están involucrados en la respuesta de las

células bacterianas al estrés abiótico. En *E. coli* se ha descrito como, bajo condiciones de estrés, los factores  $\sigma$  se unen a la ARN polimerasa y permiten la transcripción de los genes, de forma que la respuesta frente al estímulo medioambiental es relativamente rápida puesto que no se precisa de una síntesis *de novo* de dichos factores  $\sigma$  (Ades, 2004; Duguay & Silhavy, 2004). En este sentido, Mitsui *et al.* (2004) describieron un factor del grupo  $\sigma^{32}$  (RpoH<sub>1</sub>) en *E. meliloti* imprescindible para la formación de nódulos efectivos en alfalfa, así como para proteger a la bacteria del estrés medioambiental. Por este motivo, no es extraño pensar que el factor molecular inductor de la expresión de los genes *nod* en presencia de sal y ausencia o presencia de inductor pertenezca a esta amplia familia de reguladores. Igualmente, se han descrito chaperonas inducibles por el estrés salino, las proteínas GroEL (Bittner *et al.*, 2007; Gould *et al.*, 2007), quienes pueden estar favoreciendo la unión de la proteína NodD con el ADN bacteriano, de forma que la expresión de los genes *nod* se ve incrementada en condiciones de estrés salino. No obstante, se puede asegurar con absoluta certeza que dicho factor está codificado por gen/es incluido/s en el fragmento del pSym que no está clonado en el cósmido pCV38, ya que la cepa *R. tropici* RSP900 pCV38 no sintetiza factores Nod en condiciones de estrés salino y ausencia de flavonoides, descartándose por lo tanto la actividad del background cromosomal o cualquier factor codificado en el inserto del pCV38 o en el segundo plásmido que *R. tropici* CIAT899 contiene (figura 4.13.).

Por último, existe una tercera hipótesis que nos permite explicar el aumento de síntesis de factores Nod bajo condiciones de estrés salino: la probable activación de sistemas de transporte y/o apertura de canales de membrana. Esta explicación se deduce a partir del fenómeno observado para el cósmido pCV61 (figura 4.13.). Como ya se indicó en el apartado 1.5. de los Resultados, este cósmido portaba los mismos genes que el pCV38 (a excepción del gen *nodDI* y la *nod* box), bajo la influencia del promotor constitutivo de la kanamicina, de manera que carece igualmente del factor molecular de naturaleza desconocida codificado en el pSym. Por este motivo, el leve incremento de producción de factores Nod en presencia de sal con respecto a la observada en condiciones control se deberá a la activación de sistemas de transporte alternativos al *nodIJ* y/o a la apertura de canales de membrana como consecuencia del estrés osmótico que permitan una mayor salida de los factores Nod. Los trabajos realizados por Poolman *et al.* (2004) y Fox *et al.* (2006) avalan esta teoría de cambios en los sistemas de transporte bacterianos por acción del estrés medioambiental.

## **5.2. Efecto del estrés salino sobre el macrosimbionte (leguminosa) y la simbiosis rizobio-leguminosa.**

En el apartado 1.5.1. de la Introducción y el 4.2. de los Resultados se indicaron los numerosos efectos negativos que la sal común ejerce sobre las plantas, concretamente sobre las leguminosas, enumerando algunos de los parámetros que ven modificado su perfil control al tener que adaptarse a las condiciones de estrés por sal (p. ej. biomasa vegetal, acumulación de nutrientes, desarrollo vegetativo, etc.). Igualmente, el proceso simbiótico que las leguminosas establecen con los rizobios sufre grandes cambios, negativos en su mayoría (p. ej. disminución de las tasas de nodulación y fijación), afectando tanto al macro como al microsimbionte.

Uno de los parámetros que se puede afectar a nivel de la leguminosa como consecuencia del estrés salino, y por consiguiente alterar la simbiosis con el rizobio, es la tasa de exudación. El trabajo publicado recientemente por Koo *et al.* (2005) indica que el desequilibrio entre las cargas positivas y negativas de una determinada rizosfera, como es el caso de un suelo salino, afecta la concentración de los ácidos orgánicos liberados por la planta. Igualmente, Jones *et al.* (2004) recopilaban distintos tipos de estrés (biótico y abiótico) que modificaban la exudación de la plantas. Valorando estos antecedentes, se planteó el estudio de cómo el estrés salino puede modificar la capacidad inductora de los exudados de judía y soja sobre los genes de nodulación de sus simbiosis (*R. tropici* CIAT899 y *R. etli* ISP42 para judía, y *E. fredii* SMH12 y HH103 para soja), así como la posterior repercusión sobre la síntesis de los factores Nod. La elección de los cultivares BBL y Osumi, de judía y soja respectivamente, se basó en el empleo que ambos cultivares tienen a nivel de producción agrícola. Paralelamente, se estimó la condición de 50 mM de NaCl como la condición de estrés salino para ambas plantas, ya que estudios preliminares llevados a cabo por nuestro grupo de investigación en los sistemas de recogida de exudados (ver Material y Métodos, figura 3.1.) indicaron que esta condición supone un estrés para la planta sin llegar a comprometer en exceso su desarrollo.

Las figuras 4.15. y 4.16. nos mostraron como, bajo condiciones de estrés salino, la capacidad inductora de los exudados de judía y soja disminuyó en líneas generales con respecto a los niveles registrados en la condición control. El-Hamdaoui *et al.* (2003) describieron una respuesta similar para los exudados salinos (75 mM de NaCl) de plantas de guisante, cuya actividad inductora, cuantificada igualmente mediante ensayos



de actividad  $\beta$ -galactosidasa, disminuyó con respecto a la de los exudados obtenidos en condición control. Asimismo, Richardson *et al.* (1988) observaron este mismo fenómeno en exudados de plantas de algodón recogidos bajo estrés ácido ( $\text{pH}<4$ ) y básico ( $\text{pH}>7$ ), cuya capacidad inductora resultó ser de nuevo inferior a la de los exudados recogidos en los valores de pH intermedios.

Este descenso en los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa, indicativa de la expresión de los genes *nod*, podría deberse a una disminución simultánea en la concentración de flavonoides presentes en el exudado como consecuencia de la presencia de sal en el medio, y que por lo tanto, no alcanzasen el nivel mínimo de actividad para poder inducir los genes *nod* hasta alcanzar niveles control (Scheidemann & Wetzell, 1997). Sin embargo, esa caída también podría ser consecuencia de una modificación de la pauta de síntesis de exudados por la planta, desapareciendo determinadas moléculas y apareciendo otras nuevas, que evidentemente no tendrán la misma capacidad inductora que las excretadas en condición control, o que posiblemente no se encuentren en la concentración adecuada. Tampoco puede descartarse un efecto global de todas las razones propuestas.

Esta disminución de la actividad inductora de los exudados de judía obtenidos bajo condiciones salinas debería ocasionar una consecuente disminución en la síntesis de factores Nod de los simbiontes estudiados. Sin embargo, esta caída sólo fue significativa para *R. etli* ISP42, cuyo perfil cromatográfico de factores Nod mostró una intensidad radiactiva disminuida con respecto a la registrada en la condición control, indicativa de un menor número de factores Nod sintetizados y excretados (figura 4.15.). Al mismo tiempo, desaparecieron algunas de las bandas propias del perfil cromatográfico observado en la condición control, lo cual nos indica que los factores Nod sintetizados no sólo disminuyen en cuantía, sino también en naturaleza, tal y como ya ocurriese en los trabajos realizados por McKay y Djordjevic (1993) con *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, cuyo perfil cromatográfico en condiciones de estrés por temperatura mostró igualmente la pérdida de algunas bandas con respecto al perfil observado en la condición control. Por el contrario, el perfil cromatográfico de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 sintetizados en condiciones de estrés salino fue semejante al control, si bien se registró una disminución en la intensidad del conjunto de sus bandas, además de la pérdida de la banda sulfatada cuando la bacteria era inducida por exudados, tanto control como salino, con respecto a los factores Nod sintetizados en medio de crecimiento control.

Ciertamente, el inductor empleado en la condición control (medio mínimo B<sup>-</sup>) resulta ser un flavonoide comercial, purificado y estandarizado, que inducirá la expresión de los genes *nod* de *R. tropici* CIAT899 hasta niveles ya establecidos. Sin embargo, el exudado contiene más de una molécula inductora o, incluso, inhibidora de la expresión de dichos genes, y puesto que trabajamos con el extracto crudo y no con fracciones purificadas del exudado, tal y como hicieran Bolaños-Vásquez y Werner (1997), la actividad inductora del mismo puede resultar ciertamente menor que la del flavonoide comercial. Efectivamente, el uso del extracto crudo del exudado nos permitirá detectar cualquier efecto que posea, ya sea sinergismo, o inhibición de la inducción. Hungria *et al.* (1992) detectaron un efecto sinérgico sobre la transcripción de *R. leguminosarum* bv. phaseoli *nodC::lacZ*, ya que mezclas de flavonoides o exudados crudos o completos de judía indujeron niveles de transcripción superiores a los obtenidos cuando se utilizaron inductores de forma individual.

No obstante, la capacidad inductora del exudado de judía empleado en este trabajo quedó suficientemente probada, puesto que los niveles de expresión de los genes *nod* de la bacteria crecida en presencia del exudado fueron significativamente mayores que la actividad basal registrada por el microorganismo al crecer en medio mínimo B<sup>-</sup> y ausencia de inductor.

Un comportamiento similar al de las estirpes nodulantes de judía se registró para las cepas nodulantes de soja (figura 4.16.). *E. fredii* HH103 mostró una disminución en la intensidad de sus bandas cromatográficas frente a los exudados de soja salinos, como consecuencia de la disminución paralela de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, si bien el perfil de las mismas no sufrió cambios significativos. La disminución en la producción de factores Nod fue aun más significativa para la estirpe SMH12, la cual sufrió un descenso en la expresión de sus genes *nod* al ser inducida con exudados de soja salinos al igual que HH103, fenómeno que conllevó en esta ocasión la anulación total de la síntesis de factores Nod. Esta observación nos conduce a retomar las mismas hipótesis que se detallaron para el caso de *R. etli* ISP42: que no existan moléculas inductoras de los genes de nodulación en el exudado de soja salino, o bien que la concentración de los inductores no sea la adecuada para la inducción génica, o que en presencia del estrés salino el perfil del exudado cambie con relación al control y aparezcan otro tipo de moléculas que puedan impedir la activación de los genes o que directamente carezcan de la actividad inductora. Incluso puede tratarse de un cambio que haya ocurrido en la

estructura o fisiología de la propia bacteria, que impida o dificulte la expresión de los genes *nod*.

En este punto debemos retomar la discusión iniciada en el epígrafe 5.1. acerca de la escasa correlación entre el sistema indicador de la expresión de los genes *nod* (*lacZ*) y la detección del producto final de dichos genes (CCF de los factores Nod). Estudios como los de Novák *et al.* (2004) demostraron que no existe una relación lineal entre  $\beta$ -galactosidasa y concentración de exudado en guisante. De forma similar, Burn *et al.* (1987) informaron para el caso de *R. leguminosarum* bv. *viciae* una ligera dependencia exponencial de los exudados radicales que podría reflejar la autorregulación negativa de *nodD* por proteína NodD libre, fenómeno que podría explicar igualmente la ausencia de correlación entre los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa registrados con los factores Nod observados en la CCF. No obstante, autores como Schlaman *et al.* (1998) indicaron que probablemente la expresión de los genes *nod* registrada bajo condiciones de laboratorio sea muy distinta de la que tiene lugar durante el proceso de nodulación en la raíz, donde cambios de naturaleza variada que estén afectando al sistema modifiquen su expresión. Sirva como ejemplo el trabajo realizado por Girard *et al.* (1996), quienes informaron acerca de la existencia de modificaciones transcripcionales del pSym de la estirpe nodulante de judía *R. etli* CFN42 por acción de diversas condiciones medioambientales.

La judía, generalmente considerada como una leguminosa poco tolerante a la sal, sufre en la mayoría de los casos una grave disminución de la tasa de nodulación de sus simbiontes bajo condiciones de estrés salino (Bouhmouch *et al.*, 2005; Tejera *et al.*, 2005), atribuida generalmente a la alta sensibilidad de los primeros estadios de la nodulación al estrés osmótico (Velagaleti *et al.*, 1990). Sin embargo, el descenso de la capacidad inductora de sus exudados como consecuencia de cambios en el perfil de las moléculas inductoras presentes en él, podría considerarse como otra explicación de este fenómeno que se observa de forma generalizada en distintos cultivares de judía. En base a estas premisas, nos propusimos ampliar el estudio del efecto del estrés salino sobre la capacidad inductora de los exudados de judía a otro cultivar de *Phaseolus*, el Negro Jamapa.

Asimismo, esta disminución en la capacidad inductora de los exudados salinos de judía podría explicar la desaparición de la banda sulfatada del perfil cromatográfico de la bacteria *R. tropici* CIAT899 (figura 4.15.) de forma similar al caso descrito para *R. etli* ISP42, donde presumibles cambios cuali y cuantitativos en los exudados del

hospedador derivan en cambios cuali y cuantitativos de los factores Nod del simbiote. Por este motivo, se analizó paralelamente la capacidad inductora de los exudados de judía en distintos momentos del proceso exudativo (6 tomas a lo largo de 10 días) con el fin de comprobar posibles cambios del poder inductor del exudado a lo largo del tiempo. van Brussel *et al.* (1990) estudiaron como la capacidad inductora de los exudados de *V. sativa*, obtenidos en presencia o no de su simbiote correspondiente *R. leguminosarum* bv. *viciae*, variaba en función del tiempo, de forma que, por la similitud manifiesta de nuestro ensayo para con este trabajo, decidimos emplear el mismo soporte de ensayo y la misma bacteria indicadora. Así, los datos recogidos en la figura 4.17. mostraban una disminución en la actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa indicadora de forma directamente proporcional a la cantidad de sal presente en el medio de crecimiento, alcanzando el máximo de inducción en el cuarto día de recogida y decayendo posteriormente hasta el décimo, de forma similar al comportamiento registrado por *R. leguminosarum* bv. *viciae* al ser inducida con exudados de *Viciae* (van Brussel *et al.*, 1990). En base a estos resultados, *R. tropici* CIAT899 fue inducida con exudados de judía recolectados al cuarto día, observándose nuevamente la banda correspondiente a los factores Nod sulfatados y mostrando un perfil cromatográfico de sus factores Nod similar al de la condición control (figura 4.18.), de manera que se puede justificar la ausencia de los factores Nod sulfatados por la débil capacidad inductora de los exudados de 7 días. Estos datos nos confirman la variación de la capacidad inductora de los exudados de judía en función del tiempo, ya sea por cambios cuali o cuantitativos del conjunto de sus moléculas inductoras.

Sorprendentemente, los niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa registrados por la cepa indicadora tras ser inducida con exudados del cv. Negro Jamapa, obtenidos en presencia de 50 mM de NaCl, supusieron un descenso de casi el 98% de la capacidad inductora con respecto a los valores obtenidos con el exudado control. En base a estos resultados, no sería comparable la actividad inductora de los exudados de este cultivar de judía con los del cultivar BBL, la cual sufrió únicamente un descenso del 30% por efecto de la sal (independientemente de la cepa indicadora empleada). Estos cambios podrían estar relacionados con una variabilidad genotípica de la tolerancia a la salinidad de ambos cultivares, característica ampliamente desarrollada en el trabajo de Saadallah *et al.* (2001a) para plantas de judía. Al mismo tiempo, los sistemas indicadores empleados fueron distintos (*R. tropici* pMP240, *R. etli* pMP240 y *R. leguminosarum* RBL5280), al igual que el sistema hidropónico utilizado (ver Material y Métodos,

figuras 3.1. y 3.2.), cambios que pueden justificar igualmente los resultados obtenidos, puesto que las condiciones de estudio no resultaron ser totalmente equiparables para ambos ensayos.

En el apartado 1.2.4. de la Introducción informábamos acerca de los factores que pueden modificar la pauta de exudación de una planta, modificando bien la cantidad o bien la naturaleza de las moléculas que lo integran. Igualmente, señalábamos a los flavonoides como las moléculas inductoras más comunes, conocidas y/o más frecuentemente presentes en los exudados de leguminosas. Zhang *et al.* (1995) informó acerca de los efectos negativos que las bajas temperaturas tenían sobre la biosíntesis y la excreción de los isoflavonoides de plantas de soja. De este mismo modo, la sal podría considerarse como otro tipo de estrés abiótico que modificase los flavonoides exudados por las leguminosas, siendo responsable de la disminución de la actividad inductora de los exudados salinos con respecto a los niveles registrados en la condición control.

Los estudios de Espectrometría de Masas realizados a los exudados control y salinos de judía y soja revelaron, efectivamente, cambios en la pauta de síntesis y excreción de los flavonoides entre ambos tipos de exudados. Las tablas IV.4. y IV.5. mostraban como el número de flavonoides identificados en exudados salinos disminuía para ambos cultivares con respecto a los exudados control, desapareciendo la luteolina en judía, y la genisteína y daidzeina en soja, donde se identificó por primera vez la morina.

Tal y como se indicó en el apartado 1.2.4. de la Introducción, los flavonoides se almacenan en la planta dentro de vacuolas en forma de heterósidos, unidos a uno o más azúcares. En la mayoría de los casos, el heterósido se hidroliza antes de ser excretado por la planta, aunque la forma conjugada también se encuentra en la rizosfera (de Rijke *et al.*, 2006). Sirvan como ejemplo la quercetina y la daidzeina en el exudado control de judía, cuya variación en el tiempo de retención, de 3,1 y 2,4 minutos respectivamente, indican que están glicosilados con una única molécula de azúcar, glucosa o ramnosa generalmente. Generalmente, ambas formas tienen actividad inductora de los genes de nodulación, aunque existen excepciones. Este es el caso de la luteolina, que es excretada como heterósido inactivo e hidrolizada posteriormente convirtiéndose en la forma activa (Phillips, 2000). En este sentido, y puesto que ambos flavonoides, quercetina y daidzeina, se identifican como agliconas en el exudado salino de judía, podríamos esperar que la actividad inductora del mismo fuese mayor con respecto a la del exudado

control. Sin embargo, el resultado obtenido fue contrario, quizá por la pérdida del flavonoide luteolina que pudiese estar ejerciendo un efecto sinérgico sobre los demás.

En los exudados de soja se observó un fenómeno similar, donde el estrés salino forzó nuevamente la desaparición de los flavonoides genisteína y daidzeína, si bien se identificó uno nuevo, la morina. Paralelamente, se modificó la glicosilación de los flavonoides presentes en los exudados control, de tal forma que el computo total de flavonoides glicosilados en condiciones salinas fue menor con respecto a los identificados en condiciones control, por lo que cabría esperar nuevamente un incremento en la actividad inductora de los mismos. Sin embargo, los resultados mostrados en la figura 4.16. indicaron lo contrario.

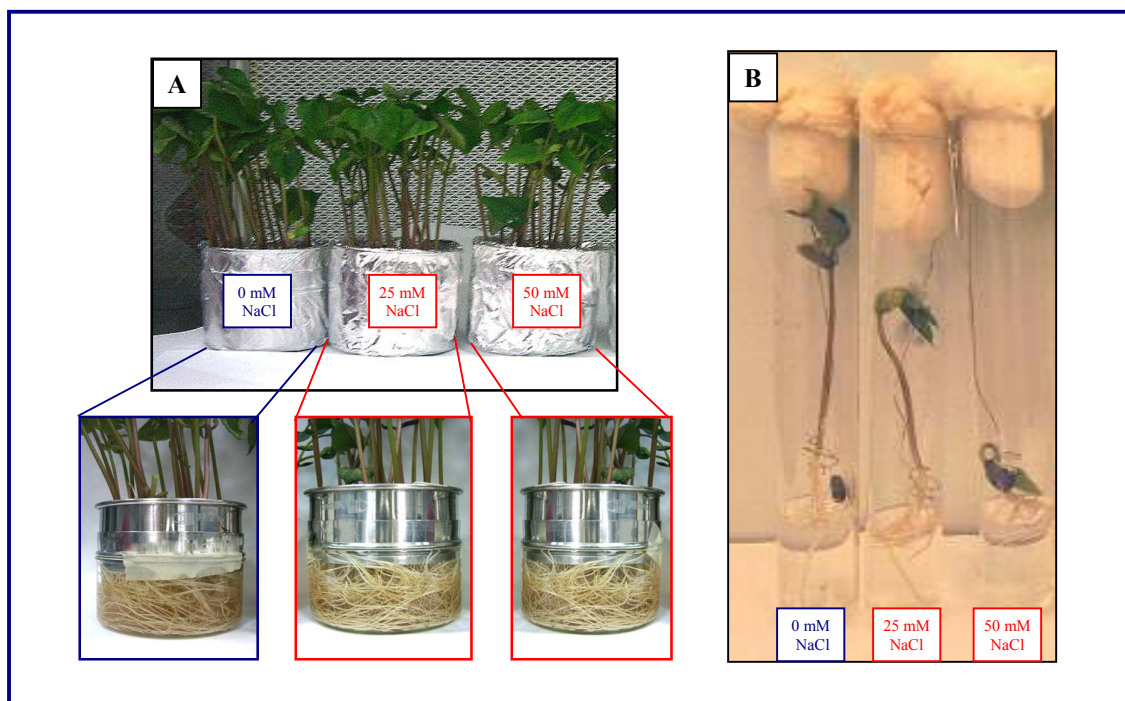
Los datos obtenidos de estos ensayos se contraponen con los trabajos realizados por Murali y Teramura (1985) y Juszczuk (2004) quienes observaron como otro tipo de estrés abiótico, la deficiencia de fósforo en este caso, incrementaba la síntesis de flavonoides en plantas de judía y soja, respectivamente, mediante la activación de la enzima L-fenilalanina amonio liasa. Walia *et al.* (2005) informaron que el estrés salino también inducía esta enzima en plantas de arroz, junto con otras enzimas igualmente implicadas en la ruta de síntesis de los flavonoides (CHS, chalcona isomerasa, flavonoide 3'-hidroxilasa y dihidroflavonol 4-reductasa).

En base a los resultados obtenidos podemos confirmar que la composición de los exudados de judía y soja se ve modificada por efecto del estrés salino. Este fenómeno puede justificar la disminución en la capacidad inductora de los genes *nod* descrita en el apartado 4.2.1. de los Resultados, puesto que, si bien estas modificaciones pueden consistir en la desaparición de un único flavonoide, puede que éste ejerciese un efecto sinérgico sobre los restantes, o bien que su actividad inductora fuese mucho mayor con respecto al resto por la propia cuantía o calidad del flavonoide. Del mismo modo, Hartwig y Phillips (1991) indicaron que tampoco podemos infravalorar cambios como los que se registran para las estructuras que se glicosilan o se disocian del azúcar, ya que modificaciones de este tipo en la estructura química de los flavonoides originan nuevas moléculas de capacidad inductora generalmente distinta a la de su precursor. El trabajo recientemente publicado por Shaw *et al.* (2006) recoge abundante información acerca de estos aspectos estructurales.

En los epígrafes anteriores de esta Discusión se han ido desarrollando los distintos aspectos del rizobio y de la leguminosa que pueden verse afectados como consecuencia del estrés salino. Asimismo, hemos indicado que la sal también afecta al proceso

simbiótico, principalmente en sus estadios iniciales. Basándonos en estas premisas, se propuso como siguiente objetivo de trabajo el estudio de los efectos del estrés salino sobre los estadios tempranos de la simbiosis rizobio-judía/soja, mediante la realización de ensayos de actividad biológica.

Se empleó el cultivar Negro Jamapa de *P. vulgaris* en detrimento del anteriormente utilizado (BBL) basándonos en las abundantes referencias bibliográficas que lo utilizan para estudios de actividad biológica (López-Lara *et al.*, 1995; Cárdenas *et al.*, 1995; Cárdenas *et al.*, 2003), además de tratarse de un cultivar de judía más pequeño que el BBL, lo cual nos facilita su manejo y lo convierte en un cultivar menos propenso a la contaminación. Asimismo, se seleccionó el sistema hidropónico empleado en el trabajo publicado por López-Lara *et al.* (1995), hecho que nos condicionó a establecer 25 mM de NaCl como la condición de estrés salino, ya que estudios preliminares realizados en este nuevo sistema nos indicaron que las plantas de Negro Jamapa no toleraban de forma adecuada la condición de estrés 50 mM de NaCl. La figura 5.1. muestra el desarrollo vegetativo de plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa crecidas a distintas concentraciones de estrés salino y en los dos sistemas hidropónicos empleados: sistema de recogida de exudados y tubo de ensayo de actividad biológica.



**Figura 5.1.** Plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, crecidas en condiciones control y de estrés salino (25 y 50 mM de NaCl), en sistemas de recogida de exudados (panel A) y tubos de ensayo de actividad biológica (panel B).

Nótese como, para un mismo cultivar, las plantas crecidas a 50 mM de NaCl en el sistema de recogida de exudados no sufren el mismo daño que aquella que es cultivada en tubo de ensayo. Seguramente, el hecho de colocar un mayor número de semillas en este sistema (panel A) amortigüe mejor los efectos negativos de la sal sobre la planta, en comparación con el sistema del tubo de ensayo, donde sólo se deposita una semilla por sistema (panel B). En este sentido, el empleo de un soporte de estudio distinto puede justificar los cambios en el nivel de tolerancia del cultivar de judía empleado, puesto que las condiciones de estudio no son equiparables para ambos ensayos. Jebara *et al.* (2001) informaron acerca de esta misma situación en los ensayos de nodulación que realizaron con *R. tropici*, *R. etli* y *E. fredii* en cinco cultivares de judía, cuyos resultados finales fue diferentes en función del sistema de ensayo empleado: macetas de arena o botellas con solución nutritiva.

La gran mayoría de los ensayos de actividad biológica adoptan como ensayo positivo aquel que, tras aplicar una muestra biológica (rizobio) o química (factor Nod) a una planta, se observe una deformación específica de los pelos de la raíz (fenotipos Hab, Hac, Had). Sirva como referencia los trabajos publicados por van Brussel *et al.* (1986), Reliç *et al.* (1993), Heidstra *et al.* (1994) y Duzan *et al.* (2004). Sin embargo, existen otras moléculas distintas de los factores Nod, p. ej. oligómeros de quitina, que pueden disparar igualmente estas respuestas en las raíces de las leguminosas. Por este motivo, se designó únicamente como ensayo positivo aquel que mostró la formación de primordios nodulares y/o pseudonódulos, sin por ello descartar la importancia de la observación de los fenotipos anteriores. De este modo, los resultados mostrados en las figuras 4.20. y 4.23. confirmaban que las cepas *E. fredii* SMH12 y *R. tropici* CIAT899, nodulantes de soja y judía respectivamente, eran biológicamente activas en sus hospedadores correspondientes. Estudios muy preliminares nos indicaron que el cruce *E. fredii*-judía resultó ser igualmente activo, a diferencia de la combinación *R. tropici* CIAT899-soja, donde no se observó la formación de primordios nodulares. Los trabajos de Sadowsky *et al.* (1988) y Velázquez *et al.* (2001) soportan esta observación de cepas nodulantes de *E. fredii* en plantas de judía. No obstante, estos resultados precisan de nuevas confirmaciones, por lo que están siendo objeto de futuros estudios por parte de nuestro equipo de investigación.

Cuando los ensayos se llevaron a cabo bajo condiciones de estrés salino 25 mM de NaCl, varios parámetros como el desarrollo vegetativo de la planta, la tasa de nodulación y el desarrollo nodular se vieron afectados, tal y como describiesen Serraj *et*



*al.* (1994), Zahran *et al.* (1999) y El-Hamdaoui *et al.* (2003). Ciertamente, no se ha publicado hasta la fecha referencia bibliográfica alguna que identifique al estrés salino como un factor medioambiental potenciador de la nodulación en leguminosas.

Paralelamente, se realizó el ensayo de actividad biológica de los factores Nod de ambas cepas, sintetizados bajo condición control y de estrés salino. Se conocen ciertas modificaciones altamente específicas de la estructura de algunos factores Nod que han permitido la purificación, cuantificación y empleo de los mismos. Este es el caso de los factores Nod de *R. leguminosarum* bv. *viciae* IV/V(C<sub>18:4</sub>, Ac), cuyos cuatro doble enlaces permitieron a Spaink *et al.* (1991) identificar y aislar dichos factores por absorción a la longitud de onda de 303 nm, y no a 206 nm, que es la empleada comúnmente para detectar los factores Nod mediante técnicas espectrométricas. También puede darse el caso de bacterias que sintetizan un número relativamente bajo de factores de nodulación, como p. ej. *Rhizobium* sp. GHR2 (López-Lara *et al.* 1995), de manera que el cromatograma de HPLC de sus factores Nod muestre picos de absorción bien definidos, que permitan un fraccionamiento limpio y una posterior identificación de los mismos por Espectrometría de Masas.

Desafortunadamente, no se han podido emplear estas metodologías para aislar y ensayar los factores Nod de *E. fredii* SMH12 y *R. tropici* CIAT899 en plantas de soja y judía, puesto que el proceso de aislamiento y purificación de los factores Nod de ambas cepas supone una tarea extremadamente compleja debido a la gran variabilidad de estructuras sintetizadas. Ciertamente, para el caso de *R. tropici* CIAT899, su separación mediante fraccionamiento por HPLC no se pudo realizar puesto que en cada fracción obtenida del cromatograma de HPLC eluyen de 2 a 20 factores Nod con carácter hidrofóbico-hidrofílico semejante. Por este motivo, se emplearon los extractos crudos de 20%, 45% y 60% AcN obtenidos tras el proceso de prepurificación con la columna de C<sub>18</sub>. Asimismo, la no identificación de los factores Nod presentes en cada extracto crudo nos impidió la cuantificación exacta de los mismos, de manera que se optó por un cálculo aproximado de éstos empleando una aproximación del valor medio del peso molecular de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899. De este modo, se utilizaron 2 concentraciones de trabajo, 10<sup>-5</sup> y 10<sup>-6</sup> M, teniendo en cuenta su supervaloración por el error de cálculo adoptado en la estimación del peso molecular, puesto que D'Haeze y Holsters (2002) indican que los factores Nod pueden ser activos desde concentraciones mucho más bajas (10<sup>-12</sup> y 10<sup>-15</sup> M).

Los factores Nod de *E. fredii* SMH12, sintetizados en condición control y de estrés salino (300 mM de NaCl), resultaron ser igual de activos entre sí, aunque mostraron menor intensidad que la propia cepa productora, debido a que únicamente se observaron pequeños primordios nodulares tras su aplicación en plantas de soja. Duzan *et al.* (2006) publicaron recientemente un ensayo semejante con factores Nod de *B. japonicum*, sintetizados en condiciones de estrés por baja temperatura, en plantas de soja, donde observaron como la actividad biológica de éstos factores Nod no disminuyó con respecto a los sintetizados en condiciones control (28 °C). Este mismo grupo de investigación publicó en el 2004 un estudio acerca de la influencia de diversos tipos de estrés abiótico sobre la percepción de los factores Nod por parte de la planta. En este estudio se mostró como, bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,0) y bajas temperaturas (15 °C), la actividad biológica de los factores Nod ensayados se incrementaba al aumentar su concentración de trabajo. Sin embargo, no ocurrió así en condiciones de estrés salino, donde a pesar de aumentar la concentración de los factores Nod empleados de  $10^{-8}$  a  $10^{-6}$  M, su actividad biológica no sufrió variación alguna. Si bien las condiciones de nuestro ensayo no son comparables a las de Duzan *et al.* (2004), nuestros resultados no coincidieron con esta última observación, puesto que sí se observó un aumento de la actividad biológica de los factores Nod empleados cuando se incrementó la concentración final de trabajo de  $10^{-6}$  a  $10^{-5}$  M.

En estos últimos años han proliferado el número de trabajos que tienen por objetivo la observación de la respuesta que la planta genera tras la aplicación de factores Nod purificados. En este sentido, Wais *et al.* (2002) estudiaron respuestas tempranas como el fenómeno de “calcio spiking” tras la aplicación de extractos crudos de factores Nod de cepas de *E. meliloti*. Esseling y Emons (2004) indicaban como la aplicación de estos mismos factores de nodulación sobre los pelos radicales de *M. truncatula* inducían la reorientación del pelo radical, hasta desarrollar la conocida estructura del “cayado de pastor”. López-Lara *et al.* (1995) llegaron incluso a observar la formación de primordios nodulares y pseudonódulos carentes de bacteria al tratar la raíz de judía con mezclas de factores Nod de *Rhizobium* sp. GRH2. Este último fenotipo fue el que se observó al aplicar los extractos crudos del 45 y 60% de AcN de los factores Nod “controles” de *R. tropici* CIAT899 (crecida en condiciones control pH 7,0 y 0 mM de NaCl y en presencia de apigenina), sobre plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Efectivamente, resultaron ser factores Nod de elevada actividad biológica, capaces de desarrollar pseudonódulos de estructura similar a los observados cuando se inocularon las plantas

con la propia cepa productora, desde el quinto día del ensayo y a la concentración más baja empleada ( $10^{-6}$  M).

Asimismo, los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en condiciones de estrés salino 300 mM de NaCl, inducido o no con apigenina, resultaron ser igual de activos que los controles: se observaron primordios nodulares desde el quinto día del ensayo y una concentración de trabajo de  $10^{-6}$  M. Por el contrario, los factores Nod “ácidos” (sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido pH 4,5, inducido o no con apigenina) resultaron ser menos activos que los sintetizados bajo condiciones control o de estrés salino. No se observaron primordios hasta el décimo día de ensayo, poco desarrollados, y únicamente al emplear la concentración de trabajo de  $10^{-5}$  M.

Gressent *et al.* (2002) informaron acerca de la existencia de sitios de unión en plantas de *P. vulgaris* de alta afinidad por ciertos factores Nod de sus simbioses. En dicho trabajo, mostraban como estos receptores de alta afinidad, similares a otros descritos en plantas de *M. truncatula*, reconocían los factores Nod sintetizados por su simbiote *R. tropici*, pero no los producidos por *E. meliloti*, simbiote de *Medicago*, indicando por lo tanto la especificidad de estos receptores para con los factores de nodulación de su simbiote correspondiente. Asimismo, afirmaban que parámetros como la longitud o el grado de insaturación del ácido graso de los factores Nod condicionaban el grado de afinidad de estos receptores para con los factores de nodulación, de tal forma que los factores Nod portadores de ácidos grasos  $C_{18}$  eran 10 veces más afines en la unión con su receptor que aquellos cuyo ácido graso era un  $C_{16}$ . Este dato podría justificar el hecho de una mayor actividad de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 “salinos” que los “ácidos”, puesto que en el apartado 4.1.3.4. de los Resultados indicábamos que el ácido graso predominante en la estructura de los factores Nod “salinos” era de 18 unidades de carbono, mientras que en los “ácidos” el  $C_{16}$  era el mayoritario.

Curiosamente, cuando se ensayaron los factores Nod “salinos” de *R. tropici* CIAT899, tanto inducidos como no, se observó un fenotipo característico de plantas de *V. sativa* estresadas por la luz, denominado “Tsr”. van Spronsen *et al.* (1995) informaron que este fenotipo se correspondía con una respuesta excesiva que la planta desarrollaba frente a los factores Nod de su simbiote, originándose una sobreproducción de etileno que provocaba el acortamiento y engrosamiento de las raíces. Tras descartar que dicho fenómeno pudiera ser una respuesta desarrollada por la

planta frente a posibles trazas de sal disueltas en el extracto de los factores Nod ensayados, concluimos que debían ser los nuevos factores Nod sintetizados bajo condiciones de estrés salino los que originasen la aparición de este fenotipo en las plantas de judía. No obstante, también debemos barajar la posibilidad de que el factor causante de esta respuesta sea cualquier otra molécula que esté presente en el extracto butanólico, y cuya síntesis y excreción sea igualmente dependiente de la concentración salina del medio.

Todos estos ensayos se llevaron a cabo en condiciones control para la planta (solución Fåhraeus pH 7,0 y 0 mM de NaCl), de manera que no fueron similares a las establecidas en el proceso de síntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 salinos y ácidos. Ciertamente, no fue posible el empleo de las mismas condiciones de crecimiento bajo estrés salino para la bacteria y la planta, puesto que el cv. Negro Jamapa no es capaz de tolerar 300 mM de NaCl. Desafortunadamente, no se conocen hasta la fecha cultivares de *P. vulgaris* alternativos que toleren más de 180 mM de NaCl (Bayuelo-Jiménez *et al.*, 2002), valor de concentración salina que tampoco resulta útil para nuestro ensayo puesto que *R. tropici* CIAT899 no presenta el mismo fenómeno de síntesis de factores Nod en valores cercanos a 180 mM de NaCl (p. ej. 200 mM de NaCl, ver figura 4.4., panel G) que a 300 mM de NaCl.

En cambio, hemos de indicar que *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa sí tolera las mismas condiciones de estrés ácido que *R. tropici* CIAT899, esto es pH 4,5. Gracias a esta característica, se pudo realizar el ensayo de actividad biológica de los factores Nod “ácidos” en plantas de judía crecidas a pH (4,5). Sorprendentemente, el número de primordios y pseudonódulos y el desarrollo de los mismos se incrementaron cuantiosamente hasta alcanzar el mismo grado de actividad registrada en los ensayos de los factores Nod “control” y “salinos”. Esta observación nos permite apreciar y analizar detenidamente la importancia de la simultaneidad de los cambios del hábitat común tanto para la leguminosa como para el rizobio, puesto que si alguno de los dos participantes de la simbiosis no se encuentra en la misma condición ambiental, la comunicación entre ambos no parece ser la adecuada, y por lo tanto no interactúan de una forma eficaz. Esta hipótesis podría sustentarse en la certeza de cambios estructurales en los factores Nod “ácidos” de *R. tropici* CIAT899 con respecto a los “controles” (Morón *et al.*, 2005), los cuales no son reconocidos adecuadamente por los NFR, disminuyendo por lo tanto la actividad de los mismos. Sin embargo, cuando la planta se encuentra en un medio ambiente distinto de las condiciones control (pH 4,5 en

este caso), puede que el nuevo valor de pH del medio de ensayo modifique la conformación estructural de los factores Nod y permitan una mejor interacción con sus receptores, siguiendo el modelo molecular que proponen Mulder *et al.* (2006) sobre la correcta interacción tridimensional de los factores Nod de *E. meliloti* con los NFR de *M. truncatula*. También existiría la posibilidad de cambios estructurales en los propios NFR o cambios en su pauta de expresión como consecuencia de dicho estrés. Esta última hipótesis está sustentada por el trabajo realizado por Kalsi y Etzler (2000), quienes caracterizaron un NFR en la leguminosa *Dolichos biflorus*, cuya expresión se incrementaba al disminuir la concentración en el medio de  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{NO}_3^-$ , pero que era independiente de la variación de los niveles de  $\text{K}^+$ , confirmando así que dicho incremento no se trataba de una respuesta generalizada frente a distintos tipos de estrés.

Estos cambios nos indicarán una buena aclimatación del sistema rizobio-leguminosa a las nuevas condiciones medioambientales, con el fin de optimizar el establecimiento de una simbiosis efectiva en condiciones adversas, al mismo tiempo que ponen de manifiesto un cierto grado de co-evolución entre ambos, ya descrito para otros procesos de interacción bacteria-planta.

Niwa *et al.* (2001) llevaron a cabo un estudio sobre la actividad biológica de los factores Nod de *M. loti* sobre la planta modelo *Lotus japonicus*, empleando tanto los extractos crudos de dichos factores Nod como las fracciones purificadas de los mismos. Posteriormente, identificaron mediante análisis de Espectrometría de Masas los factores Nod presentes en cada una, pudiendo indicar de esta manera cuales eran mitogénicos y cuales no, al igual que ya hiciesen Spaink *et al.* (1991) con los factores Nod de *R. leguminosarum* bv. *viciae* en plantas de *V. sativa*. En función de estos antecedentes, y considerando la novedad de la actividad biológica de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 sintetizados bajo condiciones de estrés salino o ácido, en ausencia de apigenina, resolvimos fraccionar mediante HPLC los extractos crudos de dichos factores de nodulación, para posteriormente probar su actividad en plantas de judía, y mediante Espectrometría de Masas, identificar qué factor/es Nod son responsables de dicha actividad.

El epígrafe 4.2.2.3. de los Resultados mostraba qué fracciones de los factores Nod “salinos” y “ácidos” no inducidos resultaron ser activas, al mismo tiempo que indicaba los factores Nod existentes en cada una de ellas (ver tablas IV.7. y IV.8., resultado 4.2.). Debido a la gran variabilidad de factores Nod presentes en cada fracción, no se pudo establecer una relación de especificidad que indicase qué estructuras resultaban ser

activas y cuales no, tal y como hiciesen p. ej. recientemente Shibata *et al.* (2005), quienes confirmaron que el radical fucosilo del terminal reductor de los factores Nod de *M. loti* no era imprescindible para la nodulación de *L. japonicus*. No obstante, sí pudimos comprobar que el factor Nod portador del ácido graso 18:1 y el radical metilo de la posición R2 estaba presente en todas las fracciones activas, corroborando así la importancia de dicho radical en el proceso de nodulación de *R. tropici* CIAT899 en *P. vulgaris* informada por Waelkens *et al.* (1995) y Laeremans y Vanderleyden (1998). De hecho, los factores Nod de la cepa *R. tropici* RSP900 pCV3804, los cuales tienen como único radical incorporado al esqueleto oligosacárido el grupo metilo codificado por el gen *nodS*, resultaron ser biológicamente activos en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa (ver figura 4.31.).

Paralelamente, se analizaron las fracciones que resultaron ser no activas en los ensayos de actividad biológica. Estudios preliminares nos adelantan la existencia de factores Nod en todas las fracciones seleccionadas, a excepción de la fracción 70 ácida, de estructuras similares a los ya caracterizados en las fracciones activas no inducidas y similares incluso a los factores Nod sintetizados en la condición control e inducidos por apigenina (ver tabla IV.9., resultado 4.2.). Sin embargo, podemos destacar una excepción notable, constituida por la ausencia del anteriormente nombrado factor Nod IV o V (C<sub>18:1</sub>, NMe) en todas las fracciones no activas. Esta observación ratifica la hipótesis de la especificidad de la actividad biológica de este factor Nod de *R. tropici* CIAT899 en plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa. Sin embargo, todas estas suposiciones necesitarían de nuevos ensayos para poder afirmarse como teoría, tal y como indicamos anteriormente.

Ante estos resultados, se podrían elaborar dos hipótesis que cimentasen la base química de los fenómenos observados. Podría suceder, en primer lugar, que los factores Nod identificados en estas fracciones no fuesen biológicamente activos como consecuencia de su propia naturaleza química, puesto que pueden carecer de algún sustituyente específico que sea imprescindible para el reconocimiento del factor Nod por parte del hospedador, como sería el caso de los radicales C<sub>18:1</sub> y NMe. O en segundo lugar, podría tratarse efectivamente de factores Nod biológicamente activos, pero que no se encuentren en la concentración o proporción adecuada en dicha fracción y sean por lo tanto incapaces de desarrollar cualquier estructura nodular en la planta, según lo indicaron Price *et al.* (1992). Igualmente existe la posibilidad de que se necesite la presencia de determinados factores que estén ausentes.

Ateniéndonos a estas conjeturas, nuevos estudios deberán ser llevados a cabo para ratificar estos resultados, así como confirmar estas hipótesis o bien razonar otras alternativas.

### **5.3. Estudio del empleo de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs) en la simbiosis rizobio-leguminosa, bajo condiciones control y de estrés salino.**

Existen numerosos trabajos que han informado acerca de interacciones de las PGPRs con los rizobios en leguminosas (Lynch, 1990; Lata Saxena & Tilak, 1994; Maier & Triplett, 1996; Okon *et al.*, 1998; Lata Saxena & Tilak, 2000; Vivas *et al.*, 2003; Lucas-García *et al.*, 2004a, 2004b). En la gran mayoría de ellos, la interacción entre ambos microorganismos resultó ser positiva, aportando datos relevantes para la selección de una adecuada combinación rizobio-PGPR. Sin embargo, trabajos como los de Plazinski y Rolfe (1985), indicaron lo contrario para la combinación *R. trifolli-Azospirillum*, cuya interacción resultó negativa al verse disminuida la tasa de fijación de nitrógeno cuando se utilizaba el coinoculante frente al inoculante simple del rizobio. Ciertamente, Tilak *et al.* (2006) indican que las PGPRs pueden afectar *in situ* de forma diferencial al crecimiento rizobiano, y como consecuencia, alterar la competitividad entre los rizobios nativos mediante la manipulación de la microflora asociada. Al mismo tiempo, la inoculación de rizobios puede modificar la supervivencia y el establecimiento de la PGPRs en el suelo, por lo que se precisa de un mayor estudio acerca de las interacciones entre estas bacterias que determinen qué efectos pueden ser sinérgicos y cuales antagónicos.

De este modo, se estableció como punto de partida el estudio de la interacción entre los rizobios y las PGPRs seleccionadas, mediante el empleo del LM de cada una de ellas, al igual que ya hiciesen diversos autores como Azcón-Aguilar y Barea (1978), Heron y Pueppke (1987), Chiarini *et al.* (1993), Noel *et al.* (1996) y Gutiérrez-Mañero *et al.* (2003). En primer lugar, se realizaron curvas de crecimiento de los rizobios en distintas combinaciones del LM de las PGPRs, diluidas o no con agua o MMO (1:1, v/v), donde pudimos observar como los LMs de las PGPRs *P. fluorescens* WCS417r y *C. balustinum* Aur9 no ejercían ningún tipo de efecto negativo sobre el crecimiento de los cuatro rizobios. La selección del medio mineral B<sup>-</sup> como MMO de *P. fluorescens*

WCS417r y de los cuatro rizobios podría considerarse una ventaja a la hora de la producción industrial de coinoculantes constituidos por estas estirpes por tratarse del mismo MMO. Sin embargo, se han de tener en cuenta observaciones como las indicadas por Zaady *et al.* (1993), quienes señalaban como el medio en el que se prepara una bacteria previo a la inoculación puede afectar al futuro inoculante, por lo que se precisa de estudios complementarios que confirmen la inocuidad del medio B<sup>-</sup> para con las cepas que en él se cultiven, en vistas a una posterior elaboración de inoculantes.

Por el contrario, el LM de *A. brasilense* Sp7 sí modificó el crecimiento de los rizobios, puesto que no se registraron variaciones en la D.O.<sub>600nm</sub> de los cultivos rizobianos en presencia de dicho LM, indicativo de una ausencia de crecimiento bacteriano. Se especuló acerca de la posible existencia de moléculas inhibidoras del crecimiento en el LM de *A. brasilense* Sp7, de forma que la condición de estudio LM:H<sub>2</sub>O (1:1, v/v) debería registrar *a priori* crecimiento bacteriano al diluirse al 50% dichas moléculas inhibidoras. Sin embargo, esta condición no registró cambio alguno, desechándose por lo tanto esta última hipótesis. Por otro lado, la condición LM:MMO del rizobio (1:1, v/v) mostró un crecimiento semejante al registrado en la condición control, fenómeno que ratifica la carencia de nutrientes necesarios para el crecimiento de los rizobios en el LM de *A. brasilense* Sp7. También es posible que estos nutrientes se encuentren en el medio, pero que la bacteria no pueda disponer de los mismos por diversos motivos. Waschkies *et al.* (1994) informaron un caso similar para la combinación *Glomus deserticola*-*Pseudomonas*, donde el crecimiento de esta última se veía gravemente afectado por la falta de fuentes de carbono en la rizosfera, las cuales habían sido previamente consumidas por la AM.

Análogamente, se estudió la relación contraria LM rizobiano:PGPR. *P. fluorescens* WCS417r no sufrió modificación alguna de su crecimiento en presencia del LM de cualquier rizobio, con respecto a la condición de crecimiento control. Una posible explicación para este fenómeno podría ser el empleo del mismo MMO para los rizobios y la PGPR (medio mínimo B<sup>-</sup>), tal y como se indicó anteriormente, afianzando aún más su potencial como buena asociación desde el punto de vista de compatibilidad de crecimiento. También se ha de tener en cuenta la ausencia, *a priori*, de moléculas inhibidoras del crecimiento de la PGPR sintetizadas por el rizobio. Por el contrario, tanto *C. balustinum* Aur9 como *A. brasilense* Sp7 sufrieron cambios en su patrón de crecimiento en presencia del LM de los cuatro rizobios, seguramente por la falta de nutrientes adecuados puesto que, al mezclar estos LM con el medio óptimo de cada



PGPR, ambas bacterias mostraron un rápido crecimiento exponencial, mayor que el desarrollado en su medio control, si bien los valores disminuyeron posteriormente una vez que se agotaron los nutrientes.

Estos resultados constituyen un estudio básico sobre las interacciones a nivel de crecimiento que se pueden establecer entre las cepas de rizobios y PGPRs seleccionadas, mostrando en un principio una adecuada compatibilidad entre las mismas. No obstante, se deberían plantear ensayos complementarios como los diseñados por Sukhovitskaya *et al.* (2002), quienes estudiaron la supervivencia de cultivos puros de *R. leguminosarum* y *R. trifolii* en combinación con PGPRs solubilizadoras de fosfato sobre suelos estériles, registrándose un aumento del 14-28% de la supervivencia del inoculante rizobiano en plantas de trébol y guisante. De este modo, al asegurar su estabilidad en el suelo durante más tiempo, la eficacia del coinoculante se vio significativamente aumentada con respecto al tratamiento simple con el rizobio. Paralelamente, también se podrían realizar análisis de la composición de dichos LM, con el fin de identificar las moléculas implicadas en esta interacción rizobio-PGPR, tal y como hicieron Peterson *et al.* (2006) al identificar un peptidoglicano en el LM de la PGPR *Bacillus cereus* como responsable del efecto sinérgico que éste ejercía sobre bacterias del grupo de *Cytophaga-Flavobacterium*.

Lucas-García *et al.* (2004b) propusieron diversos mecanismos promotores de la nodulación y del crecimiento vegetal, por parte de las PGPRs, como eran la síntesis y excreción de fitohormonas, sideróforos, fitoalexinas y flavonoides. En base a estos antecedentes, se estudió el posible efecto que los LM de las PGPRs pudiesen ejercer sobre la expresión de los genes *nod* y la posterior síntesis de los factores de nodulación. La figura 4.39. mostraba como los LM de las PGPRs empleadas provocaban una disminución de la expresión de los genes *nod* rizobianos con respecto a los niveles registrados en la condición control, a excepción de *E. fredii* HH103 en el LM de *C. balustinum* Aur9 adicionado de genisteína. Probablemente existan diversas moléculas presentes en los LM de las PGPRs que regulen la actividad de los genes *nod*, o bien pueda tratarse de un efecto de concentración del LM empleado, o de la construcción genética utilizada, o incluso de las condiciones de ensayo. Cases y de Lorenzo (2005) señalaban que la activación transcripcional de muchos genes bacterianos en su entorno natural no es una simple decisión “on/off”, puesto que cambios en determinados parámetros del medio ambiente que les rodea, como los aspectos nutricionales o incluso la propia comunidad microbiana adyacente, pueden influir en la expresión génica. No

obstante, debemos retomar las consideraciones anteriormente expuestas en los epígrafes 5.1. y 5.2. de esta Discusión acerca de la escasa relación entre el sistema indicador *lacZ* y la síntesis de factores Nod, puesto que, a pesar de la disminución en la expresión de los genes de nodulación como consecuencia de la presencia de los LMs de las PGPRs, ésta no repercutió en modo alguno sobre los perfiles cromatográficos de los factores Nod de los rizobios (figura 4.39., paneles A), los cuales se mantuvieron invariables independientemente del medio empleado (B<sup>-</sup> o LM de PGPR).

Numerosas asociaciones microorganismo-planta y microorganismo-microorganismo están condicionadas por la formación previa de un biofilm, entendiendo por tal aquella estructura de disposición laminar constituida por millones de bacterias. Diversos géneros bacterianos, como p. ej. *Pseudomonas* y *Azospirillum*, son conocidos formadores de biofilms, cuya estructura y estabilidad puede condicionar en numerosos casos la eficacia de la interacción de estas bacterias con su hospedador o con otras bacterias presentes en la rizosfera (Lugtenberg *et al.*, 2001; Burdman *et al.*, 2000). Así, puede que la interacción directa entre los rizobios y las PGPRs empleadas en este estudio faciliten nuevos datos acerca de la compatibilidad de estas combinaciones. Por este motivo, se estudió por segunda vez la influencia que las PGPRs seleccionadas pudiesen tener sobre la síntesis de los factores Nod de los rizobios, creciendo a ambos grupos de bacterias conjuntamente y realizando nuevamente el marcaje y extracción de los factores Nod rizobianos. Sin embargo, la figura 4.40. confirmó como la coinoculación de los rizobios con las PGPRs no modifica el perfil cromatográfico de los factores Nod de los primeros.

Resumiendo todos los datos mostrados en el apartado 4.3.1. de los Resultados, se podrían considerar ciertas combinaciones rizobio-PGPR como candidatos adecuados para la elaboración de coinoculantes de aplicación industrial, teniendo en cuenta las recomendaciones acerca de la combinación de determinadas cepas, sobre todo en cuanto a cuestiones referidas al crecimiento y medios de cultivo a emplear. No obstante, sería necesario confirmar el buen desarrollo y la eficacia de esta interacción en otros niveles de experimentación, como es el caso del sistema tripartito rizobio-PGPR-leguminosa a nivel de laboratorio o de ensayo de campo, donde parámetros como la metodología empleada (Lucas-García *et al.*, 2004a), dosis de inoculación (Dobbelaere *et al.*, 2001) o condiciones medioambientales del suelo a inocular (Çakmakçi *et al.*, 2006) son cruciales a la hora de determinar la eficacia de proceso.

Vessey (2003) subrayaba cómo la mayoría de los efectos beneficiosos de las PGPRs biofertilizantes proceden de la influencia de las mismas sobre la regulación del crecimiento vegetal, puesto que lo que ocurre esencialmente en estos casos es simplemente una modificación de la fisiología de la planta, como p. ej. cambios en la arquitectura de la raíz y pautas de asimilación, y no que la bacteria esté aportando un suplemento nutricional a la planta hospedadora. Este es el caso de *Azospirillum*, PGPR inductora del crecimiento radical de plantas leguminosas y no leguminosas gracias a la síntesis de varias fitohormonas que estimulan el crecimiento vegetal (Dobbelaere *et al.*, 2001). Asimismo, se sabe que *Azospirillum* ejerce otro tipo de efectos sobre las plantas que dan lugar igualmente a una promoción del crecimiento de la misma, como es el caso del incremento del número de flavonoides presentes en los exudados, fenómeno demostrado por Burdman *et al.* (1996) en plantas de judía. Andrade *et al.* (1998) especularon igualmente acerca del empleo de este mismo mecanismo por la PGPR *P. fluorescens* sobre plantas de guisante.

Estudios previos han informado sobre los cambios que los rizobios pueden ocasionar en la exudación de las leguminosas. En este sentido, los exudados de las raíces de alfalfa obtenidos después de la inoculación con *R. meliloti* contienen tres isoflavonas que no se encuentran en los exudados de las plantas no inoculadas (Dakora *et al.*, 1993b). Analizando exudados de *V. sativa* se observó el aumento en la producción de 8 flavonoides inductores de genes de nodulación cuando las plantas fueron inoculadas con *R. leguminosarum* bv *viciae*, pero no hubo producción de nuevas moléculas inductoras (Recourt *et al.*, 1991). En base a estos antecedentes, se propuso estudiar el posible efecto que la PGPR objeto de estudio, *C. balustinum* Aur9, pudiese tener sobre la actividad inductora y la composición de los exudados de judía y soja, obtenidos en condiciones control y de estrés salino 50 mM de NaCl, en comparación con los exudados obtenidos en ausencia de ella.

Las figuras 4.41. y 4.42. mostraron, como tendencia generalizada, la disminución de la expresión de los genes *nod* de las cuatro cepas de rizobios cuando éstas eran inducidas con exudados obtenidos en presencia de la PGPR *C. balustinum* Aur9, independientemente de si fueron obtenidos en condiciones control o de estrés salino. Este fenómeno es contrario al descrito por Parmar y Dadarwal (1999), quienes caracterizaron dos cepas de *Pseudomonas* promotoras del proceso de nodulación de las estirpes *Rhizobium* sp. Ca181 y Ca313 en plantas de garbanzo, mediante la estimulación del proceso de síntesis de flavonoides por parte de la planta hospedadora. No obstante,

es posible que la actividad inductora de los exudados obtenidos en presencia de la PGPR sea similar en un principio a la del exudado control, pero que con el paso del tiempo (recordemos que la recogida de los exudados se realiza al séptimo día, ver Material y Métodos, apartado 3.8.3.) la bacteria consuma las moléculas inductoras inicialmente sintetizadas, empleándolas como fuente de carbono, pudiendo biotransformar los flavonoides secretados por la planta en productos secundarios carentes de actividad inductora o incluso inhibidores de la expresión de los genes *nod*, proceso descrito para la cepa *B. japonicum* (Rao & Cooper, 1995). Estos mismos autores indicaron que el mecanismo de regulación de la expresión de los genes *nod* debe ser mucho más complejo que la actual teoría de interacción de la molécula inductora con la proteína NodD, fenómeno que quizá pueda explicar la relación dispar existente entre el sistema indicador de la expresión génica y los factores Nod sintetizados por los rizobios. Sirva como ejemplo la bacteria *E. fredii* SMH12, la cual, tras ser inducida con exudados control obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 y registrar niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa similares a los de la condición inducida con exudados control obtenidos en ausencia de la PGPR, no sintetiza y/o secreta ningún factor Nod. Sin embargo, al ser inducida con exudados salinos obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 y registrar niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa muy inferiores a los de la condición inducida con exudados salinos obtenidos en ausencia de la PGPR, vuelve a sintetizar factores de nodulación. Por el contrario, la cepa HH103 no registra cambios notables en el perfil cromatográfico de sus factores Nod para ninguna de las condiciones ensayadas, a pesar de tratarse de la misma especie bacteriana que la cepa SMH12, lo cual nos indica la existencia de un componente específico de cada bacteria en la respuesta frente al exudado, ya que bacterias de una misma especie pueden responder de forma diferente frente a un mismo grupo de inductores.

Puede que otro de los parámetros que esté afectando a la actividad inductora de estos exudados obtenidos en presencia de la PGPR *C. balustinum* Aur9 sea el propio sistema de recogida de exudado. Ciertamente, numerosos problemas técnicos en la recolección y análisis de los exudados radicales todavía hoy en día impiden el uso de técnicas confiables para la caracterización de los mismos (Crowley & Rengel, 1999). En este sentido, Kamilova *et al.* (2006) comprobaron como el sustrato empleado en los sistemas de recolección de exudados modificaba significativamente los niveles del ácido orgánico mayoritario secretado por plantas de tomate, por lo que quizás, el sistema

hidropónico que utilizamos para la recolección de exudados de judía y soja no sea el más adecuado para mantener intacta la capacidad inductora del mismo.

En función de estos cambios, y tal y como ya se hiciese para los exudados obtenidos en ausencia de *C. balustinum* Aur9, se analizó por Espectrometría de Masas la composición de los mismos, tanto en condiciones control como de estrés salino. Las tablas IV.11. y IV.12. mostraban como, efectivamente, la presencia de la PGPR modificaba la pauta de exudación de las plantas de judía y soja, ocasionando una nueva disminución en el número de flavonoides sintetizados, siendo está más acusada en condiciones de estrés salino. Así, en plantas de judía, desaparecen los flavonoides quercetina, luteonina y daizdeina cuando el exudado es recogido en presencia de la PGPR, mientras que aparecen nuevos como la lisetina y apigenina en condiciones control. Kumar *et al.* (2006) indican que el flavonoide quercetina tiene un papel estimulador del crecimiento bacteriano en la rizosfera, por lo que resulta altamente probable que la PGPR lo haya consumido por entero durante el proceso de exudación. Algunos de los flavonoides identificados coinciden con los anteriormente caracterizados por Hungria *et al.* (1991), Dakora *et al.* (1993a) y Bolaños-Vasquez y Werner (1997) en plantas de judía, con la gran excepción de los flavonoides genisteína y coumestrol. Es posible que no hayamos podido identificar la genisteína al ser ésta precursora de la daidzeina y producto de degradación de la isoliquiritigenina, de forma que, al encontrarse tanto el flavonoide precursor como el precedente, quizá el intermediario esté en concentraciones prácticamente indetectables. Por otro lado, el coumestrol es una de las principales fitoalexinas que la planta sintetiza en respuesta frente a un ataque patógeno, de forma que puede que la planta de judía no considere a la PGPR como tal y, por lo tanto, no sintetice dicho flavonoide.

Un análisis semejante se podría realizar acerca de la composición de los exudados de soja obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9 con respecto a los recogidos en ausencia de la misma. Se observa la pérdida nuevamente del flavonoide quercetina, junto con la morina y naringenina (potente inhibidor de los genes *nod* de *B. japonicum* según Klossak *et al.*, 1990). También desaparecen, al igual que ocurriese en ausencia de la PGPR, los flavonoides daidzeina y genisteína cuando la recogida de los exudados tiene lugar en condiciones de estrés salino. Asimismo, se mantiene la isoliquiritigenina (potente inductor de los genes *nod* según Kape *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta estos datos, cabría esperar la posibilidad de una mayor actividad inductora por parte de los exudados de soja obtenidos en presencia de *C. balustinum* Aur9, sin embargo, la figura

4.42. indica lo contrario. Ciertamente, la variedad y cuantía de los flavonoides exudados por las plantas de soja en presencia de la PGPR y bajo condiciones de estrés salino disminuye drásticamente con respecto a los identificados en exudados control y ausencia de *C. balustinum* Aur9, observación que se corresponde con la disminución de la actividad inductora de los mismos.

Si bien no se identificó el coumestrol entre los flavonoides sintetizados por las plantas de soja en presencia de la PGPR, si se registró otra fitoalexina sintetizada por la planta frente al ataque de un patógeno, la isoliquiritigenina (Parniske *et al.* 1991), por lo que es posible que la planta de soja esté reconociendo inicialmente a *C. balustinum* Aur9 como un patógeno. Dakora y Phillips (1996) y Aoki *et al.* (2000) proponían la acumulación de los flavonoides en aquellos tejidos de la planta que eran infectados por patógenos, de modo que, la variedad y concentración de los flavonoides exudados por la planta de soja pueden verse disminuida por la presencia de *C. balustinum* Aur9. Paralelamente, las plantas de soja pueden disparar vías de defensa frente a dicho patógeno mediadas por el ácido jasmónico, el cual ha sido caracterizado recientemente por Mabood *et al.* (2006) como un potente inductor de la síntesis de los factores Nod de *B. japonicum*, mecanismo que podría justificar en cierto modo la elevada producción de factores de nodulación de las dos cepas de *E. fredii* tras inducción con exudados de soja, a pesar de la disminución en naturaleza y cuantía de los flavonoides sintetizados.

Diversos autores han caracterizado cómo la comunidad adyacente al sistema tripartito rizobio-micorriza-leguminosa puede modificar los mecanismos de señalización entre los integrantes de dicho sistema. En este sentido, Antunes *et al.* (2006) comprobaron que estos cambios se manifestaban como alteraciones en los estadios iniciales de la simbiosis, de manera que, tras confirmar que *C. balustinum* Aur9 modifica significativamente el perfil de exudación de plantas de judía y soja (vía de comunicación de la leguminosa para con sus cepas nodulantes), resolvimos estudiar algunos aspectos de las fases iniciales de la simbiosis de los rizobios objeto de estudio con sus hospedadores correspondientes en presencia de dicha PGPR. Se utilizaron nuevamente los sistemas y la condiciones de estudio empleadas en los ensayos de actividad biológica de los apartados 4.2.2. de los Resultados, de forma que se volvió a establecer la concentración 25 mM de NaCl como condición de estrés salino.

Los ensayos realizados en plantas de judía bajo condiciones control y de estrés salino aportaron datos muy positivos acerca del efecto protector frente a la sal que la PGPR *C. balustinum* Aur9 ejerce sobre la simbiosis *R. tropici* CIAT899-*P. vulgaris* cv.

Negro Jamapa. Efectivamente, mientras que las plantas de judía inoculadas con *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino mostraron un evidente retraso en el desarrollo vegetal y en parámetros como la tasa de nodulación y el tamaño de los nódulos, aquellas que fueron coinoculadas con la combinación *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9 mostraron un desarrollo similar al observado en condiciones control. Por el contrario, las plantas de soja no mostraron este mismo fenotipo bajo condiciones de estrés salino, puesto que las plantas coinoculadas con *E. fredii* SMH12 + *C. balustinum* Aur9 mostraron el mismo retraso en el desarrollo vegetativo y en la tasa de nodulación que aquellas que fueron inoculadas exclusivamente con *E. fredii* SMH12.

Existen varios trabajos acerca del efecto positivo de la coinoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno con PGPRs de los géneros *Pseudomonas* y *Azospirillum* en plantas de judía (de Freitas *et al.*, 1993; Burdman *et al.*, 1996). Sin embargo, este efecto consistía en una mejora de la eficacia de la nodulación en condiciones control de crecimiento, sin evaluar el efecto de ningún tipo de estrés abiótico sobre este parámetro, tal y como presentamos en nuestro trabajo. Por el contrario, sí existen estudios acerca del uso de coinoculantes en plantas de soja bajo condiciones de estrés, como p. ej. bajas temperaturas, cuyos resultados fueron visiblemente beneficiosos (Zhang *et al.*, 1996, 1997). Por este motivo, se repitieron los anteriores ensayos de coinoculación en soportes de arena estéril (sistemas más semejantes a los empleados de forma natural en el campo, en detrimento del sistema hidropónico anterior) con el fin de confirmar los datos anteriormente mostrados. Al mismo tiempo, se incluyeron en el estudio las otras dos cepas nodulantes de judía y soja anteriormente empleadas, *R. etli* ISP42 y *E. fredii* HH103, para abarcar así un mayor campo de acción y conseguir datos más representativos.

Los datos obtenidos del ensayo de nodulación en plantas de judía con inóculos simples y dobles mostraron gran heterogeneidad en cuanto al comportamiento del cv. BBL frente a los distintos tratamientos. En general, la respuesta fue principalmente negativa, tal y como muestra el tratamiento con el inoculante *R. etli* ISP42, cuyos parámetros de nodulación se vieron disminuidos en la mayoría de los casos en que se empleó el coinóculo *R. etli* ISP42 + *C. balustinum* Aur9. Asimismo, tampoco mostró un efecto protector frente a la sal, puesto que, en las condiciones de ensayo de estrés salino, todos los parámetros de nodulación y desarrollo vegetal disminuyeron con respecto a los registrados a nivel control, independientemente del inóculo empleado, simple o doble.

Sin embargo, el tratamiento con *R. tropici* CIAT899 resultó ser más positivo. Efectivamente, la inoculación con la mezcla *R. tropici* CIAT899 + *C. balustinum* Aur9 promovió el crecimiento de la parte aérea de la planta bajo condiciones control, al mismo tiempo que mostró cierto efecto protector frente al estrés salino puesto que los parámetros PSPA y PSR no sufrieron una disminución de sus valores por efecto de la sal, manteniéndose dentro de los niveles registrados por el inóculo simple en condiciones control. Este fenómeno podría justificarse por la producción conocida de auxina por parte de la PGPR *C. balustinum* Aur9 (Lucas-García *et al.* 2004a), de forma que los parámetros indicativos del desarrollo vegetativo, PSPA y PSR, sufrirán un incremento en los tratamientos con el inóculo doble. Sin embargo, esta promoción del crecimiento de la raíz no conllevó un incremento en la tasa de nodulación, a pesar del aumento de la superficie a nodular, quizá por una posible competición entre el rizobio y la PGPR intensificada por las condiciones de estrés salino del ensayo, o por un simple fenómeno de autorregulación (van Brussel *et al.*, 2002). Ciertamente, los parámetros de nodulación (Nº NOD y PUNOD) sufrieron una caída de aproximadamente el 50% con el inóculo doble frente al tratamiento con el simple bajo condiciones de estrés salino. Por este motivo, sería necesario continuar con la búsqueda y selección de una nueva y óptima PGPR para la simbiosis *P. vulgaris*-rizobio que mostrase un carácter protector frente a la sal, incluidos los parámetros de nodulación, mediante protocolos de trabajo similares a los empleados por Shaharoon *et al.* (2006).

Por otro lado, el tratamiento con el inóculo doble de las plantas de soja resultó ser mucho más positivo que el del ensayo anterior con judía. Puede que, tal y como proponen Tilak *et al.* (2006), la acción conjunta de estas cepas de rizobio y PGPR resulten en un beneficioso sinergismo que de lugar a una significativa promoción del crecimiento de la planta. Ciertamente, el empleo de los inoculantes dobles *C. balustinum* Aur9 + *E. fredii* incrementaron el rendimiento de las plantas de soja crecidas en condiciones control con respecto a sus inoculantes simples, efecto ya informado por Lucas-García *et al.* (2004a) para esta misma mezcla. Al mismo tiempo, se anularon los efectos negativos del estrés salino manteniendo todos los parámetros de estudio en niveles semejantes a los registrados en la condición control, inclusive los parámetros de nodulación (Nº NOD y PUNOD) a diferencia de lo observado anteriormente para las plantas de judía. Una justificación a este fenómeno podría ser el aumento de sitios de infección por el rizobio, mecanismo relacionado al mismo tiempo con el efecto promotor del crecimiento de la auxina según proponen autores como Akao *et al.* (1991),



Fukuhara *et al.* (1994) y Gutiérrez-Mañero *et al.* (1996), quienes relacionan el efecto hormonal del incremento de la superficie radical con la estimulación del proceso de nodulación.

Estos últimos resultados obtenidos de los ensayos de nodulación se contraponen con los mostrados en el apartado 4.3.3.1. de los Resultados, donde la promoción del crecimiento y nodulación por parte del *C. balustinum* Aur9 se observó en plantas de judía y no de soja. Sin embargo, dicha promoción fue evaluada en cortos periodos de tiempo en comparación con los test de nodulación realizados, además de haberse empleado un cultivar distinto de *P. vulgaris*. Por este motivo, se realizó una cinética de nodulación de *R. tropici* CIAT899 en plantas de *P. vulgaris* cv. BBL, en ausencia y presencia de la PGPR, que confirmó finalmente el efecto protector de *C. balustinum* Aur9 frente al estrés salino en los primeros 10 días del ensayo, donde la tasa de nodulación de inóculo doble superó a la del tratamiento simple, si bien se equipararon en los últimos días del ensayo (figura 4.47.). Este fenómeno ya fue informado por distintos autores como p. ej. Dashti *et al.* (1998), quienes propusieron el efecto de aceleración en la nodulación por coinoculaciones rizobio + PGPR. Sin embargo, se contraponen con el trabajo realizado por Camacho *et al.* (2001), quienes observaron como la combinación de *R. tropici* CIAT899 con la PGPR *Bacillus* sp. CECT 450 incrementaba la nodulación de plantas de *P. vulgaris* en los últimos estadios del ensayo.

En base a estos resultados, futuros estudios deberían llevarse a cabo para conocer exactamente los mecanismos empleados por la PGPR *C. balustinum* Aur9 para promover el crecimiento en plantas de soja y judía, puesto que Lucas García *et al.* (2004a) indican que la variabilidad de las respuestas observadas dependen en gran medida de la fase del proceso que esta PGPR es capaz de modificar: infección, nodulación o fijación de nitrógeno. Al mismo tiempo, se deberían tener en consideración los protocolos de trabajo propuesto por estos mismos autores, para asegurar el efecto sinérgico entre los rizobios y las PGPRs y evitar los efectos negativos derivados de los fenómenos de competición.



CONCLUSIONES



- ☑ La tolerancia a valores extremos de sal y la biosíntesis de los factores de nodulación bajo condiciones de estrés salino, es variable entre las cepas de *Rhizobium* que nodulan *P. vulgaris*.
- ☑ El estrés salino induce la biosíntesis de los factores Nod de *R. tropici* CIAT899 independientemente del gen regulador *nodDI*, siendo el ión Na<sup>+</sup> el principal responsable del efecto observado.
- ☑ La salinidad induce cambios cualitativos que afectan a la estructura de los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899. Tras inducción con apigenina, y bajo condiciones de estrés salino, se describieron 46 nuevos factores Nod, de los cuales 31 no han sido descritos en condiciones control.
- ☑ Los exudados radicales de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi, obtenidos en condiciones de estrés salino, presentan menor capacidad inductora de los genes de nodulación de sus respectivos simbiontes que los que se obtienen en condiciones control. Asimismo, se observan modificaciones en la naturaleza y cuantía de los flavonoides presentes en dichos exudados por acción de la sal.
- ☑ Los factores Nod sintetizados por *R. tropici* CIAT899 en ausencia de inductor y bajo condiciones de estrés salino o ácido son igual de activos biológicamente, sobre plantas de *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa, que los sintetizados en dichas condiciones tras inducción por flavonoide, e igual que los factores Nod sintetizados en condición control.
- ☑ No existen cambios significativos en el crecimiento de los rizobios *R. tropici* CIAT899, *R. etli* ISP42, *E. fredii* SMH12 y HH103 bajo la influencia de las PGPRs *P. fluorescens* WCS417r, *C. balustinum* Aur9 y *A. brasilense* Sp7, así como en los factores de nodulación sintetizados por estos rizobios.
- ☑ La inoculación de plantas de *P. vulgaris* cv. BBL y *G. max* cv. Osumi con la PGPR *C. balustinum* Aur9 conlleva modificaciones en la naturaleza y cuantía de los flavonoides excretados por la planta y cambios en la capacidad inductora de los

exudados radicales sobre la expresión de los genes *nod* de sus simbiontes respectivos.

- ☑ El empleo de los inoculantes dobles *C. balustinum* Aur9 + *E. fredii* SMH12 o HH103 revierten los efectos negativos del estrés salino observados en plantas de *G. max* cv. Osumi. Igualmente, estos inoculantes dobles promueven el desarrollo de las plantas crecidas en condición control, respecto a las inoculantes simples.

- 
- 📖 Salt tolerance and Nod factor production under salt stress conditions is variable among common bean rhizobia.
  - 📖 Salt stress induces *R. tropici* CIAT899 Nod factor production, regardless *nodDI* gene regulation activity. This response turns out to be Na<sup>+</sup> dependent.
  - 📖 Salinity changes *R. tropici* CIAT899 Nod factors structure. A total amount of 46 Nod factors were produced under salt stress conditions after apigenine induction, 31 of them have never been described under control conditions.
  - 📖 Root exudates of *P. vulgaris* cv. BBL and *G. max* cv. Osumi produced under salt stress conditions, evidence a weaker induction capacity of *nod* genes than those produced under control conditions. Besides, salinity changes the quality and the quantity of the flavonoids contained in saline exudates.
  - 📖 *R. tropici* CIAT899 Nod factors produced under salt or acid stress conditions without inductor added are as active as those produced both under the same conditions after flavonoid induction and under control conditions, on *P. vulgaris* cv. Negro Jamapa plants.
  - 📖 There are no significant changes of the growth patterns and the Nod factors produced by the rhizobia *R. tropici* CIAT899, *R. etli* ISP42, *E. fredii* SMH12 and *E. fredii* HH103 under the influence of the PGPRs strains *P. fluorescens* WCS417r, *C. balustinum* Aur9 and *A. brasilense* Sp7.
  - 📖 Inoculation with the PGPR *C. balustinum* Aur9 in *P. vulgaris* cv. BBL and *G. max* cv. Osumi plants changes both the quality and the quantity of the flavonoids contained in both exudates, and changes the induction capacity of *nod* genes as well.
  - 📖 Coinoculation with *C. balustinum* Aur9 + *E. fredii* SMH12 or HH103 have a protective effect over salt stress in *G. max* cv. Osumi. Likewise, coinoculation increases soybean production versus sole rhizobio inoculation under control conditions.





## BIBLIOGRAFÍA



- 📖 **Abbott, L.K. & Murphy, D.V.** (eds.). 2004. A key to sustainable land use in agriculture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 📖 **Abd-Alla, M.H., Vuong, T.D. & Harper, J.E.** 1998. Genotypic differences in dinitrogen fixation response to NaCl stress in intact and grafted soybean. *Crop Sci.* **38**: 72-77.
- 📖 **Abdelmoumen, H., Filali-Maltouf, A., Neyra, M., Belabed, A. & El Idrissi, M.** 1999. Effect of high salts concentrations on the growth of rhizobia and responses to added osmotica. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 889-898.
- 📖 **Ades, S.E.** 2004. Control of the alternative sigma factor sigmaE in *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 157-162.
- 📖 **Aguilar, O.M., López, M.V. & Ricillo, P.M.** 2001. The diversity of rhizobia nodulating beans in Northwest Argentina as a source of more efficient inoculant strains. *J. Biotechnol.* **91**: 181-188.
- 📖 **Akao, S., Nakata, S. & Yoneyama, T.** 1991. Formation of nodules on non-nodulating soybean T201 after treatment with 2,4-dichlorophenoxyacetate. *Plant Soil* **138**: 207-212.
- 📖 **Amzallag, G.N. & Lerner, H.R.** 1994. Physiological adaptation of plants to environmental stress. En: *Handbook for Crop Physiology*. Pessaraki, M. (ed.), pp.: 557-576. Dekker, New York.
- 📖 **Andrade, G., De Leij, F.A.A.M. & Lynch, J.M.** 1998. Plant mediated interactions between *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizobium leguminosarum*, and arbuscular mycorrhiza on pea. *Lett. Appl. Microbiol.* **26**: 311-316.
- 📖 **Ané, J.M., Kiss, G.B., Riely, B.K., Penmetza, R.V., Oldroyd, G.E., Ajax, C., Levy, J., Debelle, F., Baek, J.M. & Kalo, P.** 2004. *Medicago truncatula* DMI1 required for bacterial and fungal symbioses in legumes. *Science* **303**: 1364-1367.
- 📖 **Angelini, J., Castro, S. & Fabra, A.** 2003. Alterations in root colonization and *nodC* gene induction in the peanut-rhizobia interaction under acidic conditions. *Plant Physiol. Biochem.* **41**: 289-294.
- 📖 **Antoun, H., Chantal, J., Beauchamp, J., Goussard, N., Chabot, R. & Roger, L.** 1998. Potential of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* species as plant growth promoting rhizobacteria on non-legumes: effect on radishes (*Raphanus sativus* L.). *Plant Soil* **204**: 57-67.
- 📖 **Antunes, P.M., de Varennes, A., Rajcan, I. & Goss, M.J.** 2006. Accumulation of specific flavonoids in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) as a function of the early

- tripartite symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi and *Bradyrhizobium japonicum* (Kirchner) Jordan. *Soil Biol. Biochem.* **38**: 1234-1242.
- 📖 **Aoki, T., Akashi, T. & Ayabe, S-I.** 2000. Flavonoids of leguminous plants: structure, biological activity, and biosynthesis. *J. Plant Res.* **113**: 475-488.
- 📖 **Ardourel, M., Demont, N., Debellé, F., Maillet, F., de Billy, F., Promé, J.C., Dénarié, J. & Truchet, G.** 1994. *Rhizobium meliloti* lipooligosaccharide nodulation factors: different structural requirements for bacterial entry into target root hair cells and induction of plant symbiotic developmental responses. *Plant Cell* **6**: 1357-1374.
- 📖 **Atkinson, D. & Watson, C.A.** 2000. The beneficial rhizosphere: a dynamic entity. *Appl. Soil Ecol.* **15**: 99-104.
- 📖 **Azcón-Aguilar, C. & Barea, J.M.** 1978. Effect of interactions between different culture fractions of phosphobacteria and *Rhizobium* on mycorrhizal infection, growth and nodulation of *Medicago sativa*. *Can. J. Microbiol.* **24**: 520-524.
- 📖 **Bai, Y., Zhou, X. & Smith, D.L.** 2003. Enhanced soybean plant growth resulting from coinoculation of *Bacillus* strains with *Bradyrhizobium japonicum*. *Crop Sci.* **43**: 1774-1781.
- 📖 **Bais, H.P., Park, S-W., Weir, T.L., Callaway, R.M. & Vivanco, J.M.** 2004. How plants communicate using the underground information superhighway. *Trends Plant Sci.* **9**: 26-32.
- 📖 **Barea, J.M., Pozo, M.J., Azcón, R. & Azcón-Aguilar, C.** 2005. Microbial cooperation in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **56**: 1761-1778.
- 📖 **Barnett, M.J., Swanson, J.A. & Long, S.R.** 1998. Multiple genetic controls on *Rhizobium meliloti* *syxA*, a regulator of exopolysaccharide abundance. *Genetics* **148**: 19-32.
- 📖 **Bartels, D. & Sunkar, R.** 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **24**: 23-58.
- 📖 **Bashan, Y. & Holguin, G.** 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances (1990-1996). *Can. J. Microbiol.* **43**: 103-121.
- 📖 **Bashan, Y., Puente, M.E., Rodríguez-Mendoza, M.N., Toledo, G., Holguin, G., Ferrera Cerrato, R. & Pedrin, S.** 1995. Survival of *Azospirillum brasilense* in the bulk soil and rhizosphere of 23 soil types. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1938-1945.
- 📖 **Bassam, B.J., Djordjevic, M.A., Redmond, J.W., Batley, M. & Rolfe, B.G.** 1988. Identification of a *nodD*-dependent locus in *Rhizobium* strain NGR234 activated by

- phenolic factors secreted by soybeans and other legumes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **1**: 161-168.
- 📖 **Bayuelo-Jiménez, J.S., Debouck, D.G. & Lynch, J.P.** 2002. Salinity tolerance in *Phaseolus* species during early vegetative growth. *Crop Sci.* **42**: 2184-2192.
- 📖 **Becana, M. & Sprent, J.L.** 1987. Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes. *Physiol. Plant.* **70**: 757-765.
- 📖 **Bec-Ferté, M.P., Krishnan, H.B., Savagnac, A., Pueppke, S.G. & Promé, J.C.** 1996. *Rhizobium fredii* synthesizes an array of lipooligosaccharides, including a novel compound with glucose inserted into backbone of the molecule. *FEBS Lett.* **393**: 273-279.
- 📖 **Bekki, A., Trinchant, J.C. & Rigaud, J.** 1987. Nitrogen fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) by *Medicago* nodules and bacteroids under sodium chloride stress. *Physiol. Plant.* **71**: 61-67.
- 📖 **Beringer, J.E.** 1974. R-factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* **84**: 188-198.
- 📖 **Bertin, C., Yang, X.H. & Weston, L.A.** 2003. The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant Soil* **256**: 67-83.
- 📖 **Biosca, E.G., Amaro, C., Marco-Noales, E. & Oliver, J.D.** 1996. Effect of low temperature on starvation-survival of the pathogen *Vibrio vulnificus* biotype 2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 450-455.
- 📖 **Bittner, A.N., Foltz, A. & Oke, V.** 2007. Only one of five *groEL* genes is required for viability and successful symbiosis in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **189**: 1884-1889.
- 📖 **Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J.J.** 2001. Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 343-350.
- 📖 **Bolaños-Vásquez, M.C. & Werner, D.** 1997. Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. phaseoli on *nod* gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 339-346.
- 📖 **Bordeleau, L.M. & Prevost, D.** 1994. Nodulation and nitrogen fixation in extreme environments. *Plant Soil* **161**: 115-124.
- 📖 **Botsford, J.L.** 1984. Osmoregulation in *Rhizobium meliloti*: inhibition of growth by salts. *Arch. Microbiol.* **137**: 124-127.

- 📖 **Bouhmouch, I., Souad-Mouhsine, B., Brhada, F. & Aurag, J.** 2005. Influence of host cultivars and *Rhizobium* species on the growth and symbiotic performance of *Phaseolus vulgaris* under salt stress. *J. Plant Physiol.* **162**: 1103-1113.
- 📖 **Boumahdi, M., Mary, P. & Hornez, J-P.** 2001. Changes in fatty acid composition and degree of unsaturation of (brady)rhizobia as a response to phases of growth, reduced water activities and mild desiccation. *Antonie van Leeuwenhoek* **79**: 73-79.
- 📖 **Bowen, G.D. & Rovira, A.D.** 1999. The rhizosphere, the hidden half of the hidden half. En: *Plant Roots-the Hidden Half*. Waisel, Y., Eshel, A. & Kafkafi, U. (eds.), pp.: 641-649. Marcel-Dekker, New York.
- 📖 **Brencic, A. & Winans, S.C.** 2005. Detection of and response to signals involved in host-microbe interactions by plant-associated bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**: 155-194.
- 📖 **Brewin, N.** 2002. Root nodules (*Rhizobium*, Legumes). En: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, London.
- 📖 **Bringhurst, R.M., Cardon, Z.G. & Gage, D.J.** 2001. Galactosides in the rhizosphere: utilization by *Sinorhizobium meliloti* and development of a biosensor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 4540-4545.
- 📖 **Broughton, W.J., Hernández, G., Blair, M., Beebe, S., Gepts, P. & Vanderleyden, J.** 2003. Beans (*Phaseolus* spp.)-model food legumes. *Plant Soil* **252**: 55-128.
- 📖 **Broughton, W.J., Jabbouri, S. & Perret, X.** 2000. Keys to symbiotic harmony. *J. Bacteriol.* **182**: 5641-5652.
- 📖 **Brown, A.D. & Simpson, J.R.** 1972. Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* **72**: 589-591.
- 📖 **Buendía-Clavería, A.M., Chamber, M. & Ruíz-Saínez, J.E.** 1989. A comparative study of the physiological characteristics, plasmid content and symbiotic properties of different *Rhizobium fredii* in European soils. *Syst. Appl. Bacteriol.* **17**: 155-160.
- 📖 **Burdman, S., Okon, Y. & Jurkevitch, E.** 2000. Surface characteristics of *Azospirillum brasilense* in relation to cell aggregation and attachment to plant root. *Crit. Rev. Microbiol.* **26**: 91-110.
- 📖 **Burdman, S., Vedder, M., German, R., Itzigsohn, J., Kigel, E., Jurkevitch, Y. & Okon, Y.** 1998. Legume crop yield promotion by inoculation with *Azospirillum*. En: *Biological Nitrogen Fixation for the 21<sup>st</sup> Century*. Emerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W.E. (eds.), pp.: 609-612. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- 📖 **Burdman, S., Volpin, H., Kigel, J., Kapulnik, Y. & Okon Y.** 1996. Promotion of *nod* gene inducers and nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris*) roots inoculated with *Azospirillum brasilense* Cd. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3030-3033.
- 📖 **Burn, J., Rossen, L. & Johnston, A.W.B.** 1987. Four classes of mutations in the *nodD* gene of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* that affect its ability to autoregulate and/or activate other *nod* genes in the presence of flavonoid inducers. *Genes Dev.* **1**: 456-464.
- 📖 **Burris, R.** 2001. Nitrogen Fixation. En: *Encyclopedia of Life Sciences*. Macmillan Publishers Ltd, Nature Publishing Group, London.
- 📖 **Busse, M.D. & Bottomley, P.J.** 1989. Growth and nodulation responses of *Rhizobium meliloti* to water stress induced by permeating and nonpermeating solutes. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2431-2436.
- 📖 **Buysens, S., Heungens, K., Poppe, J. & Hofte, H.** 1996. Involvement of pyochelin and pyoverdinin in suppression of pythium-induced damping-off of tomato by *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 865-871.
- 📖 **Çakmakçı, R., Dönmez, F., Aydın, A. & Sahin, F.** 2006. Growth promotion of plants by plant growth-promoting rhizobacteria under greenhouse and two different field soil conditions. *Soil. Biol. Biochem.* **38**: 1482-1487.
- 📖 **Camacho, M., Santamaría, C., Temprano, F., Rodríguez-Navarro, D.N. & Daza, A.** 2001. Co-inoculation with *Bacillus sp.* CECT 450 improves nodulation in *Phaseolus vulgaris* L.. *Can. J. Microbiol.* **47**: 1058-1062.
- 📖 **Cárdenas, L., Domínguez, J., Quinto, C., López-Lara, I.M., Lugtenberg, B.J.J., Spaink, H.P., Rademaker, G.J., Haverkamp, J. & Thomas-Oates, J.E.** 1995. Isolation, chemical structures and biological activity of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from *Rhizobium etli*. *Plant Mol. Biol.* **29**: 453-464.
- 📖 **Cárdenas, L., Thomas-Oates, J., Nava, N., López-Lara, I.M., Hepler P.K. & Quinto, C.** 2003. The role of Nod factor substituents in actin cytoskeleton rearrangements in *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 326-334.
- 📖 **Cárdenas, L., Vidali, L., Domínguez, J., Pérez, H., Sánchez, F., Hepler, P.K. & Quinto, C.** 1998. Rearrangement of actin microfilaments in plant root hairs responding to *Rhizobium etli* nodulation signals. *Plant Physiol.* **116**: 871-877.
- 📖 **Carroll, D.G.** 2006. Nonhormonal therapies for hot flashes in menopause. *American Family Physician.* **73**: 457-464.
- 📖 **Carter, J.M., Gardner, W.K. & Gibson, A.H.** 1994. Improved growth and yield of faba beans (*Vicia faba* cv. Fiord) by inoculation with strains of *Rhizobium*

- leguminosarum* biovar *viciae* in acid soils in South-West Victoria. *Aust. J. Agric. Res.* **45**: 613-623.
- 📖 **Cases, I. & de Lorenzo, V.** 2005. Promoters in the environment: transcriptional regulation in its natural context. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**: 105-118.
- 📖 **Castignetti, D. & Smarrelli, J.Jr.** 1986. Siderophores, the iron nutrition of plants, and nitrate reductase. *FEBS Lett.* **209**: 147-151.
- 📖 **Catoira, R., Galera, C., de Billy, F., Penmetsa, R.V., Journet, E.P., Maillet, F., Rosenberg, C., Cook, D., Gough, C. & Denarié, J.** 2000. Four genes of *Medicago truncatula* controlling components of a Nod factor transduction pathway. *Plant Cell* **12**: 1647-1666.
- 📖 **Cattelan, A.J., Hartel, P.G. & Furhman, J.J.** 1999. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria to promote early soybean growth. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 1670-1680.
- 📖 **Chabot, R., Antoun, H. & Cescas, M.P.** 1996. Growth promotion of maize and lettuce by phosphate-solubilizing *Rhizobium leguminosarum* biovar *phaseoli*. *Plant Soil* **184**: 311-321.
- 📖 **Chen, C., Bélanger, R.R., Benhamou, N. & Paulitz, T.** 2000. Defence enzymes induced in cucumber roots by treatment with plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and *Pythium aphanidermatum*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **56**: 13-23.
- 📖 **Chen, X., Feng, J., Hou, B., Li, F., Li, Q. & Hong, G.** 2005. Modulating DNA bending affects NodD-mediated transcriptional control in *Rhizobium leguminosarum*. *Nucleic Acids Res.* **5**: 2540-2548.
- 📖 **Chiarini, L., Tabacchioni, S. & Bevivino, A.** 1993. Interactions between rhizosphere microorganism under iron limitation. *Arch. Microbiol.* **160**: 68-73.
- 📖 **Christensen, H. & Jakobsen, I.** 1993. Reduction of bacterial growth by a vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus in the rhizosphere of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Biol. Fertil. Soils* **15**: 253-258.
- 📖 **Cleyet-Marel, J.C.** 1987. Dynamique des populations de *Rhizobium* et de *Bradyrhizobium* dans le sol et la rhizosphere. These d'Etat. University Claude Bernard-Lyon. Lyon (France).
- 📖 **Compaan, B., Yang, W.C., Bisseling, T. & Franssen, H.** 2001. ENOD40 expression in the pericycle precedes cortical cell division in *Rhizobium*-legume interaction and the highly conserved internal region of the gene does not encode a peptide. *Plant Soil.* **230**: 1-8.



- 📖 **Cooper, J.E. & Rao, J.R.** 1995. Flavonoid metabolism by rhizobia-mechanisms and products. *Symbiosis* **19**: 91-98.
- 📖 **Cooper, J.E.** 2004. Multiple responses of rhizobia to flavonoids during legume root infection. *Adv. Bot. Res.* **41**: 1-62.
- 📖 **Cordovilla, M.P., Ligeró, F. & Lluch, C.** 1995. Influence of host genotypes on growth, symbiotic performance and nitrogen assimilation in Faba bean (*Vicia faba* L.) under salt stress. *Plant Soil* **172**: 289-297.
- 📖 **Coronado, C., Silveira-Zuanazzi, J.A., Sallaud, C., Quirion, J.C., Esnault, R., Husson, H.P., Kondorosi, A. & Ratet, P.** 1995. Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiol.* **108**: 533-542.
- 📖 **Costerton, J.W., Lewandowski, Z., Caldwell, D.E., Korber, D.R. & Lappin-Scott, H.M.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
- 📖 **Costilow, R.N.** 1981. Biophysical factors in growth. En: *Manual of Methods for General Bacteriology*. Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Costilow, R.N., Nester, E.W., Wood, W.A., Krieg, N.R. & Phillips, G.B. (eds.), pp.: 66-78. American Society for Microbiology, Washington DC.
- 📖 **Craig, G.F., Atkins, C.A. & Bell, D.T.** 1991. Effect of salinity on growth of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*. *Plant Soil* **133**: 253-262.
- 📖 **Cronin, D., Moënne-Loccoz, Y., Fenton, A., Dunne, C., Dowling, D.N. & O'Gara, F.** 1997. Ecological interaction of a biocontrol *Pseudomonas fluorescens* strain producing 2,4-diacetylphloroglucinol with the soft rot potato pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **23**: 95-106.
- 📖 **Crowley, D. & Rengel, Z.** 1999. Biology and chemistry of rhizosphere influencing nutrient availability. En: *Mineral Nutrition of Crops: Fundamental Mechanisms and Implications*. Rengel, Z. (ed.), pp.: 1-40. The Haworth Press, New York.
- 📖 **Culham, D.E., Henderson, J., Crane, R.A. & Wood, J.M.** 2003. Osmosensor ProP of *Escherichia coli* responds to the concentration, chemistry, and molecular size of osmolytes in the proteoliposome lumen. *Biochemistry* **42**: 410-420.
- 📖 **D'Haese, W., Gao, M.S., De Rycke, R., van Montagu, M., Engler, G. & Holsters, M.** 1998. Roles for azorhizobial Nod factors and surfacepolysaccharides in intercellular invasion and nodule penetration, respectively. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 999-1008.
- 📖 **D'Haese, W. & Holsters, M.** 2002. Nod factors structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* **12**: 79-105.

- 📖 **Dakora, F.D.** 2003. Defining new roles for plant and rhizobial molecules in sole and mixed plant cultures involving symbiotic legumes. *New Phytol.* **158**: 39-49.
- 📖 **Dakora, F.D., Joseph, C.M. & Phillips, D.A.** 1993a. Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 665-668.
- 📖 **Dakora, F.D., Joseph, C.M. & Phillips, D.A.** 1993b. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **101**: 819-824.
- 📖 **Dakora, F.D. & Phillips, D.A.** 1996. Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **49**: 1-20.
- 📖 **Dakora, F.D. & Phillips, D.A.** 2002. Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient. *Plant Soil* **245**: 35-47.
- 📖 **Daniel, J., Sullivan, O. & O’Gara, F.** 1992. Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiol. Rev.* **56**: 662-676.
- 📖 **Daniels, R., De Vos, D.E., Desair, J., Raedschelders, G., Luyten, E., Rosemeyer, V., Verreth, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J. & Michiels, J.** 2002. The *cin* quorum-sensing locus of *Rhizobium etli* CNPAF512 affects growth and symbiotic nitrogen fixation. *J. Biol. Chem.* **277**: 426-430.
- 📖 **Danso, S.K.A., Zapata, F. & Awonaike, K.O.** 1990. Effect of postemergence, supplemental inoculation on nodulation and symbiotic performance of soybean (*Glycine max* L. Merrill) at three levels of soil nitrogen. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1793-1798.
- 📖 **Dardanelli, M.S.** 2001. Efectos de la hiperosmolaridad sobre *Rhizobium* sp. y parámetros comprometidos en la interacción *Arachis hypogaea*-*Rhizobium* sp.. Tesis Doctoral. Universidad de Río Cuarto. Río Cuarto (Argentina).
- 📖 **Dashti, N., Prithviraj, B., Hynes, R.K. & Smith, D.L.** 2000. Root and rhizosphere colonization of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) by plant-growth-promoting rhizobacteria at low root zone temperatures and under short-season conditions. *J. Agron. Crop. Sci.* **185**: 15-22.
- 📖 **Dashti, N., Zhang, F., Hynes, R. & Smith, D.L.** 1998. Plant growth promoting rhizobacteria accelerate nodulation and increase nitrogen fixation activity by field grown soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] under short season conditions. *Plant Soil* **200**: 205-213.

- 📖 **Day, B.R., Loh, J.T., Cohn, J. & Stacey, G.** 2000. Signal exchange involved in the establishment of the *Bradyrhizobium* legume symbiosis. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation. A Model System for the Analysis of a Biological Process*. Triplett, E.W. (ed.), pp.: 385-415. Horizon Scientific Press, Norfolk.
- 📖 **de Bruijn, F.J.** 1992. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2180-2187.
- 📖 **de Freitas, J.R., Gunta, V.V.S.R. & Germida, J.J.** 1993. Influence of *Pseudomonas syringae* R25 and *Pseudomonas putida* RIO5 on the growth and nitrogen fixation (acetylene reduction activity) of pea (*Pisum sativum* L.) and field bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Biol. Fertil. Soils* **16**: 215-220.
- 📖 **de Maagd, R., van Rossum, C. & Lugtenberg, B.J.J.** 1988. Recognition of individual strains of fast-growing rhizobia by using profiles of membrane proteins and lipopolysaccharides. *J. Bacteriol.* **170**: 3782-3788.
- 📖 **de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C. & Brinkman, U.A.Th.** 2006. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A* **1112**: 31-63.
- 📖 **de Ruijter, N.C.A., Rook, M.B., Bisseling, T. & Emons, A.M.C.** 1998. Lipochito-oligosaccharides reinitiate root hair tip growth in *Vicia sativa* with high calcium and spectrin-like antigen at the tip. *Plant J.* **13**: 341-350.
- 📖 **Debellé, F., Planazet, C., Roche, P., Pujol, C., Savagnac, A., Rosenberg, C., Promé, J.C. & Dénarié, J.** 1996. The NodA proteins of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium tropici* specify the *N*-acylation of Nod factors by different fatty acids. *Mol. Microbiol.* **22**: 303-314.
- 📖 **Delgado, M.J., Ligeró, F. & Lluch, C.** 1994. Effects of salt stress on growth and nitrogen fixation by pea, faba-bean, common bean and soybean plants. *Soil Biol. Biochem.* **26**: 371-376.
- 📖 **Demont, N., Ardourel, M., Maillet, F., Promé, D. & Ferro, M.** 1994. The *Rhizobium meliloti* regulatory *nodD3* and *syrM* genes control the synthesis of a particular class of nodulation factors *N*-acylated by (omega-1)-hydroxylated fatty acids. *EMBO J.* **13**: 2139-2149.
- 📖 **Demont-Caulet, N., Maillet, F., Tailler, D., Jacquinet, J.C., Promé, J.C., Nicolaou, K.C., Truchet, G., Beau, J.M. & Dénarié, J.** 1999. Nodule-inducing activity of synthetic *Sinorhizobium meliloti* nodulation factors and related

- lipochitooligosaccharides on alfalfa. Importance of the acyl chain structure. *Plant Physiol.* **120**: 83-92.
- 📖 **Dénarié, J., Debellé, F. & Promé, J.C.** 1996. *Rhizobium* lipo-chitooligosaccharide nodulation factors: signalling molecules mediating recognition and morphogenesis. *Annu. Rev. Biochem.* **65**: 503-535.
- 📖 **Dénarié, J., Debellé, F. & Rosenberg, C.** 1992. Signalling and host range variation in nodulation. *Annu. Rev. Microbiol.* **46**: 497-531.
- 📖 **Dixon, R.A. & Sumner, L.W.** 2003. Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol.* **131**: 878-885.
- 📖 **Dobbelaere, S., Croonenborghs, A., Thys, A., Vanderleyden, J., Dutto, P., Labandera-González, C., Caballero-Mellado, J., Aguirre, J.F., Kapulnik, Y., Breneer, S., Burdman, S., Kadouri, D., Sarig, S. & Okon, Y.** 2001. Responses of agronomically crops to inoculation with *Azospirillum*. *Aust. J. Plant Physiol.* **28**: 871-879.
- 📖 **Döbereiner, J. & Baldani, V.L.D.** 1979. Selective infection of maize roots by streptomycin-resistant *Azospirillum lipoferum* and other bacteria. *Can. J. Microbiol.* **25**: 1264-1269.
- 📖 **Döbereiner, J. & De-Polli, H.** 1980. Diazotrophic rhizocoenosis. En: *Nitrogen Fixation Proceedings Of Phytochem Soc. Eur. Symp.* Stewart, W.D.P. & Gallon, J.R. (eds.), pp.: 301-333. Academic Press, London.
- 📖 **Dowdle, S.F. & Bohlool, B.B.** 1985. Predominance of fast growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 1171-1176.
- 📖 **Dowling, D.N. & O'Gara, F.** 1994. Metabolites of *Pseudomonas* involved in the biocontrol of plant disease. *Trends Biotechnol.* **12**: 133-141.
- 📖 **Downie, J.A.** 1998. Functions of rhizobial nodulation genes. En: *The Rhizobiaceae, the molecular biology of model plant associated bacteria.* Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J. (eds.), pp.: 387-402. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 📖 **Downie, J.A. & Walker, S.A.** 1999. Plant responses to nodulation factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 483-489.
- 📖 **Drevon, J.J., Abdelly, C., Amarger, N., Aouani, E.A., Aurag, J., Gherbi, H., Jebara, M., Lluch, C., Payre, H., Schump, O., Soussi, M., Sifi, B. & Trabelsi, M.** 2001. An interdisciplinary research strategy to improve symbiotic nitrogen fixation

and yield of common bean (*Phaseolus vulgaris*) in salinised areas of the Mediterranean basin. *J. Biotechnol.* **91**: 257-268.

- 📖 **Drozdowicz, A. & Ferreira Santos, G.M.** 1987. Nitrogenase activity in mixed cultures of *Azospirillum* with other bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie* **142**: 487-493.
- 📖 **Dubeikovesky, A.N., Modokhova, E.A., Kocheskov, V.V., Polikarpova, F.P. & Boronin, A.M.** 1993. Growth promotion of blackcurrant softwood cuttings by recombinant strain *Pseudomonas fluorescent* BSP53a synthesizing an increased amount of indole-3-acetic acid. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1211-1221.
- 📖 **Dudley, M.E., Jacobs, T.W. & Long, S.R.** 1987. Microscopic studies of cell divisions induced in alfalfa roots by *Rhizobium meliloti*. *Planta* **171**: 289-301.
- 📖 **Duffy, B.K., Simon, A. & Weller, D.M.** 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent *Pseudomonas* for control of take-all on wheat. *Phytopathology* **86**: 188-194.
- 📖 **Duguay, A.R. & Silhavy, T.J.** 2004. Quality control in the bacterial periplasm. *Biochim. Biophys. Acta.* **1694**: 121-134.
- 📖 **Duzan, H.M., Mabood, F., Souleimanov, A. & Smith, D.L.** 2006. Nod Bj-V (C<sub>18:1</sub>, MeFuc) production by *Bradyrhizobium japonicum* (USDA110, 532C) at suboptimal growth temperatures. *J. Plant Physiol.* **163**: 107-111.
- 📖 **Duzan, H.M., Zhou, X., Souleimanov, A. & Smith, D.L.** 2004. Perception of *Bradyrhizobium japonicum* Nod factor by soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] root hairs under abiotic stress conditions. *J. Exp. Bot.* **55**: 2641-2646.
- 📖 **Eaglesham, A.R.G.** 1989. Nitrate inhibition of root nodule symbiosis in doubly rooted soybean plants. *Crop Sci.* **29**: 115-119.
- 📖 **Ehrhardt, D.W., Atkinson, E.M. & Long, S.R.** 1992. Depolarization of alfalfa root hair membrane potential by *Rhizobium meliloti* Nod factors. *Science* **256**: 998-1000.
- 📖 **Ehteshamul-Haque, S. & Ghaffar, A.** 1993. Use of rhizobia in the control of root diseases of sunflower, okra, soybean and mungbean. *J. Phytopathol.* **138**: 157-163.
- 📖 **El-Hamdaoui, A., Redondo-Nieto, M., Rivilla, R., Bonilla, I. & Bolaños, L.** 2003. Effects of boron and calcium nutrition on the establishment of the *Rhizobium leguminosarum*-pea (*Pisum sativum*) symbiosis and nodule development under salt stress. *Plant Cell Environ.* **26**: 1003-1011.
- 📖 **El-Shatnawi, M.K.J. & Makhadmeh, I.M.** 2001. Ecophysiology of the plant-rhizosphere system. *J. Agron. Crop Sci.* **187**: 1-9.

- 📖 **El-Sheikh, E.A.E.** 1998. Effects of salt on rhizobia and bradyrhizobia: a review. *Ann. Appl. Biol.* **132**: 507-524.
- 📖 **El-Sheikh, E.A.E. & Wood, M.** 1990. Effect of salinity on growth, nodulation and nitrogen yield of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *J. Exp. Bot.* **41**: 1263-1269.
- 📖 **El-Shinnawi, M.M., El-Saify, A.N. & Waly, T.M.** 1989. Influence of the ionic form of mineral salts on growth of faba bean and *Rhizobium leguminosarum*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **5**: 247-254.
- 📖 **Emons, A.M.C. & Mulder, B.M.** 2000. Nodulation factors trigger an increase of fine bundles of subapical actin filaments in *Vicia* root hairs: implications for root hair curling around bacteria. En: *Biology of Plant-Microbe Interaction*. De Wit, P.J.G.M., Bisseling, T. & Stiekema, W. (eds.), pp.: 44-49. International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions, St. Paul.
- 📖 **Ercoli, L., Mariotti, M., Masoni, A. & Arduini, I.** 2004. Growth responses of sorghum plants to chilling temperature and duration of exposure. *Eur. J. Agro.* **21**: 93-103.
- 📖 **Escudero, E. & González-Sánchez, P.** 2006. La fibra dietética. *Nutr. Hosp.* **21**: 61-72.
- 📖 **Essalmani, H. & Lahlou, H.** 2003. Mécanismes de bioprotection des plantes de lentille par *Rhizobium leguminosarum* contre *Fusarium oxysporum* sp. lentis. *C. R. Biologies.* **326**: 1163-1173.
- 📖 **Esseling, J.J. & Emons, A.M.C.** 2004. Dissection of Nod factor signalling in legumes: cell biology, mutants and pharmacological approaches. *J. Microscopy* **214**: 104-113.
- 📖 **Etzler, M.E., Kalsi, G., Ewing, N.N., Roberts, N.J., Day, R.B. & Murphy, J.B.** 1999. A Nod factor binding lectin with apyrase activity from legume roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 5856-5861.
- 📖 **Fåhraeus, G.** 1957. The infection of white clover root hairs by nodule bacteria studied by a simple glass slide technique. *J. Gen. Microbiol.* **16**: 374-381.
- 📖 **Faituri, M.Y., El-Mahi, Y.E. & El-Hassan, G.A.** 2001. Effects of some salts and sodicity on the growth of a *Rhizobium leguminosarum* bv. *viceae* strain isolated from a salt-affected soil. *Can. J. Microbiol.* **47**: 807-812.
- 📖 **Fan, T.W., Lane, A.N., Shenker, M., Bartley, J.P., Crowley, D. & Higashi, R.M.** 2001. Comprehensive chemical profiling of gramineous plant root exudates using high-resolution NMR and MS. *Phytochemistry* **57**: 209-221.

- 📖 **Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Schultze, M.** 1998. The role of ion fluxes in Nod factor signalling in *Medicago sativa*. *Plant J.* **13**: 455-463.
- 📖 **Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Schultze, M.** 1999. Elevation of the cytosolic free  $[Ca^{2+}]$  is indispensable for the transduction of the Nod factor signal in alfalfa. *Plant Physiol.* **121**: 273-279.
- 📖 **Felle, H.H., Kondorosi, E., Kondorosi, A. & Schultze, M.** 2000. How alfalfa root hairs discriminate between Nod factors and oligochitin elicitors. *Plant Physiol.* **124**: 1373-1380.
- 📖 **Feucht, W. & Treutter, D.** 1999. The role of flavan-3-ols and proanthocyanidins in plant defence. En: *Principles and Practices in Plant Ecology*. Inderjit, S., Dakshini, K.M.M. & Foy, C.L. (eds.), pp.: 307-338. CRC Press, Boca Raton.
- 📖 **Fisher, R.F., Egelhoff, T.T., Mulligan, J.T. & Long, S.R.** 1988. Specific binding of proteins from *Rhizobium meliloti* cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes Dev.* **2**: 282-293.
- 📖 **Flores, H.E., Vivanco, J.M. & Loyola-Vargas, V.M.** 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. *Trends Plant Sci.* **4**: 220-226.
- 📖 **Flower, D.B., Breton, G., Limin, A.E., Mahfoozi, S. & Sarhan, F.** 2001. Photoperiod and temperature interactions regulate low-temperature-induced gene expression in barley. *Plant Physiol.* **127**: 1676-1681.
- 📖 **Folch-Mallol, J.L., Marroquí, S., Sousa, C., Manyani, H., López-Lara, I.M., van der Drift, K.M.G.M., Haverkamp, J., Quinto, C., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Spaink, H.P. & Megías, M.** 1996. Characterization of *Rhizobium tropici* CIAT899 nodulation factors: the role of *nodH* and *nodPQ* genes in their sulfation. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 151-163.
- 📖 **Foster, R.C., Rovira, A.D. & Cook, T.W.** 1983. Ultrastructure of the Root-Soil Interface. The American Phytopathological Society, Saint Paul.
- 📖 **Fox, M.A., White, J.P., Hosie, A.H.F., Ludwig, E.M. & Poole, P.S.** 2006. Osmotic upshift transiently inhibits uptake via ABC transporters in Gram-negative bacteria. *J. Bacteriol.* **188**: 5304-5307.
- 📖 **Fridlender, M., Inbar, J. & Chet, I.** 1993. Biological control of soilborne plant pathogens by a beta-1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1211-1221.
- 📖 **Frink, C.R., Waggoner, P.E. & Ausubel, S.H.** 1999. Nitrogen fertilizer: retrospect and prospect. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 1175-1180.

- 📖 **Fujihara, S. & Yoneyama, T.** 1993. Effects of pH and osmotic stress on cellular polyamine contents in the soybean rhizobia *Rhizobium fredii* P220 and *Bradyrhizobium japonicum* A1017. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1104-1109.
- 📖 **Fujishige, N.A., Kapadia, N.N., de Hoff, P.L. & Hirsch, A.M.** 2006. Investigations of *Rhizobium* biofilm formation. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**: 195-206.
- 📖 **Fukuhara, H., Minakawa, Y., Akao, S. & Minamisawa, K.** 1994. The involvement of indole-3-acetic acid produced by *Bradyrhizobium elkanii* in nodule formation. *Plant Cell Physiol.* **35**: 1261-1265.
- 📖 **Fuqua, C., Parsek, M.R. & Greenberg, E.P.** 1998. Self perception in bacteria: quorum sensing with acylated homoserine lactones. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 183-189.
- 📖 **Gagnon, H. & Ibrahim, R.K.** 1998. Aldonic acids: a novel family of *nod* gene inducers of *Mesorhizobium loti*, *Rhizobium lupini*, and *Sinorhizobium meliloti*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 988-998.
- 📖 **Galinski, E.A.** 1995. Osmoadaptation by bacteria. *Adv. Micro. Environ.* **37**: 272-328.
- 📖 **Gao, M., Teplitski, M., Jayne, B., Wolfgang, R. & Bauer, D.** 2003. Production of substances by *Medicago truncatula* that affect bacterial quorum sensing. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **16**: 827-834.
- 📖 **García de Salomone, I.E., Hynes, R.K. & Nelson, L.M.** 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. *Can. J. Microbiol.* **47**: 404-411.
- 📖 **García, M.L., Dunlap, J., Loh, J. & Stacey, G.** 1996. Phenotypic characterization and regulation of the *nolA* gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**: 625-635.
- 📖 **Gaur, Y.D., Sen, A.N. & Subba Rao, N.S.** 1980. Improved legume-*Rhizobium* symbiosis by inoculating preceding cereal crop with *Rhizobium*. *Plant Soil* **54**: 313-316.
- 📖 **Geniaux, E., Laguerre, G. & Amarger, N.** 1993. Comparison of geographically distant population in *Rhizobium* isolated from root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Ecol.* **2**: 295-302.
- 📖 **Gentili, F. & Jumpponen, A.** 2006. Multiple inoculations and interactions among potential biofertilizers. En: *Handbook of Microbial Biofertilizers*. Rai, M.K. (ed.), pp.: 15-18. The Haworth Press Inc, London.



- 📖 **Geremia, R.A., Mergaert, P., Geelen, D., Vanmontagu, M. & Holsters, M.** 1994. The NodC protein of *Azorhizobium caulinodans* is an N-acetylglucosaminyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 2669-2673.
- 📖 **Geurts, R., Fedorova, E. & Bisseling, T.** 2005. Nod factor signalling genes and their function in the early stages of *Rhizobium* infection. *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**: 346-352.
- 📖 **Gianinazzi-Pearson, V., Dumas-Gaudot, E., Gollotte, A., Tahiri-Alaoui, A. & Gianinazzi, S.** 1996. Cellular and molecular defence-related root responses to invasion by arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytol.* **133**: 45-57.
- 📖 **Gil-Serrano, A.M., Franco-Rodríguez, G., Tejero-Mateo, P., Thomas-Oates, J., Spaink, H.P., Ruíz-Saínz, J.E., Megías, M. & Lamrabet, Y.** 1997. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium fredii* HH103. *Carbohydr. Res.* **303**: 435-443.
- 📖 **Girard, L., Valderrama, B., Palacios, R., Romero, D. & Dávila, G.** 1996. Transcriptional activity of the symbiotic plasmid of *Rhizobium etli* is affected by different environmental conditions. *Microbiology* **142**: 2847-2856.
- 📖 **Gleason, C., Chaudhuri, S., Yang, T., Muñoz, A., Poovaiah, B.W. & Oldroyd, G.E.D.** 2006. Nodulation independent of rhizobia induced by a calcium-activated kinase lacking autoinhibition. *Nature* **44**: 1149-1152.
- 📖 **Glick, B.R.** 2004. Bacterial ACC deaminase and the alleviation of plant stress. *Adv. Appl. Microbiol.* **56**: 291-312.
- 📖 **Glick, B.R., Jacobson, C.B., Schwarze, M.N.K. & Pasternak, J.J.** 1994. Aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase mutants of the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* GR12-2 do not stimulate canola root elongation. *Can. J. Microbiol.* **40**: 911-915.
- 📖 **Glick, B.R., Patten, C.L., Holguin, G. & Penrose, D.M.** 1999. Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth-promoting bacteria. Imperial College Press, London.
- 📖 **Glick, B.R., Penrose, D.M. & Li, J.** 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth promoting bacteria. *J. Theor. Biol.* **190**: 63-68.
- 📖 **Goedhart, J., Rohrig, H., Hink, M.A., van Hoek, A., Visser, A.J., Bisseling, T. & Gadella, T.W.J.** 1999. Nod factors integrate spontaneously in biomembranes and transfer rapidly between membranes and to root hairs, but transbilayer flip-flop does not occur. *Biochemistry* **38**: 10898-10907.

- 📖 **Goldmann, A., Boivin, C., Fleury, V., Message, B., Lecoœur, L., Maille, M. & Tepfer, D.** 1991. Betaine use by rhizosphere bacteria: genes essential for trigonelline, stachydrine, and carnitine catabolism in *Rhizobium meliloti* are located on pSym in the symbiotic region. *Mol. Plant-Microbe Interac.* **4**: 571-578.
- 📖 **González, J.E. & Marketon, M.M.** 2003. Quorum sensing in nitrogen-fixing rhizobia. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**: 574-592.
- 📖 **Göttfert, M.** 1993. Regulation and function of rhizobial nodulation genes. *FEMS Microbiol. Rev.* **104**: 39-64.
- 📖 **Gould, P., Maguire, M. & Lund, P.A.** 2007. Distinct mechanisms regulate expression of the two major *groEL* homologues in *Rhizobium leguminosarum*. *Arch. Microbiol.* **187**: 1-14.
- 📖 **Graham, P.H.** 1992. Stress tolerance in *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* and nodulation under adverse soil conditions. *Can. J. Microbiol.* **38**: 475-484.
- 📖 **Graham, P.H., Draeger, K.J., Ferrey, M.L., Conroy, M.J., Hammer, B.E., Martínez, E., Aarons, S.R. & Quinto, C.** 1994. Acid pH tolerance in strains of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium*, and initial studies on the basis for acid tolerance of *Rhizobium tropici* UMR1899. *Can. J. Microbiol.* **40**: 189-207.
- 📖 **Graham, P.H. & Vance, C.P.** 2000. Nitrogen fixation in perspective: an overview of research and extension needs. *Field Crops Res.* **65**: 93-106.
- 📖 **Graham, P.H., Viteri, S.E., Mackie, F., Vargas, A.T. & Palacios, R.** 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* **5**: 121-128.
- 📖 **Gray, E.J. & Smith, D.L.** 2005. Intracellular and extracellular PGPR: commonalities and distinctions in the plant-bacterium signalling processes. *Soil Biol. Biochem.* **37**: 395-412.
- 📖 **Grayston, S.J. & Germida, J.J.** 1991. Sulfur-oxidizing bacteria as plant growth promoting rhizobacteria for canola. *Can. J. Microbiol.* **37**: 521-529.
- 📖 **Grayston, S.J., Wang, S.J., Campbell, C.D. & Edwards, A.C.** 1998. Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* **31**: 145-153.
- 📖 **Greenland, D.J.** 1984. Exploited plants: rice. *Biologist* **31**: 291-325.
- 📖 **Greenway, H. & Munns, R.** 1980. Mechanisms of salt tolerance in non halo-phytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**: 149-190.

- 📖 **Gressent, F., Mantegazza, N., Cullimore, J.V., Driguez, H., Ranjeva, R. & Bono, J.J.** 2002. High-affinity Nod factor binding site from *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 834-839.
- 📖 **Groves, P., Offerann, S., Rasmussen, M.O., Cañada, F.J., Bono, J.J., Driguez, H., Imberty, A. & Jiménez-Barbero, J.** 2005. The relative orientation of the lipid and carbohydrate moieties of lipochitooligosaccharides related to nodulation factors depends on lipid chain saturation. *Org. Biomol. Chem.* **3**: 1381-1386.
- 📖 **Guerinot, M.L.** 1991. Iron uptake and metabolism in the rhizobia/legume symbioses. *Plant Soil* **130**: 199-209.
- 📖 **Gutiérrez-Mañero, F.J., Acero, N., Lucas-García, J.A. & Probanza, A.** 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. II. Characterization of growth promoting and growth inhibiting strains. *Plant Soil* **182**: 67-74.
- 📖 **Gutiérrez-Mañero, F.J., Probanza, A., Ramos, B., Colón-Flores, J.J. & Lucas-García, J.A.** 2003. Effects of culture filtrates of rhizobacteria isolated from wild lupine on germination, growth and biological nitrogen fixation of lupine seedlings. *J. Plant Nutr.* **26**: 1101-1115.
- 📖 **Gutiérrez-Mañero, F.J., Ramos, B., Probanza, A., Mehouchi, J., Tadeo, F.R. & Talón, M.** 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiol. Plant.* **111**: 206-211.
- 📖 **Gyaneshwar, P., Naresh Kumar, G., Parekh, L.J. & Poole, P.S.** 2002. Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* **245**: 83-93.
- 📖 **Hagemann, M. & Erdmann, N.** 1997. Environmental stresses. En: *Cyanobacterial Nitrogen Metabolism and Environmental Biotechnology*. Rai, A.K. (ed.), pp.: 156-221. Springer-Verlag, Heidelberg.
- 📖 **Halbleib, C.M. & Ludden, P.W.** 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* **130**: 1081-1084.
- 📖 **Hale, M.G., Moore, L.D. & Griffin, G.J.** 1978. Root exudates and exudation. En: *Interactions Between Non-Pathogenic Soil Microorganism And Plants*. Dommergues, Y.R. & Krupa, S.V. (eds.), pp.: 163-203. Elsevier Scientific Pub. Co., Amsterdam.
- 📖 **Hallmann, J.A., Quadt-Hallmann, W., Mahaffee, F. & Kloepper, J.W.** 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* **43**: 895-914.
- 📖 **Hammerschmidt, R.** 1999. Induced disease resistance: How do induced plants stop pathogens? *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **55**: 77-84.

- 📖 **Harborne, J.B.** 1994. Plant polyphenols and their role in plant defence mechanisms. En: *Polyphenols*. Brouillard, R., Jay, M. & Scalbert, A. (eds.), **94**: 19-26.
- 📖 **Hardarson, G., Bliss, F.A., Cigales-Rivero, M.R., Henson, R.A., Kipe-Nolt, J.A., Longeri, L., Manrique, A., Peña-Cabriaes, J.J., Pereira, P.A.A., Sanabria, C.A. & Tsai, S.M.** 1993. Genotypic variation in biological nitrogen fixation by common bean. *Plant Soil* **152**: 59-70.
- 📖 **Hardman, A.M., Stewart, G.S. & William, P.** 1998. Quorum sensing and the cell-cell communication dependent regulation of gene expression in pathogenic and non-pathogenic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **74**: 199-210.
- 📖 **Hartwig, U.A. & Phillips, D.A.** 1991. Release and modification of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiol.* **105**: 787-797.
- 📖 **Hayashi, H. & Murata, N.** 1998. Genetically engineered enhancement of salt tolerance in higher plants. En: *Stress Responses of Photosynthetic Organisms: Molecular Mechanisms and Molecular Regulation*. Sato, K. & Murata, N. (eds.), pp.: 133-148. Elsevier, Amsterdam.
- 📖 **Heermann, R. & Jung, K.** 2004. Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 168-174.
- 📖 **Heidstra, R., Geurts, R., Franssen, H., Spaink, H.P., van Kammen, A. & Bisseling, T.** 1994. Root hair deformation activity of nodulation factors and their fate in *Vicia sativa*. *Plant Physiol.* **105**: 787-797.
- 📖 **Heron, D.S. & Pueppke, S.G.** 1987. Regulation of nodulation in the soybean-*Rhizobium* symbiosis. *Plant Physiol.* **84**: 1391-1396.
- 📖 **Herridge, D.F., Turpin, J.E. & Robertson, M.J.** 2001. Improving nitrogen fixation of crop legumes through breeding and agronomic management: analysis with simulation modelling. *Aust. J. Exp. Agric.* **41**: 391-401.
- 📖 **Hiltner, L.** 1904. Ubre neuere erfahrungen und probleme auf dem gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksichtigung der grundung und brache. *Arb. Dsch. Landwirt. Ges.* **98**: 59-78.
- 📖 **Holguin, G. & Bashan, Y.** 1996. Nitrogen-fixation by *Azospirillum brasilense* Cd is promoted when co-cultured with a mangrove rhizosphere bacterium (*Staphylococcus* sp.). *Soil Biol. Biochem.* **28**: 1651-1660.
- 📖 <http://apps.fao.org>. Food And Agriculture Organization Of The United Nations.
- 📖 <http://www.soystats.com/2005>. SoyStats American Soybean Association.

- 📖 **Hungría, M.** 1994. Sinais moleculares envolvidos na nodulação das leguminosas por rizóbio. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*. **18**: 339-364.
- 📖 **Hungría, M., Campos, R.J. & Carvalho-Mendes, I.C.** 2003. Benefits of inoculation of the common bean (*Phaseolus vulgaris*) crop with efficient and competitive *Rhizobium tropici* strains. *Biol. Fertil. Soils* **39**: 88-93.
- 📖 **Hungría, M. & Franco, A.A.** 1993. Effects of high temperatures on nodulation and N<sub>2</sub> fixation in *Phaseolus vulgaris* L.. *Plant Soil* **149**: 95-102.
- 📖 **Hungría, M., Johnston, A.W. & Phillips, D.A.** 1992. Effects of flavonoids released naturally from bean (*Phaseolus vulgaris*) on *nodD*-regulated gene transcription in *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 199-203.
- 📖 **Hungría, M., Joseph, C.M. & Phillips, D.A.** 1991. *Rhizobium nod*-gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol.* **97**: 759-764.
- 📖 **Hungría, M. & Stacey, G.** 1997. Molecular signals exchanged between host plants and rhizobia: basic aspects and potential application in agriculture. *Soil Biol. Biochem.* **29**: 819-830.
- 📖 **Hungría, M. & Vargas, M.A.T.** 2000. Environmental factors affecting N<sub>2</sub> fixation in grain legumes in the tropics, with an emphasis on Brazil. *Field Crops Res.* **65**: 151-164.
- 📖 **Igual, J.M., Rodríguez-Barrueco, C. & Cervantes, E.** 1997. The effect of aluminium on nodulation and nitrogen fixation in *Casuarina cunninghamiana* Miq.. *Plant Soil* **190**: 41-46.
- 📖 **Isopi, R., Fabbre, P., Del Gallo, M. & Puppi, G.** 1995. Dual inoculation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench asp. bicolor with vesicular arbuscular mycorrhizae and *Acetobacter diazotrophicus*. *Symbiosis* **18**: 43-55.
- 📖 **Jadhav, R.S., Thaker, N.V. & Desai, A.** 1994. Involvement of the siderophore of cowpea *Rhizobium* in the iron nutrition of the peanut. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **10**: 360-361.
- 📖 **Jaeger, C.H.L., Lindow, S.E., Miller, W., Clark, E. & Firestone, M.K.** 1999. Mapping of sugar and amino acid availability in soil around roots with bacterial sensors of sucrose and tryptophan. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2685-2690.
- 📖 **Jebara, M., Drevon, J.J. & Aouani, M.E.** 2001. Effects of hydroponic culture system and NaCl on interactions between common bean lines and native rhizobia from Tunisian soils. *Agronomie* **21**: 601-605.

- 📖 **Jiang, X. & Chai, T.J.** 1996. Survival of *Vibrio parahaemolyticus* at low temperatures under starvation conditions and subsequent resuscitation of viable, nonculturable cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1300-1305.
- 📖 **John, M., Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U. & Schell, J.** 1993. *Rhizobium* NodB protein involved in nodulation signal synthesis is a chitoooligosaccharide deacetylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 625-629.
- 📖 **Johnson, D., Ijdo, M., Genney, D.R., Anderson, I.C. & Alexander, I.J.** 2005. How do plants regulate the function, community structure and diversity of mycorrhizal fungi? *J. Exp. Bot.* **56**: 1751-1760.
- 📖 **Jones, D.L., Hodge, A. & Kuzyakov, Y.** 2004. Plant and mycorrhizal regulation of rhizodeposition. *New Phytol.* **163**: 459-480.
- 📖 **Jones, J.D.G.** 2001. Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 281-287.
- 📖 **Jordan, D.C.** 1984. *Rhizobiaceae* Conn 1938. En: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg, N.R. & Holt, J.G. (eds.), pp.: 235-244. Williams & Wilkins Co., London.
- 📖 **Journet, E.P., El-Gachtouli, N., Vernoud, V., De Billy, F., Pichon, M., Dedieu, A., Arnould, C., Morandi, D., Barker, D.G. & Gianinazzi-Pearson, V.** 2001. *Medicago truncatula* ENOD11: a novel RPRP-encoding early nodulin gene expressed during mycorrhization in arbuscule-containing cells. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 737-748.
- 📖 **Journet, E.P., Pichon, M., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G. & Barker, D.G.** 1994. *Rhizobium meliloti* Nod factors elicit cell-specific transcription of the ENOD12 gene in transgenic alfalfa. *Plant J.* **6**: 241-249.
- 📖 **Justesen, U.** 2001. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. *J. Mass Spec.* **36**: 169-178.
- 📖 **Juszczuk, I.M., Wiktorowska, A., Malusa, E. & Rychter, A.M.** 2004. Changes in the concentration of phenolic compounds and exudation induced by phosphate deficiency in bean plants (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* **267**: 41-49.
- 📖 **Kahn, M.L., McDermott, T.R. & Udvardi, M.K.** 1998. Carbon and nitrogen metabolism in rhizobia. En: *The Rhizobiaceae, The Molecular Biology of Model Plant Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J. (eds.), pp.: 461-485. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- 📖 **Kalsi, G. & Etzler, M.E.** 2000. Localization of a Nod factor-binding protein in legume roots and factors influencing its distribution and expression. *Plant Physiol.* **124**: 1039-1048.
- 📖 **Kamilova, F., Kravchenko, L.V., Shaposhnikov, A.I., Azarova, T., Makarova, N. & Lugtenberg, B.** 2006. Organic acids, sugars, and L-tryptophane in exudates of vegetables growing on stonewool and their effects on activities of rhizosphere bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 250-256.
- 📖 **Kamst, E., van der Drift, K.M., Thomas-Oates, J., Lugtenberg, B.J.J. & Spaink, H.P.** 1995. Mass spectrometric analysis of chitin oligosaccharides produced by *Rhizobium* NodC protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **21**: 6282-6285.
- 📖 **Kannenberg, E.L., Reuhs, B.L., Fosberg, L.S. & Carlson, R.W.** 1998. Lipopolysaccharide and K-antigens: their structures, biosynthesis and functions. En: *The Rhizobiaceae, The Molecular Biology of Model Plant Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J. (eds.), pp.: 119-154. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 📖 **Kape, R., Parniske, M., Brandt, S. & Werner, D.** 1992. Isoliquiritigenin, a strong *nod* gene and glyceollin resistance inducing flavonoid from soybean root exudates. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 1705-1710.
- 📖 **Kape, R., Parniske, M. & Werner, D.** 1991. Chemotaxis and *nod* gene activity of *Bradyrhizobium japonicum* in response to hydroxycinnamic acids and isoflavonoids. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 316-319.
- 📖 **Killham, K. & Firestone, M.K.** 1984. Salt stress control of intracellular solutes in *Streptomyces* indigenous saline soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 301-306.
- 📖 **Kim, H. & Farrand, S.K.** 1998. Opine catabolic loci from *Agrobacterium* plasmids confer chemotaxis to their cognate substrates. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**: 131-143.
- 📖 **Kiss, E., Mergaert, P., Oloh, B., Kereszt, A. & Staehelin, C.** 1998. Conservation of *NolR* in the *Sinorhizobium* and *Rhizobium* genera of the *Rhizobiaceae* family. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 1186-1195.
- 📖 **Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K.** 1994. ERD15, a cDNA for a dehydration-induced gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* **106**: 1707-1712.
- 📖 **Kloepper, J.W. & Schroth, M.N.** 1978. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. En: *Proceeding of the 4<sup>th</sup> International Conference on Plant Pathogenic Bacteria*. Station de Pathologie Végétale et de Phytobactériologie, Tours.

- 📖 **Kloepper, J.W., Lifshitz, R. & Schroth, M.N.** 1988. *Pseudomonas* inoculants to benefits plant production. *ISI Atlas Sci. Anim. Plant Sci.* **1**: 60-64
- 📖 **Klossak, R.M., Joshi, R.S., Bowen, B.A., Paaren, H.E. & Applebaum, E.R.** 1990. Strain-specific inhibition of *nod* gene induction in *Bradyrhizobium japonicum* by flavonoid compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1333-1341.
- 📖 **Kobayashi, H., Naciri-Graven, Y., Broughton, W.J. & Perret, X.** 2004. Flavonoids induce temporal shifts in gene-expression of *nod*-box controlled loci in *Rhizobium* sp. NGR234. *Mol. Microbiol.* **51**: 335-347.
- 📖 **Kondorosi, E., Banfalvi, Z. & Kondorosi, A.** 1984. Physical and genetic analysis of a symbiotic region of *Rhizobium meliloti*: identification of nodulation genes. *Mol. Gen. Genet.* **193**: 445-452.
- 📖 **Kondorosi, E., Pierre, M., Cren, M., Haumann, U., Buiré, M., Hoffman, B., Scell, J. & Kondorosi, A.** 1991. Identification of NolR, a negative transacting factor controlling the *nod* regulon in *Rhizobium meliloti*. *J. Mol. Biol.* **222**: 885-896.
- 📖 **Koo, B-J., Adriano, D.C., Bolan, N.S. & Barton, C.D.** 2005. Root exudates and microorganisms. En: *Encyclopedia of Soils in The Environment*. Hillel, D. (ed.), pp.: 421-428. Elsevier Academic Press, Amsterdam.
- 📖 **Kovalskaya, N.Y., Lobakova, E.S. & Umarov, M.M.** 2001. The formation of artificial nitrogen-fixing symbioses with rape (*Brassica napus* var. *napus*) plants in nonsterile soil. *Microbiology* **70**: 606-612.
- 📖 **Kowalchuk, G.A., Buma, D.S., de Boer, W., Klinkhamer, P.G. & van Veen, J.A.** 2002. Effects of above-ground plant species composition and diversity on the diversity of soil-borne microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81**: 509-520.
- 📖 **Kpoblekou, K. & Tabatabai, M.A.** 1994. Effect of organic acids on release of phosphorus from phosphate rocks. *Soil Sci.* **158**: 442-453.
- 📖 **Kuklinsky-Sobral, J., Luiz Araújo, W., Mendes, R., Geraldi, I.O., Pizzirani-Kleiner, A.A. & Azevedo, J.L.** 2004. Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environ. Microbiol.* **6**: 1244-1251.
- 📖 **Kulkarni, S. & Nautiyal, C.S.** 2000. Effects of salt and pH stress on temperature-tolerant *Rhizobium* sp. NBRI330 nodulating *Prosopis juliflora*. *Curr. Microbiol.* **40**: 221-226.
- 📖 **Kumar, R., Pandey, S. & Pandey, A.** 2006. Plant roots and carbon sequestration. *Curr. Sci.* **91**: 885-890.



- 📖 **Kwon, S-W., Young Park, J., Kim, J-S., Kang, J-W., Cho, J-H., Lim, C-K., Parker, M.A. & Lee, G-B.** 2005. Phylogenetic analysis of the genera *Bradyrhizobium*, *Mesorhizobium*, *Rhizobium* and *Sinorhizobium* on the basis of 16S rRNA gene and internally transcribed spacer region sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 263-270.
- 📖 **Ladha, J.K. & Peoples, M.B.** (eds.). 1995. Management of biological nitrogen fixation for the development of more productive and sustainable agricultural systems. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 📖 **Laeremans, T., Snoeck, C., Marien, J., Verreth, C., Martínez-Romero, E., Promé, J.C. & Vanderleyden, J.** 1999. *Phaseolus vulgaris* recognizes *Azorhizobium caulinodans* Nod factors with a variety of chemical substituents. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 820-824.
- 📖 **Laeremans, T. & Vanderleyden, J.** 1998. Review: infection and nodulation signalling in *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 787-808.
- 📖 **Lamrabet, Y., Belloguín, R.A., Cubo, T., Espuny, R., Gil, A., Krishnan, H.B., Megías, M., Ollero, F.J., Pueppke, S.G., Ruíz-Saínz, J.E., Spaink, H.P., Tejero-Mateo, P., Thomas-Oates, J. & Vinardell, J.M.** 1999. Mutation in GDP-fucose synthesis genes of *Sinorhizobium fredii* alters Nod factors and significantly decreases competitiveness to nodulate soybeans. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **12**: 207-217.
- 📖 **Lata Saxena, A.K. & Rewari, R.B.** 1991. The influence of phosphate and zinc on growth, nodulation and mineral composition of chickpea (*Cicer arietinum* L.) under salt stress. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 202-205.
- 📖 **Lata Saxena, A.K. & Tilak, K.V.B.R.** 1994. Interactions among beneficial soil microorganisms. *Indian J. Microbiol.* **34**: 91-106.
- 📖 **Lata Saxena, A.K. & Tilak, K.V.B.R.** 2000. Biofertilizers to augment soil fertility and crop production. En: *Soil Fertility and Crop Production*. Krishna, K.R. (ed.), pp.: 279-312. Science Publishers, Enfield.
- 📖 **Leibinger, W., Beuker, B., Hahn, M. & Mendgen, K.** 1997. Control of postharvest pathogens and colonization of the apple surface by antagonistic microorganisms in the field. *Phytopathology* **87**: 1103-1110.
- 📖 **Limpens, E., Franken, C., Smit, P., Willemse, J., Bisseling, T. & Geurts, R.** 2003. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science* **302**: 630-633.

- 📖 **Lippi, D., de Paolis, M.R., di Mattia, E., Grego, S., Pietrosanti, T. & Cacciari, I.** 2000. Effect of salinity on growth and starvation-survival of a tropical *Rhizobium* strain. *Biol. Fertil. Soils* **30**: 276-283.
- 📖 **Lippmann, B., Leinhos, V. & Bergmann, H.** 1995. Influence of auxin producing rhizobacteria on root morphology and nutrient accumulation of crops. I. Changes in root morphology and nutrient accumulation in maize (*Zea mays* L.) caused by inoculation with indole-3-acetic acid (IAA) producing *Pseudomonas* and *Acinetobacter* strains or IAA applied exogenously. *J. Appl. Bot.* **69**: 31-36.
- 📖 **Lloret, J., Wulff, B.B., Rubio, J.M., Downie, J.A., Bonilla, I. & Rivilla, R.** 1998. Exopolysaccharide II production is regulated by salt in the halotolerant strain *Rhizobium meliloti* EFB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1024-1028.
- 📖 **Lodwig, E., Hosie, A., Bourdes, A., Findlay, K., Allaway, D., Karunakaran, R., Downie, J. & Poole, P.S.** 2003. Amino-acid cycling drives nitrogen fixation in the legume-*Rhizobium* symbiosis. *Nature* **422**: 722-726.
- 📖 **Loh, J., García, M. & Stacey, G.** 1997. NodV and NodW, a second flavonoid recognition system regulating *nod* gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.* **179**: 3013-3020.
- 📖 **Loh, J., Lohar, D.P., Andersen, B. & Stacey, G.** 2002. A two-component regulator mediates population density dependent expression of the *Bradyrhizobium japonicum* nodulation genes. *J. Bacteriol.* **184**: 1759-1766.
- 📖 **Loh, J., Stacey, M.G., Sadowsky, M.J. & Stacey, G.** 1999. The *Bradyrhizobium japonicum nolA* gene encodes three functionally distinct proteins. *J. Bacteriol.* **181**: 1544-1554.
- 📖 **López-Lara, I.M., van Der Drift, K.M.G.M., van Brussel, A.A.N., Haverkamp, J., Lugtenberg, B.J.J., Thomas-Oates, J.E. & Spaink, H.P.** 1995. Induction of nodule primordia on *Phaseolus* and *Acacia* by lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals from broad host range *Rhizobium* strain GRH2. *Plant Mol. Biol.* **29**: 465-477.
- 📖 **Lucas-García, J.A., Barbas, C., Probanza, A., Barrientos, M.L. & Gutiérrez-Mañero, F.J.** 2001. Low molecular weight organic acids and fatty acids in root exudates of two *Lupinus* cultivars at flowering and fruiting stages. *Phytochem. Anal.* **12**: 305-311.
- 📖 **Lucas-García, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Barriuso, J. & Gutiérrez-Mañero, F.J.** 2004a. Effects of inoculation with plant-growth promoting rhizobacteria (PGPRs) and *Sinorhizobium fredii* on biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Glycine max* cv. Osumi. *Plant Soil* **267**: 143-153.

- Lucas-García, J.A., Probanza, A., Ramos, B., Colón Flores, J.J. & Gutiérrez-Mañero, F.J. 2004b. Effects of plant-growth promoting rhizoacteria (PGPRs) on the biological nitrogen fixation, nodulation and growth of *Lupinus albus* L. cv. Multolupa. *Eng. Life Sci.* **4**: 71-77.
- Lugtenberg, B.J.J., Dekkers, L. & Bloemberg, G.V. 2001. Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 461-490.
- Lynch, J.M. 1990. Introduction: consequences of microbial rhizosphere competence for plant and soil. En: *The Rhizosphere*. Lynch, J.M. (ed.), pp.: 1-10. John Wiley and sons, Chichester.
- Mabood, F., Souleimanov, A., Khan, W. & Smith, D.L. 2006. Jasmonates induce Nod factor production by *Bradyrhizobium japonicum*. *Plant Physiol. Biochem.* **44**: 759-765.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M. & Parker, J. 2004. Brock: Biología de los microorganismos. Pearson Prentice Hall, Madrid.
- Madsen, E.B., Madsen, L.H., Radutoiu, S., Olbryt, M., Rakwalska, M., Szczyglowski, K., Sato, S., Kaneko, T., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J. 2003. A receptor kinase gene of the LysM type is involved in legume perception of rhizobial signals. *Nature* **425**: 637-640.
- Maier, R.J. & Triplett, E.W. 1996. Toward more productive, efficient and competitive nitrogen-fixing symbiotic cyanobacteria. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 191-234.
- Malajczuk, N., Pearse, M. & Litchfield, R.T. 1984. Interactions between *Phytophthora cinnamomi* and *Rhizobium* isolates. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **82**: 491-500.
- Manahan, S.H. & Steck, T.R. 1997. The viable but nonculturable state in *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **22**: 29-37.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. & Sambrook, J. 1982. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbord Laboratory Press, Cold Spring Harbord. New York.
- Mansfeld-Giese, K., Larsen, J. & Bødker, L. 2002. Bacterial populations associated with mycelium of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 133-140.
- Manyani, H. 2000. Análisis de los genes de nodulación implicados en la sulfatación de la molécula señal de *Rhizobium tropici* CIAT899. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla (España).

- 📖 **Manyani, H., Sousa, C., Soria-Díaz, M.E., Gil-Serrano, A.M. & Megías, M.** 2001. Regulation of Nod factor sulphation genes in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Can. J. Microbiol.* **47**: 574-579.
- 📖 **Marschner, H.** 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London.
- 📖 **Martínez-Romero, E.** 2003. Diversity of *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* symbiosis: overview and perspectives. *Plant Soil* **252**: 11-23.
- 📖 **Martínez-Romero, E., Pardo, M.A., Palacios, R. & Cevallos, M.A.** 1985. Reiteration of nitrogen fixation genes sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1779-1786.
- 📖 **Martínez-Romero, E., Segovia, L., Martín-Mercante, F., Franco, A.A., Graham, P. & Pardo, M.A.** 1991. *Rhizobium tropici*, a novel species nodulating *Phaseolus vulgaris* L. beans and *Leucaena* sp. trees. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 417-426.
- 📖 **Mathesius, U.** 2003. Conservation and divergence of signalling pathways between roots and soil microbes-the *Rhizobium*-legume symbiosis compared to the development of lateral roots, mycorrhizal interactions and nematode-induced galls. *Plant Soil* **255**: 105-119.
- 📖 **Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B.R.** 2004a. Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Sci.* **166**: 525-530.
- 📖 **Mayak, S., Tirosh, T. & Glick, B.R.** 2004b. Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 565-572.
- 📖 **McInroy, J.A. & Kloepper, J.W.** 1995. Survey of indigenous endophytes from cotton and sweet corn. *Plant Soil* **173**: 337-342.
- 📖 **McIver, J., Djordjevic, M.A., Weinman, J.J., Bender, G.L. & Rolfe, B.G.** 1989. Extension of host range of *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii caused by point mutations in *nodD* that result in alterations in regulatory function and recognition of inducer molecules. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**: 97-106.
- 📖 **McKay, I.A. & Djordjevic, M.A.** 1993. Production and excretion of Nod metabolites by *Rhizobium leguminosarum* bv. trifolii are disrupted by the same environmental factors that reduce nodulation in the field. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 3385-3392.
- 📖 **Megías, M., Folch, J.L. & Sousa, C.** 1993. Control of the expression of bacterial genes involved in symbiotic nitrogen fixation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 444-454.

- 📖 **Mergaert, P., Ferro, M., D'Haese, W., van Montagu, M., Holsters, M. & Promé, J.C.** 1997a. Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571 can be glycosylated with an arabinosyl group, a fucosyl group, or both. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 683-687.
- 📖 **Mergaert, P., van Montagu, M., Promé, J.C. & Holsters, M.** 1993. Three unusual modifications, a D-arabinosyl, an N-methyl, and a carbamoyl group, are present on the Nod factors of *Azorhizobium caulinodans* strain ORS571. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**: 1551-1555.
- 📖 **Mergaert, P., van Montagu, P. & Holster, M.** 1997b. Molecular mechanisms of Nod factor diversity. *Mol. Microbiol.* **25**: 811-817.
- 📖 **Messina, M., McCaskill-Stevens, W. & Lampe, J.W.** 2006. Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J. Natl. Cancer Inst.* **98**: 1275-1284.
- 📖 **Mhadhbi, H., Jebara, M., Limam, F. & Aouani, M.E.** 2004. Rhizobial strain involvement in plant growth, nodule protein composition and antioxidant enzyme activities of chickpea-rhizobia symbioses: modulation by salt stress. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 717-722.
- 📖 **Michiels, J., Verreth, C. & Vanderleyden, J.** 1994. Effects of temperature stress on bean nodulating *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1206-1212.
- 📖 **Miller, D.D., de Ruijter, N.C.A., Bisseling, T. & Emons, A.M.C.** 1999. The role of actin in root hair morphogenesis: studies with lipochitooligosaccharides as a growth stimulator and cytochalasin as an actin perturbing drug. *Plant J.* **17**: 141-154.
- 📖 **Miller, D.D., Leferink-ten Klooster, H.B. & Emons, A.M.C.** 2000. Lipochitooligosaccharide nodulation factors stimulate cytoplasmic polarity with longitudinal endoplasmic reticulum and vesicles at the tip in vetch root hairs. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **13**: 1385-1390.
- 📖 **Miller, J.H.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. New York.
- 📖 **Miller, K.J. & Wood, J.M.** 1996. Osmoadaptation by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **50**: 101-36.
- 📖 **Mitra, R.M., Gleason, C.A., Edwards, A., Hadfield, J., Downie, J.A., Oldroyd, G.E. & Long, S.R.** 2004. A Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase required for symbiotic nodule development: gene identification by transcript-based cloning. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 4701-4705.

- 📖 **Mitsui, H., Sato, T., Ito, N. & Minamisawa, K.** 2004. *Sinorhizobium meliloti* RpoH1 is required for effective nitrogen-fixing symbiosis with alfalfa. *Mol. Gen. Genomics* **271**: 416-425.
- 📖 **Mo, Y.Y., Geibel, M., Bonsall, R.F. & Gross, D.C.** 1995. Analysis of sweet cherry (*Prunus avium* L.) leaves for plant signal molecules that activate the syrB gene required for synthesis of the phytotoxin, syringomycin, by *Pseudomonas syringae* bv. syringae. *Plant Physiol.* **107**: 603-612.
- 📖 **Moawad, H. & Beck, D.P.** 1991. Some characteristics of *Rhizobium leguminosarum* isolates from uninoculated field-grown lentil. *Soil Biol. Biochem.* **23**: 933-937.
- 📖 **Molina, R., Myrold, D. & Li, C.Y.** 1994. Root symbioses of red alder: technological opportunities for enhanced regeneration and soil improvement. En: *The Biology and Management of Red Alder*. Hibbs, D.E., DeBell, D.S. & Tarrant, R.F. (eds.), pp.: 23-46. Oregon State University, Corvallis.
- 📖 **Morgan, J.A.W. & Whipps, J.M.** 2001. Methodological approaches to the study of rhizosphere carbon flow and microbial population dynamics. En: *The Rhizosphere: Biochemistry and Organic Substances at the Soil-Plant Interface*. Pinton, R., Varanini, Z. & Nannipieri, P. (eds.), pp.: 373-410. Marcel Dekker, New York.
- 📖 **Morón, B.** 2004. Influencia del estrés abiótico en el establecimiento de la simbiosis *Phaseolus vulgaris*-*Rhizobium* spp.. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. Sevilla (España).
- 📖 **Morón, B., Soria-Díaz, M.E., Ault, J., Verroios, G., Sadaf, N., Rodríguez-Navarro, D.N., Gil-Serrano, A., Thomas-Oates, J., Megías, M. & Sousa, C.** 2005. Low pH changes the profile of nodulation factors produced by *Rhizobium tropici* CIAT899. *Chem. Biol.* **12**: 1029-1040.
- 📖 **Morris, J.B.** 1997. Special purpose legume genetic resources conserved for agricultural, industrial and pharmaceutical use. *Econ. Bot.* **51**: 251-263.
- 📖 **Mrabet, M., Mnasri, B., Ben Romdhane, S., Laguerre, G., Elarbi Aouani, M. & Mhamdi, R.** 2006. *Agrobacterium* strains isolated from root nodules of common bean specifically reduce nodulation by *Rhizobium gallicum*. *FEMS Microbiol. Ecol.* **56**: 304-309.
- 📖 **Mulder, L., Lefebvre, B., Cullimore, J. & Imberty, A.** 2006. LysM domains of *Medicago truncatula* NFP protein involved in Nod factor perception. Glycosylation state, molecular modeling and docking of chitoooligosaccharides and Nod factors. *Glycobiology* **16**: 801-809.

- 📖 **Murali, N.S. & Teramura, A.H.** 1985. Effects of ultraviolet-B irradiance on soybean. VI. Influence of phosphorus nutrition on growth and flavonoid content. *Physiol. Plant.* **63**: 413-416.
- 📖 **Mushrush, G.W., Wynne, J.H., Willauer, H.D. & Lloyd, C.L.** 2006. Soybean-derived biofuels and home heating fuels. *J. Environ. Sci. A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.* **41**: 2495-2502.
- 📖 **Nagata, S., Adachi, K. & Sano, H.** 1998. Intracellular changes in ions and organic solutes in halotolerant *Brevibacterium* sp. strain JMC6894 after exposure to hyperosmotic shock. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3641-3647.
- 📖 **Nair, S., Jha, P.K. & Babu, C.R.** 1993. Induced salt tolerant rhizobia from extremely salt tolerant *Rhizobium* gene pools, from reduced but effective symbiosis under non-saline growth. *Microbios* **74**: 39-51.
- 📖 **Newcomb, W.** 1976. A correlated light and electron microscopic study of symbiotic growth and differentiation in *Pistum sativum* root nodules. *Can. J. Bot.* **54**: 2163-2186.
- 📖 **Newcomb, W.** 1981. Nodule morphogenesis and differentiation. *Int. Rev. Cytol.* **13**: 247-298.
- 📖 **Newcomb, W., Callaham, D., Torrey, J.G. & Peterson, R.L.** 1979. Morphogenesis and fine structure of the actinomycetous endophyte of nitrogen-fixing root nodules of *Comptonia peregrina*. *Bot. Gaz.* **140**: 22-34.
- 📖 **Niwa, S., Kawaguchi, M., Imaizumi-Anraku, H., Chechetka, S., Ishizaka, M., Ikuta, A. & Kouchi, H.** 2001. Responses of a model legume *Lotus japonicus* to lipochitin oligosaccharide nodulation factors purified from *Mesorhizobium loti* JRL501. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **14**: 848-856.
- 📖 **Noel, T.C., Sheng, C., Yost, C.K., Pharis, R.P. & Hynes, M.F.** 1996. *Rhizobium leguminosarum* as a plant growth-promoting rhizobacterium: direct growth promotion of canola and lettuce. *Can. J. Microbiol.* **42**: 279-283.
- 📖 **Nogales, J., Campos, R., BenAbdelkhalek, H., Olivares, J., Lluch, C. & Sanjuán, J.** 2002. *Rhizobium tropici* genes involved in free-living salt tolerance are required for the establishment of efficient nitrogen-fixing symbiosis with *Phaseolus vulgaris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 225-232.
- 📖 **Novák, K., Lisá, L. & Škrdleta, V.** 2004. Rhizobial *nod* gene-inducing activity in pea nodulation mutants: dissociation of nodulation and flavonoid response. *Physiol. Plant.* **120**: 546-555.

- 📖 **O'Connor, K. & Csonka, L.N.** 2003. The high salt requirement of the moderate halophile *Chromobacterium salexigens* DSM3043 can be met not only by NaCl but by other ions. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6334-6336.
- 📖 **Oke, V. & Long, S.R.** 1999. Bacteroid formation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2**: 641-646.
- 📖 **Okon, Y., Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J.J.** 1998. Biotechnology of biofertilization and phytostimulation. En: *Agricultural Biotechnology*. Altman, A. (ed.), pp.: 327-349. Marcel Dekker, New York.
- 📖 **Oldroyd, G.E.D. & Downie, J.A.** 2004. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nature* **5**: 566-576.
- 📖 **Oliver, J.D.** 1993. Formation of viable but nonculturable cells. En: *Starvation in Bacteria*. Kjelleberg, S. (ed.), pp.: 239-272. Plenum, New York.
- 📖 **Oliver, J.D., Nilsson, L. & Kjelleberg, S.** 1991. Formation of nonculturable cells of *Vibrio vulnificus* and its relationship to the starvation state. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2640-2644.
- 📖 **Olsson, P.A., Chalot, M., Bååth, E., Finlay, R.D. & Söderström, B.** 1996. Ectomycorrhiza mycelium reduces bacterial activity in a sandy soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* **21**: 81-86.
- 📖 **Olsthoorn, M.A.M., Stokvis, E., Haverkamp, J., Spaink, H.P. & Thomas-Oates, J.E.** 2000. Growth temperature regulation of host-specific modifications of rhizobial lipo-chitin oligosaccharides: the function of *nodX* is temperature regulated. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 808-813.
- 📖 **Pace, N.** 1997. A molecular view of microbial diversity in the biosphere. *Science* **276**: 734-740.
- 📖 **Parmar, N. & Dadarwal, K.R.** 1999. Stimulation of nitrogen fixation and induction of flavonoid-like compounds by rhizobacteria. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 36-44.
- 📖 **Parniske, M., Ahlborn, B. & Werner, D.** 1991. Isoflavonoid-inducible resistance to the phytoalexin glyceollin in soybean rhizobia. *J. Bacteriol.* **173**: 3432-3439.
- 📖 **Parr, A.J. & Bolwell, G.P.** 2000. Phenols in the plant and in man: the potential for possible nutritional enhancement of the diet by modifying the phenols content or profile. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 985-1012.
- 📖 **Paul, E.A. & Clark, F.E.** 1988. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, San Diego.



- 📖 **Paulitz, T.C. & Bélanger, R.B.** 2001. Biological control in greenhouse systems. *Annu. Rev. Phytopathol.* **39**: 103-133.
- 📖 **Pearce, R.S.** 1999. Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regul.* **29**: 47-76.
- 📖 **Peña-Cabriales, J.J., Grageda-Cabrera, O.A., Kola, V. & Hardarson, G.** 1993. Time course and N<sub>2</sub> fixation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* **152**: 115-121.
- 📖 **Peoples, M.B. & Baldock, J.A.** 2001. Nitrogen dynamics of pastures: nitrogen fixation inputs, the impact of legumes on soil nitrogen fertility, and the contributions of fixed nitrogen to Australian farming systems. *Aust. J. Exp. Agric.* **41**: 327-346.
- 📖 **Perret, X., Staehelin, C. & Broughton, W.J.** 2000. Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 180-201.
- 📖 **Persello-Cartieaux, F., Nussaume, L. & Robaglia, C.** 2003. Tales from the underground: molecular plant–rhizobacteria interactions. *Plant Cell Environ.* **26**: 189-199.
- 📖 **Peterson, S.B., Dunn, A.K., Klimowicz, A.K. & Handelsman, J.** 2006. Peptidoglycan from *Bacillus cereus* mediates commensalism with rhizosphere bacteria from the *Cytophaga–Flavobacterium* group. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 5421-5427.
- 📖 **Phillips, D.A.** 1992. Flavonoids plant signal to soil microbes. *Recent Adv. Phytochem.* **26**: 201-231.
- 📖 **Phillips, D.A.** 2000. Biosynthesis and release of rhizobial nodulation gene inducers by legumes. En: *Prokaryotic Nitrogen Fixation: a Model System for the Analysis of a Biological Process*. Triplett, E.P. (ed.), pp.: 349-364. Horizon Scientific Press, Wymondham.
- 📖 **Phillips, D.A., Dakora, F.D., Sande, E., Joseph, C.M. & Zon, J.** 1994. Synthesis, release and transmission of alfalfa signals to rhizobial symbionts. *Plant Soil* **161**: 69-80.
- 📖 **Phillips, D.A., Joseph, C.M. & Maxwell, C.A.** 1992. Trigonelline and stachydrine released from alfalfa seeds activate NodD2-protein in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol.* **99**: 1526-1531.
- 📖 **Pichon, M., Journet, E.P., Dedieu, A., de Billy, F., Truchet, G. & Barker, D.G.** 1992. *Rhizobium meliloti* elicits transient expression of the early nodulin gene *ENOD12* in the differentiating root epidermis of transgenic alfalfa. *Plant Cell* **4**: 1199-1211.

- 📖 **Pierson, E.A. & Weller, D.M.** 1994. Use of mixtures of fluorescent *Pseudomonas* to suppress take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* **84**: 940-947.
- 📖 **Pieterse, C.M.J, van Pelt, J.A. & van Wees, S.C.M.** 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signalling and expression. *Eur. J. Plant Pathol.* **107**: 51-61.
- 📖 **Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., Hoffland, E., van Pelt, J.A. & van Loon, L.C.** 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell* **8**: 1225-1237.
- 📖 **Piha, M.I. & Munns, D.N.** 1987. Sensitivity of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) symbiosis to high soil temperature. *Plant Soil* **98**: 183-194.
- 📖 **Pinton, R., Varanini, Z. & Nannipieri, P.** 2001. The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, New York.
- 📖 **Plazinski, J. & Rolfe, B.G.** 1985. Influence of *Azospirillum* strains on the nodulation of clovers by *Rhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 984-989.
- 📖 **Plazinski, J., Innes, R.W. & Rolfe, B.G.** 1985. Expression of *Rhizobium trifolii* early nodulation genes on maize and rice plants. *J. Bacteriol.* **163**: 812-815.
- 📖 **Polenko, D.R., Scher, F.M., Kloepper, J.W., Singleton, C.A., Laliberte, M. & Zaleska, I.** 1987. Effects of root colonizing bacteria on nodulation of soybean roots by *Bradyrhizobium japonicum*. *Can. J. Microbiol.* **33**: 498-503.
- 📖 **Ponce, M.A., Scervino, J.M., Erra-Balsells, R., Ocampo, J.A. & Godeas, A.M.** 2004. Flavonoids from shoots and roots of *Trifolium repens* (white clover) grown in presence or absence of the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *Phytochemistry* **65**: 1925-1930.
- 📖 **Poolman, B., Spitzer, J.J. & Wood, J.M.** 2004. Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-proteins and protein-proteins interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**: 88-104.
- 📖 **Prell, J. & Poole, P.** 2006. Metabolic changes of rhizobia in legume nodules. *Trends Microbiol.* **14**: 161-168.
- 📖 **Press, C.M., Wilson, M., Tuzun, S. & Kloepper, J.W.** 1997. Salicylic acid produced by *Serratia marcescens* 90-166 is not the primary determinant of induced systemic resistance in cucumber or tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10**: 761-768.
- 📖 **Price, N.P.J., Relić, B., Talmont, F., Lewin, A., Promé, D., Pueppke, S.G., Maillet, F., Dénarié, J., Promé, J.C. & Broughton, W.J.** 1992. Broad-host-range

- Rhizobium* specie NGR234 secretes a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are *O*-acetylated or sulphated. *Mol. Microbiol.* **6**: 3575-3584.
- 📖 **Priever, U.B., Aurag, J., Boesten, B., Bouhmouch, I., Defez, R., Filali-Maltouf, A., Miklis, M., Moawad, H., Mouhsine, B., Prell, J., Schluter, A. & Senatore, B.** 2001. Characterization of *Phaseolus* symbionts isolated from Mediterranean soils and analysis of genetic factors related to pH tolerance. *J. Biotechnol.* **91**: 223-236.
- 📖 **Prikryl, Z. & Vancura, V.** 1980. Root exudates of plants VI. Wheat root exudation as dependent on growth, concentration gradient of exudates and the presence of bacteria. *Plant Soil* **57**: 69-83.
- 📖 **Probanza, A., Lucas, J.A., Acero, N. & Gutiérrez-Mañero, F.J.** 1996. The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. *Plant Soil* **182**: 59-66.
- 📖 **Radutoiu, S., Madsen, L.H., Madsen, E.B., Felle, H.H., Umehara, Y., Gronlund, M., Sato, S., Nakamura, Y., Tabata, S., Sandal, N. & Stougaard, J.** 2003. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor like kinases. *Nature* **425**: 585-592.
- 📖 **Rainey, P.B.** 1999. Adaptation of *Pseudomonas fluorescens* to the plant rhizosphere. *Environ. Microbiol.* **1**: 243-257.
- 📖 **Ramamoorthy, V., Viswanathan, T., Raguchander, T., Prakasam, V. & Samiyappan, R.** 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop Prot.* **20**: 1-11.
- 📖 **Rao, J.R. & Cooper, J.E.** 1995. Soybean nodulating rhizobia modify *nod* gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 855-862.
- 📖 **Raupach, G.S. & Kloepper, J.W.** 1998. Mixtures of plant growth promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* **88**: 1158- 1164.
- 📖 **Raymond, J., Siefert, J.L., Staples, C.R. & Blankenship, R.E.** 2004. The natural history of nitrogen fixation. *Mol. Biol. Evol.* **21**: 541-554.
- 📖 **Recourt, K., Schripsema, J., Kijne, J.W., van Brussel, A.A.N. & Lugtenberg, B.J.J.** 1991. Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavonones and chalcones. *Plant Mol. Biol.* **16**: 841-852.
- 📖 **Recourt, K., van Tune, A.J., Mur, L.A., van Brussel, A.A.N., Lugtenberg, B.J.J. & Kijne, J.W.** 1992. Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa*

- subsp. *nigra* by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Mol. Biol.* **19**: 411-420.
- 📖 **Relić, B., Talmont, F., Kopcinska, J., Golinowsky, W., Promé, J.C. & Broughton, W.J.** 1993. Biological activity of *Rhizobium* sp. NGR234 Nod factors on *Macroptilium atropurpureum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6**: 764-774.
- 📖 **Rengasamy, P.** 2006. World salinization with emphasis on Australia. *J. Exp. Bot.* **57**: 1017-1023.
- 📖 **Ricillo, P.M., Muglia, C.I., de Bruijn, F.J., Roe, A.J., Booth, I.R. & Aguilar, O.M.** 2000. Glutathione is involved in environmental stress responses in *Rhizobium tropici*, including acid tolerance. *J. Bacteriol.* **182**: 1748-1753.
- 📖 **Richardson, A.E., Djordjevic, M.A., Rolfe, B.G. & Simpson, R.J.** 1988. Effects of pH, Ca and Al on the exudation from clover seedlings of compounds that induce the expression of nodulation genes in *Rhizobium trifolii*. *Plant Soil* **109**: 37-47.
- 📖 **Riely, B.K., Ané, J.M., Penmetsa, R.V. & Cook, D.R.** 2004. Genetic and genomic analysis in model legumes bring Nod-factor signalling to center stage. *Curr. Opin. Plant Biol.* **7**: 1-6.
- 📖 **Rigaud, J. & Puppo, A.** 1975. Indole-3-acetic acid catabolism by soybean bacteroids. *J. Gen. Bacteriol.* **88**: 223-228.
- 📖 **Ríos, J.J., Gil, M.J. & Gutiérrez-Rosales, F.** 2005. Solid-phase extraction gas chromatography-ion trap-mass spectrometry qualitative method for evaluation of phenolic compounds in virgin olive oil and structural confirmation of oleuropein and ligstroside aglycons and their oxidation products. *J. Chromatogr.* **1093**: 167-176.
- 📖 **Rodelas, B., González-López, J., Martínez-Toledo, M.V., Pozo, C. & Salmerón, V.** 1999. Influence of *Rhizobium/Azotobacter* and *Rhizobium/Azospirillum* combined inoculation on mineral composition of faba bean (*Vicia faba* L.). *Biol. Fertil. Soils* **29**: 165-169.
- 📖 **Rodríguez-Navarro, D.N., Bellogín, R., Camacho, M., Daza, A., Medina, C., Ollero, F.J., Santamaría, C., Ruíz-Saíenz, J.E., Vinardell, J.M. & Temprano, F.J.** 2003. Field assessment and genetic stability of *Sinorhizobium fredii* strain SMH12 for commercial soybean inoculants. *Europ. J. Agronomy* **19**: 299-309.
- 📖 **Rodríguez-Navarro, D.N., Buendía, A.M., Camacho, M., Lucas, M.M. & Santamaría, C.** 2000. Characterization of *Rhizobium spp.* bean isolates from south-west Spain. *Soil Biol. Biochem.* **32**: 1601-1613.
- 📖 **Röhrig, H., Schmidt, J., Wieneke, U., Kondorosi, E. & Barlier, I.** 1994. Biosynthesis of lipooligosaccharide nodulation factors: *Rhizobium* NodA protein is

- involved in *N*-acylation of the chitooligosaccharide backbone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 3122-3126.
- 📖 **Rojas, A., Holguin, G., Glick, B.R. & Bashan, Y.** 2001. Synergism between *Phyllobacterium* sp. (N<sub>2</sub>-fixer) and *Bacillus licheniformis* (P-solubilizer), both from a semiarid mangrove rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 181-187.
- 📖 **Roszak, D.B. & Colwell, R.R.** 1987. Survival strategies of bacteria in the natural environment. *Microbiol. Rev.* **51**: 365-379
- 📖 **Roth, L.E., Jeon, K. & Stacey, G.** 1988. Homology in endosymbiotic system: the term symbiosome. En: *Molecular Genetics of Plant-Microbe Interactions*. Palacios, R., & Verma, D.P.S. (eds.), pp.: 220-225. American Phytopathological Society Press, St. Paul.
- 📖 **Ruíz-Lozano, J.M. & Bonfante, P.** 2001. Intracellular *Burkholderia* strain has no negative effect on the symbiotic efficiency of the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora margarita*. *Plant Growth Regul.* **34**: 347-352.
- 📖 **Saadallah, K., Abdelly, C., Lachaal, M., Soltani, A. & Hajji, M.** 1998. Effects of N source and P nutrition on the limitation by NaCl of the common bean growth (*Phaseolus vulgaris*). En: *Biological Nitrogen Fixation for the 21st Century*. Elmerich, C., Kondorosi, A. & Newton, W.E. (eds.), p.: 515. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 📖 **Saadallah, K., Drevon, J-J., Hajji, M. & Abdelly, C.** 2001a. Genotypic variability for tolerance to salinity of N<sub>2</sub>-fixing common bean (*Phaseolus vulgaris*). *Agronomie* **21**: 675-682.
- 📖 **Saadallah, K., Drevon, J-J. & Abdelly, C.** 2001b. Nodulation and growth of nodules in the common bean (*Phaseolus vulgaris*) under salt stress. *Agronomie* **21**: 627-634.
- 📖 **Sadowsky, M.J., Cregan, P.B. & Keyser, H.H.** 1988. Nodulation and nitrogen fixation efficacy of *Rhizobium fredii* with *Phaseolus vulgaris* genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1907-1910.
- 📖 **Safronova, V.I., Stepanok, V.V., Engqvist, G.L., Alekseyev, Y.V. & Belimov, A.A.** 2006. Root-associated bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase improve growth and nutrient uptake by pea genotypes cultivated in cadmium supplemented soil. *Biol. Fertil. Soils* **42**: 267-272.
- 📖 **SAGARPA.** 2003. Producción y comercialización de frijol 1993-1999. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, México.

- Sanjuán, J., Carlson, R.W., Spaink, H.P., Ramadas Bhat, U., Mark Barbour, W., Glusha, J. & Stacey, G. 1992. A 2-*O*-methylfucose moiety is present in the lipooligosaccharide nodulation signal of *Bradyrhizobium japonicum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 8789-8793.
- Sawada, H., Kuykendall, L.D. & Young, J.M. 2003. Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**: 155-179.
- Scheidemann, P. & Wetzel, A. 1997. Identification and characterization of flavonoids in the root exudate of *Robinia pseudoacacia*. *Trees* **11**: 316-321.
- Schell, M.A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
- Scher, F.M. & Baker, R. 1982. Effect of *Pseudomonas putida* and a synthetic iron chelator on induction of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt pathogens. *Phytopathology* **72**: 1567-1573.
- Scheres, B., van de Wiel, C., Zalensky, A., Horvath, B., Spaink, H., van Eck, H., Zwartkruis, F., Wolters, A.M., Gloudemans, T., van Kammen, A. & Bisseling, T. 1990. The *ENOD12* gene product is involved in the infection process during the pea-*Rhizobium* interaction. *Cell* **60**: 281-294.
- Schisler, D.A., Slininger, P.J. & Bothast, R.J. 1997. Effects of antagonist cell concentration and two-strain mixtures on biological control of *Fusarium* dry rot of potatoes. *Phytopathology* **87**: 177-183.
- Schlaman, H.R.M., Horvath, B., Vijgenboom, E., Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J. 1991. Suppression of nodulation gene expression in bacteroids of *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *J. Bacteriol.* **173**: 4277-4287.
- Schlaman, H.R.M., Olsthoorn, M.M.A., Hartevelde, M., Dörner, L., Djordjevic, M.A., Thomas-Oates, J.E. & Spaink, H.P. 2006. The production of species-specific highly unsaturated fatty acyl-containing LCOs from *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* is stringently regulated by *nodD* and involves the *nodRL* genes. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **19**: 215-226.
- Schlaman, H.R.M., Phillips, D.A. & Kondorosi, E. 1998. Genetic organization and transcriptional regulation of rhizobial nodulation genes. En: *The Rhizobiaceae, The Molecular Biology of Model Plant Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, H.J.J. (eds.), pp.: 371-380. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Schmidt, J., Paniske, M. & Werner, D. 1992. Production of phytoalexin glyceollin I by soybean roots in response to symbiotic pathogenic infection. *Bot. Acta* **105**: 18-25.

- 📖 Schmidt, J.S., Harper, J.E., Hoffman, T.K. & Bent, A.F. 1999. Regulation of soybean nodulation independent of ethylene signaling. *Plant Physiol.* **119**: 951-959.
- 📖 Schultze, M., Kondorosi, E., Ratet, P., Buiré, M. & Kondorosi, A. 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium*-plant interactions. *Int. Rev. Cytol.* **156**: 1-75.
- 📖 Schultze, M., Quiclet-Sire, B., Kondorosi, E., Virelizier, H., Glushka, J.N., Endre, G., Géro, S.D. & Kondorosi, A. 1992. *Rhizobium meliloti* produces a family of sulphated lipooligosaccharides exhibiting different degrees of plant host specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**: 192-196.
- 📖 Segovia, L., Piñero, D., Palacios, R. & Martínez-Romero, E. 1991. Genetic structure of a soil population of non symbiotic *Rhizobium leguminosarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 426-433.
- 📖 Segovia, L., Young, J.P.W. & Martínez-Romero, E. 1993. Reclassification of American *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli type I strains as *Rhizobium etli* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* **43**: 374-377.
- 📖 Serraj, R., Roy, G. & Drevon, J.J. 1994. Salt stress induces a decrease in the oxygen uptake of soybean nodules and in their conductance to oxygen diffusion. *Physiol. Plant.* **91**: 161-168.
- 📖 Shaharoon, B., Arshad, M. & Zahir, Z.A. 2006. Effect of plant growth promoting rhizobacteria containing ACC-deaminase on maize (*Zea mays* L.) growth under axenic conditions and on nodulation in mung bean (*Vigna radiata* L.). *Lett. Appl. Microbiol.* **42**: 155-159.
- 📖 Shamseldin, A. & Werner, D. 2004. Selection of competitive strains of *Rhizobium* nodulating *Phaseolus vulgaris* and adapted to environmental conditions in Egypt, using the gus-reporter gene technique. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 377-382.
- 📖 Shaw, L.J., Morris, P. & Hooker, J.E. 2006. Perception and modification of plant flavonoid signals by rhizosphere microorganisms. *Environ. Microbiol.* **8**: 1867-1880.
- 📖 Shibata, S., Misui, H. & Kouchi, H. 2005. Acetylation of a fucosyl residue at the reducing end of *Mesorhizobium loti* Nod factors is not essential for nodulation of *Lotus japonicus*. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1016-1020.
- 📖 Shivprasad, S. & Page, W.J. 1989. Catechol formation and melanization by Na<sup>+</sup>-dependent *Azotobacter chroococcum*: a protective mechanism for aerodaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1811-1817.
- 📖 Sieberer, B. & Emons, A.M.C. 2000. Cytoarchitecture and pattern of cytoplasmic streaming in root hairs of *Medicago truncatula* during development and deformation by nodulation factors. *Protoplasma* **214**: 118-127.

- 📖 **Sieberer, B.J., Timmers, A.C.J., Lhuissier, F.G.P. & Emons, A.M.C.** 2002. Endoplasmic microtubules configure the subapical cytoplasm and are required for fast growth of *Medicago truncatula* root hairs. *Plant Physiol.* **130**: 977-988.
- 📖 **Simpson, F.B. & Burris, R.H.** 1984. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science* **8**: 1095-1097.
- 📖 **Singh, C.S. & Subba Rao, N.S.** 1979. Associative effect of *Azospirillum brasilense* with *Rhizobium japonicum* on nodulation and yield of soybean (*Glycine max*). *Plant Soil* **53**: 387-392.
- 📖 **Singh, K.N & Chatrath, R.** 2001. Distribution of Saline Soils. En: *Application of Physiology in Wheat Breeding*. Reynolds, M.P., Ortiz-Monasterio, J.I. & McNab, A. (eds.), pp.:101-110. CIMMYT, México D.F..
- 📖 **Singh, P.P., Shin, Y.C., Park, C.S. & Chung, Y.R.** 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. *Phytopathology* **89**: 92-99.
- 📖 **Singleton, P.W., El Swaifi, S.A. & Bohlool, B.B.** 1982. Effect of salinity on *Rhizobium* growth and survival. *Appl. Environ. Microbiol.* **444**: 884-890.
- 📖 **Smit, G., Kijne, J.W. & Lugtenberg, B.J.J.** 1989. Roles of flagella, lipopolysaccharide, and a Ca<sup>2+</sup>-dependent cell surface protein in attachment of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae to pea root hair tips. *J. Bacteriol.* **171**: 569-572.
- 📖 **Smith, D.L. & Fedoroff, N.V.** 1995. LRP1, a gene expressed in lateral and adventitious root primordium of *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**: 735-745.
- 📖 **Somers, E., Vanderleyden, J. & Srinivasan, M.** 2004. Rhizosphere bacterial signalling: a love parade beneath our feet. *Crit. Rev. Microbiol.* **30**: 205-240.
- 📖 **Soria, M.A., Pagliero, F.E., Correa, O.S., Kerber, N.L. & García, A.F.** 2006. Tolerance of *Bradyrhizobium japonicum* E109 to osmotic stress and the stability of liquid inoculants depend on growth phase. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 1235-1241.
- 📖 **Soria-Díaz, M.E., Tejero-Mateo, P., Espartero, J.L., Rodríguez-Carvajal, M.A., Morón, B., Sousa, C., Megías, M., Amarger, N., Thomas-Oates, J. & Gil-Serrano, A.M.** 2003. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium giardinii* H152. *Carbohydr. Res.* **338**: 237-250.
- 📖 **Soto, M.J., Sanjuán, J. & Olivares, J.** 2006. Rhizobia and plant-pathogenic bacteria: common infection weapons. *Microbiology* **152**: 3167-3174.



- 📖 **Sousa, C., Folch, J.L., Boloix, P., Megías, M., Nava, N. & Quinto, C.** 1993. A *Rhizobium tropici* DNA region carrying the amino-terminal half of a *nodD* gene and a *nod*-box-like sequence confers host range extension. *Mol. Microbiol.* **9**: 1157-1168.
- 📖 **Sousa, C., Johansson, C., Charon, C., Manyani, H., Sautter, C., Kondorosi, A. & Crespi, M.** 2001. Translational and structural requirements of the early nodulin gene *enod40*, a short-open reading frame containing RNA, for elicitation of a cell-specific growth response in the alfalfa root cortex. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 354-366
- 📖 **Spaink, H.P.** 1996. Regulation of plant morphogenesis by lipo-chitin oligosaccharides. *Crit. Rev. Plant Sci.* **15**: 559-582.
- 📖 **Spaink, H.P.** 2000. Root nodulation and infection factors produced by rhizobial bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 257-288.
- 📖 **Spaink, H.P., Aarts, A., Stacey, G., Bloemberg, G.V., Lugtenberg, B.J.J. & Kennedy, E.P.** 1992. Detection and separation of *Rhizobium* and *Bradyrhizobium* Nod metabolites using thin-layer chromatography. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **5**: 72-80.
- 📖 **Spaink, H.P., Sheeley, D.M., van Brussel, A.A.N., Glushka, J., York, W.S., Tak, T., Geiger, O., Kennedy, E.P., Reinhold, V.N. & Lugtenberg, B.J.J.** 1991. A novel highly unsaturated fatty acid moiety of lipo-oligosaccharide signals determinates host specificity of *Rhizobium*. *Nature* **354**: 125-130.
- 📖 **Spaink, H.P., Wijffelman, C.A., Pees, E., Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J.** 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**: 337-340.
- 📖 **Sprent, J.** 2001. Nodulation in legumes. Royal Botanic Gardens, Kew.
- 📖 **Stacey, G.** 1995. The *Bradyrhizobium japonicum*-soybean symbiosis: Can basic research findings be used for practical benefit? En: *Microbiologia do Solo: Desafios para o Século XXI*. Hungría, M., Balota, E.L., Colozzi-Filho, A. & Andrade, D.S. (eds.), p.: 3450. EMBRAPA-CNPS, Londrina.
- 📖 **Stahelin, C., Granado, J., Müller, J., Wicken, A., Mellor, R.B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W.J. & Boller, T.** 1994a. Perception of *Rhizobium* nodulations factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**: 2196-2200.
- 📖 **Stahelin, C., Schultze, M., Kondorosi, E., Mellor, R.B., Boller, T. & Kondorosi, A.** 1994b. Structural modifications in *Rhizobium meliloti* Nod factors influence their stability against hydrolysis by root chitinases. *Plant J.* **5**: 319-330.

- 📖 **Stahelin, C., Schultze, M., Tokuyasu, K., Poinso, V., Promé, J.C., Kondorosi, E. & Kondorosi, A.** 2000. N-deacetylation of *Sinorhizobium meliloti* Nod factors increases their stability in the *Medicago sativa* rhizosphere and decreases their biological activity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 72-79.
- 📖 **Stahelin, C., Vanney, M., Foucher, F., Kondorosi, E., Schultze, M. & Kondorosi, A.** 1997. Degradation of nodulation signals from *Rhizobium meliloti* by its host plants. En: *Biological Fixation of Nitrogen for Ecology and Sustainable Agriculture*. Legocki, A., Bothe, H. & Pühler, A. (eds.), pp.: 43-46. Springer, Berlin.
- 📖 **Steele, H.L., Werner, D. & Cooper, J.E.** 1999. Flavonoids in seed and root exudates of *Lotus pedunculatus* and their biotransformation by *Mesorhizobium loti*. *Physiol. Plant.* **107**: 251-258.
- 📖 **Stephens, P.M., Crowley, J.J. & O'Connell, C.** 1993. Selection of *Pseudomonas* strains inhibiting *Pythium ultimum* on sugarbeet seeds in soil. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 1283-1288.
- 📖 **Straub, P.F., Shearer, G., Reynolds, P.H.S., Sawyer, S.A. & Kohl, D.** 1997. Effect of disabling bacteroid proline catabolism on the response of soybean to repeated drought stress. *J. Exp. Bot.* **48**: 1299-1307.
- 📖 **Subba Rao, G.V., Johansen, C., Kumar Rao, K. & Jana, M.K.** 1990. Response of the pigeonpea-*Rhizobium* symbiosis to salinity stress: variation among *Rhizobium* strains in symbiotic ability. *Biol. Fertil. Soils* **9**: 49-53.
- 📖 **Subba Rao, N.S.** 1982. Phosphate solubilization by soil microorganisms. En: *Advances in Agricultural Microbiology*. Subba Rao, N.S. (ed.), pp.: 225-303. Adv. Agric. Microbiol. Oxford and IBH Publ. Co., New Delhi.
- 📖 **Sukhovitskaya, L.A., Safronova, G.V., Klyshko, G.M. & Korolenok, N.V.** 2002. Survival of *Rhizobium* in a monoculture and binary population with rhizosphere bacteria. *Appl. Biochem. Microbiol.* **38**: 62-67.
- 📖 **Surange, S., Wollum, A.G., Kumar, N. & Nautiyal, S.C.** 1997. Characterization of *Rhizobium* from root nodules of leguminous trees growing in alkaline soils. *Can. J. Microbiol.* **43**: 891-894.
- 📖 **Swift, S.J., Throup, P., Williams, P., Salmond, G.P. & Steward, G.S.** 1996. Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem. Sci.* **21**: 214-219.
- 📖 **Taiz, L. & Zeiger, E.** 1991. Plant Physiology. Benjamin/Cummings Pub., Redwood City.

- 📖 **Tarrand, J.J., Krieg, N.R. & Döbereiner, J.** 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with the description of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **24**: 967-980.
- 📖 **Tejera, N.A., Campos, R., Sanjuán, J. & Lluch, C.** 2004. Nitrogenase and antioxidant enzyme activities in *Phaseolus vulgaris* nodules formed by *Rhizobium tropici* isogenic strains with varying tolerance to salt stress. *J. Plant Physiol.* **161**: 329-338.
- 📖 **Tejera, N.A., Campos, R., Sanjuán, J. & Lluch, C.** 2005. Effect of inoculation with *Rhizobium tropici* isogenic strains on growth, nutrient accumulation and nitrogen fixation of common bean plants. *J. Plant Nutr.* **28**: 1907-1921.
- 📖 **Teplitski, M., Robinson, J.B. & Bauer, W.D.** 2000. Plants secrete substances that mimic bacterial *N*-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **13**: 637-648.
- 📖 **Terouchi, N. & Syono, K.** 1990. *Rhizobium* attachment and curling in asparagus, rice and oat plants. *Plant Cell Physiol.* **31**: 119-127.
- 📖 **Thorne, S.H. & Williams, H.D.** 1999. Cell density-dependent starvation survival of *Rhizobium leguminosarum* bv. phaseoli: identification of the role of an *N*-acyl homoserine lactone in adaptation to stationary-phase survival. *J. Bacteriol.* **181**: 981-990.
- 📖 **Tilak, K.V.B.R., Ranganayaki, N. & Manoharachari, C.** 2006. Synergistic effects of plant-growth promoting rhizobacteria and *Rhizobium* on nodulation and nitrogen fixation by pigeonpea (*Cajanus cajan*). *Eur. J. Soil Sci.* **57**: 67-71.
- 📖 **Tilman, D.** 1999. Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**: 5995-6000.
- 📖 **Tirichine, L., Imaizumi-Anraku, H., Yoshida, S., Murakami, Y., Madsen, L.H., Miwa, H., Nakagawa, T., Sandal, N., Albrektsen, A.S., Kawaguchi, M., Downie, A., Sato, S., Tabata, S., Kouchi, H., Parniske, M., Kawasaki, S. & Stougaard, J.** 2006. Desregulation of a  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent kinase leads to spontaneous nodule development. *Nature* **44**: 1153-1156.
- 📖 **Toyoda, H. & Utsumi, R.** 1991. Method for the prevention of *Fusarium* diseases and microorganisms used for the same. Patente n° 4.988.586. U.S.A..

- 📖 **Traore, O., Groleau-Renaud, V., Plantureux, S., Tubeileh, A. & Boeufremlay, V.** 2000. Effect of root mucilage and modelled root exudates on soil structure. *Eur. J. Soil Sci.* **51**: 575-581.
- 📖 **Treutter, D.** 2006. Significance of flavonoids in plant resistance: a review. *Environ. Chem. Lett.* **4**: 147-157.
- 📖 **Trinick, M.J. & Hadobas, P.A.** 1995. Formation of nodular structures on the non-legumes *Brassica napus*, *B. campestris*, *B. juncea* and *Arabidopsis thaliana* with *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* isolated from *Parasponia* spp. or legumes grown in tropical soils. *Plant Soil* **172**: 207-219.
- 📖 **Truchet, G., Roche, P., Lerouge, P., Vasse, J., Camut, S., de Billy, F., Promé, J.C. & Dénarié, J.** 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673.
- 📖 **Tu, J.C.** 1981. Effect of salinity on *Rhizobium*-root-hair interaction, nodulation and growth of soybean. *Can. J. Plant Sci.* **61**: 231-239.
- 📖 **Udvardi, M.K. & Day, D.A.** 1997. Metabolite transport across symbiotic membranes of legume nodules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**: 493-523.
- 📖 **Ueda, A., Kathiresan, A., Inada, M., Narita, Y., Nakamura, T., Shi, W., Takabe, T. & Bennerr, J.** 2004. Osmotic stress in barley regulates expression of a different set of genes than salt stress does. *J. Exp. Bot.* **55**: 2213-2218.
- 📖 **Valdés, M., Reza-Aleman, F. & Furlan, V.M.** 1993. Response of *Leucaena esculenta* to endomycorrhizae and *Rhizobium* inoculation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 97-99.
- 📖 **van Brussel, A.A.N., Bakhuizen, R., van Spronsen, P.C., Spaink, H., Tak, T., Lugtenberg, B.J.J. & Kijne, J.W.** 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. *Science* **257**: 70-72.
- 📖 **van Brussel, A.A.N., Planqué, K. & Quispel, A.** 1977. The wall of *Rhizobium leguminosarum* in bacteroid and free-living forms. *J. Gen. Microbiol.* **101**: 51-56.
- 📖 **van Brussel, A.A.N., Recourt, K., Pees, E., Spaink, H., Tak, T., Wijffelman, C.A., Kijne, J.W. & Lugtenberg, B.J.J.** 1990. A biovar-specific signal of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* induces increased nodulation gene-inducing activity in root exudates of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *J. Bacteriol.* **172**: 5394-5401.
- 📖 **van Brussel, A.A.N., Tak, T., Boot, K.J. & Kijne, J.W.** 2002. Autoregulation of root nodule formation: signals of both symbiotic partners studied in a split-root system of *Vicia sativa* subsp. *nigra*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **15**: 341-349.









- 📖 **van Brussel, A.A.N., Tak, T., Wetselaar, A., Pees, E. & Wijffelman, C.A.** 1982. Small leguminosae as test plants for nodulation of *Rhizobium leguminosarum* and other rhizobia and *Agrobacterium* harbouring a *leguminosarum* plasmid. *Plant Sci. Lett.* **27**: 317-325.
- 📖 **van Brussel, A.A.N., Zaat, S.A., Cremers, H.C., Wijffelman, C.A., Pees, E., Tak, T. & Lugtenberg, B.J.J.** 1986. Role of plant root exudate and Sym plasmid-localized nodulation genes in the synthesis by *Rhizobium leguminosarum* of Tsr factor, which causes thick and short roots on common vetch. *J. Bacteriol.* **165**: 517-522.
- 📖 **van der Heide, T., Stuart, M.C.A. & Poolman, B.** 2001. On the osmotic signal and osmosensing mechanism of an ABC transport system for glycine betaine. *EMBO J.* **24**: 7022-7032.
- 📖 **van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M. & Pieterse C.M.J.** 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* **36**: 453-483.
- 📖 **van Rhijn, P. & Vanderleyden, J.** 1995. The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol. Rev.* **59**: 124-142.
- 📖 **van Rhijn, P., Desair, J., Vlassak, K. & Vanderleyden, J.** 1994. Functional analysis of *nodD* genes of *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **7**: 666-677.
- 📖 **van Spronsen, P.C., van Brussel, A.A.N. & Kijne, J.W.** 1995. Nod factors produced by *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae induce ethylene-related changes in root cortical cells of *Vicia sativa* ssp. nigra. *Eur. J. Cell Biol.* **68**: 463-469.
- 📖 **van Veen, J.A., van Overbeek, L.S. & van Elsas, J.D.** 1997. Fate and activity of microorganisms introduced into soil. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 121-135.
- 📖 **Vance, C.P.** 1998. Legume symbiotic nitrogen fixation: agronomic aspects. En: *The Rhizobiaceae, The Molecular Biology of Model Plant Associated Bacteria*. Spaink, H.P., Kondorosi, A. & Hooykaas, P.J.J. (eds.), pp.: 509-530. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- 📖 **Vance, C.P.** 2002. Root-bacteria interactions: symbiotic nitrogen fixation. En: *Plant roots: The Hidden Half*. Waisel, Y., Eshel, A. & Kafkati, U. (eds.), pp.: 839-867. Marcel Dekker Publishers, New York.
- 📖 **Vance, C.P., Graham, P.H. & Allan, D.L.** 2000. Biological nitrogen fixation. Phosphorus: a critical future need. En: *Nitrogen Fixation: From Molecules to Crop Productivity*. Pedrosa, F.O., Hungria, M., Yates, M.G. & Newton, W.E. (eds.), pp.: 506-514. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

- 📖 **Vandenbergh, P.A. & González, C.F.** 1984. Method for protecting the growth of plants employing mutant siderophore producing strains of *Pseudomonas putida*. N° Patente n° 4.479.936. U.S.A..
- 📖 **Vargas, C., Martínez, L.J., Megías, M. & Quinto, C.** 1990. Identification and cloning of nodulation genes and host specificity determinants of the broad host-range *Rhizobium leguminosarum* biovar phaseoli strain CIAT899. *Mol. Microbiol.* **4**: 1899-1910.
- 📖 **Vázquez, P., Holguin, G., Puente, M.E., López-Cortes, A. & Bashan, Y.** 2000. Phosphate solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of mangroves in a semiarid coastal Lagoon. *Biol. Fertil. Soils* **30**: 460-468.
- 📖 **Velagaleti, R.R., Marsh, S. & Kramer, D.** 1990. Genotypic differences in growth and nitrogen fixation among soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars grown under salt stress. *Trop. Agric.* **67**: 169-177.
- 📖 **Velázquez, E., Martínez-Romero, E., Rodríguez-Navarro, D.N., Trujillo, M.E., Daza, A., Mateos, P.F., Martínez-Molina, E. & van Berkum, P.** 2001. Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1008-1010.
- 📖 **Vessey, K.V.** 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255**: 571-586.
- 📖 **Vivas, A., Marulanda, A., Ruíz-Lozana, J.M., Barea, J.M. & Azcón, R.** 2003. Influence of a *Bacillus* sp. on physiological activities of two arbuscular mycorrhizal fungi and on plant responses to PEG-induced drought stress. *Mycorrhiza* **13**: 249-256.
- 📖 **Vlassak, K., Vanderleyden, J. & Franco, A.** 1996. Competition and persistence of *Rhizobium tropici* and *Rhizobium etli* in tropical soil during successive bean (*Phaseolus vulgaris* L.) cultures. *Biol. Fertil. Soils* **21**: 61-68.
- 📖 **Voisard, C., Keel, C., Haas, D. & Voisard, G.V.** 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. *EMBO J.* **8**: 351-358.
- 📖 **Waelkens, F., Voets, T., Vlassak, K., Vanderleyden, J. & van Rhijn, P.** 1995. The *nodS* gene of *Rhizobium tropici* CIAT899 is necessary for nodulation on *Phaseolus vulgaris* and on *Leucaena leucocephala*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **8**: 147-154.
- 📖 **Wais, R.J., Galera, C., Oldroyd, G., Catoira, R., Varma Penmetsa, R., Cook, D., Gough, C., Dénarié, J. & Long, S.R.** 2000. Genetic analysis of calcium spiking

- responses in nodulation mutants of *Medicago truncatula*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 13407-13412.
- 📖 **Wais, R.J., Keating, D.H. & Long, S.R.** 2002. Structure-function analysis of Nod factor-induced root hair calcium spiking in *Rhizobium*-legume symbiosis. *Plant Physiol.* **129**: 211-224.
- 📖 **Wakelin, S.A. & Ryder, M.H.** 2004. Plant growth-promoting inoculants in Australian agriculture. On line. *Crop Management* doi:10.1094/CM-2004-0301-01-RV.
- 📖 **Walia, H., Wilson, C., Condamine, P., Liu, X., Ismail, A.M., Zeng, L., Wanamaker, S.I., Mandal, J., Xu, J., Cui, X. & Close, T.J.** 2005. Comparative transcriptional profiling of two contrasting rice genotypes under salinity stress during the vegetative growth stage. *Plant Physiol.* **139**: 822-835.
- 📖 **Walker, T.S., Bais, H.P., Grotewold, E. & Vivanco, J.M.** 2003. Root exudation and rhizosphere biology. *Plant Physiol.* **132**: 44-51.
- 📖 **Wang, T.L., Wood, E.A. & Brewin, N.J.** 1982. Growth regulators, *Rhizobium* and nodulation in peas. *Planta* **155**: 343-349.
- 📖 **Wankhade, S., Apte, S.K. & Rao, K.K.** 1996. Salinity and osmotic stress-regulated proteins in cowpea *Rhizobium* 4a (peanut isolate). *Biochem. Biol. Mol. Int.* **39**: 621-628.
- 📖 **Waschkies, C., Schropp, A. & Marschner, H.** 1994. Relations between grapevine replant disease and root colonization of grapevine (*Vitis* sp.) by fluorescent pseudomonas and endomycorrhizal fungi. *Plant Soil* **162**: 219-227.
- 📖 **Watt, M., McCully, M.E. & Jeffree, C.E.** 1993. Plant and bacterial mucilages of the maize rhizosphere-comparison of their soil binding properties and histochemistry in a model system. *Plant Soil* **151**: 151-165.
- 📖 **Weber, H., Polen, T., Heuveling, J., Wendisch, V.F. & Hengge, R.** 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*:  $\sigma^S$ -dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J. Bacteriol.* **187**: 1591-1603.
- 📖 **Weichart, D.H.** 1999. Stability and survival of VBNC cells-conceptual and practical implications. En: *Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Bell, C.R., Brylinsky, M. & Johnson-Green, P. (eds.), pp.: 731-736. Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax.
- 📖 **Weir, B.S.** 2006. *The current taxonomy of rhizobia*. New Zealand rhizobia website. <http://www.rhizobia.co.nz/taxonomy/rhizobia.html>. Last updated: December, 2006.

- 📖 **Weis, E. & Bery, J.A.** 1988. Plants and high temperature stress. *Sym. Soc. Exp. Biol.* **42**: 329-346.
- 📖 **Weller, D.M. & Thomashow, L.S.** 1994. Current challenges in introducing beneficial microorganisms into the rhizosphere. En: *Molecular Ecology of Rhizosphere Microorganisms: Biotechnology and the Release of GMO's*. O'Gara, D., Dowling, N. & Boesten, B. (eds.), pp.: 1-18. VCH publishers, Weinheim.
- 📖 **Werner, D.** 1992. Symbiosis of Plants and Microbes. Chapman and Hall, University Press, Cambridge.
- 📖 **Whipps, J.M.** 1990. Carbon economy. En: *The Rhizosphere*. Lynch, J.M. (ed.), pp.: 59-97. John Wiley and sons, Chichester.
- 📖 **Whipps, J.M.** 2001. Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* **52**: 487-511.
- 📖 **Wiehe, W. & Höflich, G.** 1995a. Establishment of plant growth promoting bacteria in the rhizosphere of subsequent plants after harvest of the inoculated precrops. *Microbiol. Res.* **150**: 331-336.
- 📖 **Wiehe, W. & Höflich, G.** 1995b. Survival of plant growth promoting rhizosphere bacteria in the rhizosphere of different crops and migration to non-inoculated plants under field conditions in north-east Germany. *Microbiol. Res.* **150**: 201-206.
- 📖 **Wood, J.** 1999. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* **63**: 230-262.
- 📖 **Wood, M., Cooper, J.E. & Holding, A.J.** 1984. Soil acidity factors and nodulation of *Trifolium repens*. *Plant Soil* **78**: 367-380.
- 📖 **Yamaguchi, T. & Blumwald, E.** 2005. Developing salt-tolerant crop plants: challenges and opportunities. *Trends Plant Sci.* **10**: 615-620.
- 📖 **Yelton, M.M., Yang, S.S., Edie, S.A. & Lim, S.T.** 1983. Characterization of an effective salt-tolerant, fast growing strain of *Rhizobium japonicum*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1537-1547.
- 📖 **Yilmaz, Y. & Toledo, R.T.** 2004. Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends Food Sci. Technol.* **15**: 422-433.
- 📖 **Zaady, E., Perevolotsky, A. & Okon, Y.** 1993. Promotion of plant growth by inoculum with aggregated and single cell suspensions of *Azospirillum brasilense* Cd. *Soil Biol. Biochem.* **25**: 819-823.
- 📖 **Zaat, S.A., Wiffjelman, C.A., Spaink, H.P., van Brussel, A.A.N., Okker, R.J.H. & Lugtenberg, B.J.J.** 1987. Induction of the *nodA* promoter of *Rhizobium*



- leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI by plant flavanones and flavones. *J. Bacteriol.* **169**: 198-204.
-  **Zahran, H.H.** 1991. Conditions for successful *Rhizobium*-legume symbiosis in saline environments. *Biol. Fertil. Soils* **12**: 73-80.
-  **Zahran, H.H.** 1992. Characterization of root-nodule bacteria indigenous in the salt-affected soils of Egypt by lipopolysaccharide, protein and plasmid profiles. *J. Basic Microbiol.* **32**: 279-287.
-  **Zahran, H.H.** 1999. *Rhizobium*-legume symbiosis and nitrogen fixation under severe conditions and in arid climate. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 968-989.
-  **Zahran, H.H.** 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.* **91**: 143-153.
-  **Zahran, H.H. & Sprent, J.I.** 1986. Effects of sodium chloride and polyethylene glycol on root-hair infection and nodulation of *Vicia faba* L. plants by *Rhizobium leguminosarum*. *Planta* **167**: 303-309.
-  **Zhang, F., Dashti, N., Hynes, R.K. & Smith, D.L.** 1996. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] nodulation and nitrogen fixation at suboptimal root zone temperature. *Ann. Bot. (Lond.)* **77**: 453-459.
-  **Zhang, F., Dashti, N., Hynes, R.K. & Smith, D.L.** 1997. Plant growth promoting rhizobacteria and soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] growth and physiology at suboptimal root zone temperature. *Ann. Bot. (Lond.)* **79**: 243-249.
-  **Zhang, F., Lynch, D.H. & Smith, D.L.** 1995. Impact of low root zone temperatures in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] on nodulation and nitrogen fixation. *Environ. Exp. Bot.* **98**: 279-285.



APÉNDICE



## **8.1. Tablas.**



**Tabla IV.2.** Factores de nodulación sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones control (0 mM NaCl) y de estrés salino (300 mM de NaCl), inducida por apigenina 1  $\mu$ M.

[M+Na] <sup>+</sup>	0 mM de NaCl	300 mM de NaCl	Estructura
1468	-	B <sub>i</sub> iones: 1145, 942, 739, 536 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>16:1</sub> , NMe, S, S)
1440	-	B <sub>i</sub> iones: 1057, 854, 651, 448 Y <sub>i</sub> iones: 404, 607, 810, 1013	V(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe, S)
1438	-	B <sub>i</sub> iones: 1113, 910, 707, 504 Y <sub>i</sub> iones: 549, 752, 955	V(C <sub>18:1</sub> , MeFuc)
1436	-	B <sub>i</sub> iones: 1113, 910, 707, 504 Y <sub>i</sub> iones: 549, 752, 955	V(C <sub>22:1</sub> , S)/ V(C <sub>18:1</sub> , NMe, Ac, S)
1424	-	B <sub>i</sub> iones: 1101, 898, 695, 492 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>20:0</sub> , NMe, S)
1422	-	B <sub>i</sub> iones: 1099, 869, -, 490 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>20:1</sub> , NMe, S)
1412	-	B <sub>i</sub> iones: 1394, 1089, 886, 683, 480 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe, S)
1410	+	B <sub>i</sub> iones: 1087, 884, 681, - Y <sub>i</sub> iones: -, 549, 752, 955	V(C <sub>20:0</sub> , S)
1408	B <sub>i</sub> iones: 1085, 882, 679, 476 Y <sub>i</sub> iones: -, 549, 752, 955	B <sub>i</sub> iones: 1085, 882, 679, 476 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>20:1</sub> , S)
1396	+	B <sub>i</sub> iones: 1073, 870, 667, 464 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)
1394	B <sub>i</sub> iones: 1071, 868, 665, 462 Y <sub>i</sub> iones: -, 549, 752, 955	B <sub>i</sub> iones: 1071, 868, 665, 462 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)
1382	-	B <sub>i</sub> iones: 1059, 856, 653, - Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, -	V(C <sub>18:0</sub> , S)
1368	-	B <sub>i</sub> iones: 1045, 842, -, - Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>16:0</sub> , NMe, S)
1366	+	-	V(C <sub>16:1</sub> , NMe, S)
1366	+	-	V(C <sub>20:0-OH</sub> , Ac)/ V(C <sub>22:0-OH</sub> , NMe)
1354	-	B <sub>i</sub> iones: 1031, 828, 625, - Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, 955	V(C <sub>16:0</sub> , S)
1338	-	B <sub>i</sub> iones: 1117, 914, 711, 508 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, 853	V(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe)
1336	B <sub>i</sub> iones: 1115, 912, 709, 506 Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	-	V(C <sub>20:1-OH</sub> , NMe)
1334	+	-	V(C <sub>22:1</sub> )/ V(C <sub>18:1</sub> , NMe, Ac)
1324	-	B <sub>i</sub> iones: 1103, 900, 697, 494 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, -	V(C <sub>20:0-OH</sub> )
1322	B <sub>i</sub> iones: 1108, 898, 695, 492 Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	-	V(C <sub>20:0</sub> , NMe)
1320	-	B <sub>i</sub> iones: 1099, 896, 693, 490 Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	V(C <sub>20:1</sub> , NMe)
1310	-	B <sub>i</sub> iones: -, 886, 683, 480 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, 853	V(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)

Tabla IV.2. Continuación.

[M+Na] <sup>+</sup>	0 mM de NaCl	300 mM de NaCl	Estructura
1308	B <sub>i</sub> iones: 1087, 884, 681, 478	+	V(C <sub>20:0</sub> )
1306	B <sub>i</sub> iones: 1085, 882, 679, 476 Y <sub>i</sub> iones: 447, 650, 853	-	V(C <sub>20:1</sub> )
1296	-	B <sub>i</sub> iones: 1075, 872, 669, 466 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, 853	V(C <sub>18:0-OH</sub> )
1294	+	B <sub>i</sub> iones: 1073, 870, 667, 464 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, 853	V(C <sub>18:0</sub> , NMe)
1292	+	B <sub>i</sub> iones: 1071, 868, 665, 462 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, 853	V(C <sub>18:1</sub> , NMe)
1280	-	+	V(C <sub>18:0</sub> )/ V(C <sub>16:1-OH</sub> , NMe)
1278	-	B <sub>i</sub> iones: 1057, 854, 651, 448 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, -	V(C <sub>18:1</sub> )
1266	B <sub>i</sub> iones: 1045, 842, 639, 436 Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	B <sub>i</sub> iones: -, 842, -, 436 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, 853	V(C <sub>16:0</sub> , NMe)
1264	-	B <sub>i</sub> iones: 1043, 840, -, - Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	V(C <sub>16:1</sub> , NMe)
1252	-	B <sub>i</sub> iones: 1031, -, -, 422	V(C <sub>16:0</sub> )
1251	B <sub>i</sub> iones: 1071, 868, 665, 462	-	IV-Man(C <sub>18:1</sub> , NMe)
1241	B <sub>i</sub> iones: 1020, 817, 614, 411	-	V(C <sub>10:0-OH</sub> , NMe, Cb)
1238	+	B <sub>i</sub> iones: -, -, 611, 408 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, 853	V(C <sub>14:0</sub> , NMe)
1237	-	B <sub>i</sub> iones: 1057, 854, 651, - Y <sub>i</sub> iones: -, 406, 609, 812	IV-Man(C <sub>18:1</sub> )
1237	-	B <sub>i</sub> iones: 1219, 914, 711, 508 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, -	IV(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe, S)
1235	-	B <sub>i</sub> : 854, 651, - Y <sub>i</sub> iones: 404, 607, -	IV(C <sub>18:1</sub> , MeFuc)
1227	B <sub>i</sub> iones: 1006, 803, 600, 397	-	V(C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)
1221	-	B <sub>i</sub> iones: 854, 651, - Y <sub>i</sub> iones: -, 593, 796	IV(C <sub>18:1</sub> , Fuc)
1224	B <sub>i</sub> iones: 1003, 800, 597, 394 Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	B <sub>i</sub> iones: 1003, 800, 597, - Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650, -	V(C <sub>14:0</sub> )
1210	B <sub>i</sub> iones: 989, 786, 583, 380 Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	B <sub>i</sub> iones: 989, 786, 583, 380 Y <sub>i</sub> iones: -, 447, 650, 853	V(C <sub>12:0</sub> , NMe)
1205	B <sub>i</sub> iones: 882, 679, 476	-	IV(C <sub>20:1</sub> , S)
1193	+	B <sub>i</sub> iones: 870, 667, 464 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, -	IV(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)
1191	-	B <sub>i</sub> iones: 1071, 868, 665, 462 Y <sub>i</sub> iones: 346, 549, 752, -	IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)
1186	B <sub>i</sub> iones: 1006, 803, 600, 397	-	IV-Man(C <sub>10:0-OH</sub> , Cb)
1169	B <sub>i</sub> iones: 989, 786, 583, 380 Y <sub>i</sub> iones: 406, 609, 812	-	IV-Man(C <sub>12:0</sub> , NMe)
1149	B <sub>i</sub> iones: 928, 725, 522	-	IV(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe, Ac)



**Tabla IV.2.** Continuación.

[M+Na] <sup>+</sup>	0 mM de NaCl	300 mM de NaCl	Estructura
1135	-	B <sub>i</sub> iones: -, -, 508 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>20:0</sub> -OH, NMe)
1121	-	B <sub>i</sub> iones: 900, 697, 494 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>20:0</sub> -OH)
1093	-	B <sub>i</sub> iones: 872, 669, 466 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>18:0</sub> -OH)
1091	-	B <sub>i</sub> iones: 870, -, 464 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>18:0</sub> , NMe)
1089	B <sub>i</sub> iones: 868, 665, 462 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	B <sub>i</sub> iones: 868, 665, 462 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>18:1</sub> , NMe)
1077	-	B <sub>i</sub> iones: 856, 653, 450 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>18:0</sub> )
1075	+	B <sub>i</sub> iones: 854, 651, 448 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, -	IV(C <sub>18:1</sub> )
1063	+	B <sub>i</sub> iones: 842, 639, 436 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>16:0</sub> , NMe)
1049	+	B <sub>i</sub> iones: -, 625, - Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, -	IV(C <sub>16:0</sub> )
1035	-	+	IV(C <sub>14:0</sub> , NMe)
1021	-	B <sub>i</sub> iones: 800, 597, 394 Y <sub>i</sub> iones: 244, 447, 650	IV(C <sub>14:0</sub> )

**Tabla IV.3.** Factores de nodulación sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl), en ausencia de apigenina.

Fracción (min)	[M-H] <sup>-</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	Estructura
20	1336,0 1350,0		V(C <sub>18:0</sub> , S) V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)
22	1350,0 1392,1		V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S) V(C <sub>20:1</sub> -OH, NMe, S) o V(C <sub>18:0</sub> , Ac, NMe, S)
26	1364,0		V(C <sub>20:0</sub> , S)
33	1378,0		V(C <sub>20:0</sub> , NMe, S)
71		1280,8 1294,8	V(C <sub>18:0</sub> ) V(C <sub>18:0</sub> , NMe)

**Tabla IV.6.** Factores de nodulación sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina.

Fracción (min)	[M-H] <sup>-</sup>	[M+Na] <sup>+</sup>	Estructura
18	1347,9		V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)
	1363,9		V(C <sub>20:0</sub> , S)
26	1335,9		V(C <sub>18:0</sub> , S)
	1349,9		V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)
55		1049,7	IV(C <sub>16:0</sub> )
		1294,8	V(C <sub>18:0</sub> , NMe)

**Tabla IV.10.** Factores de nodulación sintetizados por *R. tropici* CIAT899 bajo condiciones de estrés salino (300 mM de NaCl) o estrés ácido (pH 4,5), en ausencia de apigenina. Análisis comparativo.

Estructura	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	Iones B	300 mM de NaCl	pH 4,5
IV(C <sub>10:0</sub> , NMe)		957	330, 533, 736, 939		+
IV(C <sub>12:0</sub> , NMe)		985	358, 561, 764, 967		+
V(C <sub>12:0</sub> )		1174	344, 547, 750, 953, 1156		+
V(C <sub>12:0</sub> , NMe)	594.72		358, 561, 764, 967		+
III(C <sub>14:0</sub> , NMe)		796	372, 575, 778		+
IV(C <sub>14:0</sub> )		999	372, 575, 778, 981	+	+
IV(C <sub>14:0</sub> , NMe)		1013	386, 589, 792, 995	+	+
IV-Hex(C <sub>14:0</sub> )		1161	372, 575, 778, 981, 1143	+	
IV-Hex(C <sub>14:0</sub> , NMe)		1175	386, 589, 792, 995, 1157	+	
V(C <sub>14:0</sub> )		1202	372, 575, 778, 981, 1184	+	+
V(C <sub>14:0</sub> , NMe)		1216	386, 589, 792, 995, 1198	+	+
IV(C <sub>14:1</sub> )		997	370, 573, 776, 979		+
V(C <sub>14:1</sub> )	601.49		370, 573, 776, 979		+
V(C <sub>14:1</sub> , NMe)		1214	384, 587, 790, 993, 1196	+	
III(C <sub>16:0</sub> )		824	400, 603, 806	+	
III(C <sub>16:0</sub> , NMe)		838	414, 617, 820	+	
IV(C <sub>16:0</sub> )		1027	400, 603, 806, 1009	+	+
IV(C <sub>16:0</sub> , NMe)		1041	414, 617, 820, 1023	+	+
IV(C <sub>16:0</sub> -OH)		1043	416, 619, 822, 1025		+
IV(C <sub>16:0</sub> -OH, NMe)		1057	430, 633, 836, 1039	+	

Tabla IV.10. Continuación.

Estructura	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	Iones B	300 mM de NaCl	pH 4,5
V(C <sub>16:0</sub> )	615.84		400, 603, 806, 1009	+	+
V(C <sub>16:0</sub> , NMe)		1244	414, 617, 820, 1023, 1226	+	+
V(C <sub>16:0</sub> , S)		1310	400, 603, 806, 1009, 1292	+	+
V(C <sub>16:0</sub> , NMe, S)		1324	414, 617, 820, 1023 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1244	+	+
V(C <sub>16:0-OH</sub> )		1246	416, 619, 822, 1025, 1228		+
V(C <sub>16:0-OH</sub> , NMe)		1260	430, 633, 836, 1039, 1242		+
IV(C <sub>16:1</sub> )		1025	398, 601, 804, 1007	+	
IV(C <sub>16:1</sub> , NMe)		1039	412, 615, 818, 1021	+	
V(C <sub>16:1</sub> )		1228	398, 601, 804, 1007, 1210	+	+
V(C <sub>16:1</sub> , NMe)	621.86		412, 615, 818, 1021, 1224	+	
III(C <sub>18:0</sub> , S)		932	428, 631, 914		+
III(C <sub>18:0-OH</sub> )		868	444, 647, 850	+	
III(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)		882	458, 661, 864	+	
III-Hex(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)		1044	458, 661, 864, 1026	+	
IV(C <sub>18:0</sub> )		1055	428, 631, 834, 1037	+	
IV(C <sub>18:0</sub> , NMe)		1069	442, 645, 848, 1051	+	+
IV(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		1149	442, 645, 848, 1131 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1069	+	
IV(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe)		1085	458, 661, 864, 1067	+	+
V(C <sub>18:0</sub> )		1258	428, 631, 834, 1037, 1240	+	+
V(C <sub>18:0</sub> , NMe)		1272	442, 645, 848, 1051, 1254	+	+
V(C <sub>18:0</sub> , S)		1338	428, 631, 834, 1037 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1258		+
V(C <sub>18:0</sub> , NMe, S)		1352	442, 645, 848, 1051, 1334 <sup>a</sup> [[M-80] <sup>+</sup> = 1272	+	+
V(C <sub>18:0-OH</sub> )	638.09		444, -, 850, 1053	+	
V(C <sub>18:0-OH</sub> , NMe, Cb)	666.63		501, 704, 907, 1110		+
II-Hex(C <sub>18:1</sub> )		809	426, 629, 791	+	
III(C <sub>18:1</sub> )		850	426, 629, 832	+	
III(C <sub>18:1</sub> , NMe)		864	440, 643, 846	+	
III-Hex(C <sub>18:1</sub> )		1012	426, 629, 832, 994	+	
III-Hex(C <sub>18:1</sub> , NMe)		1026	440, 643, 846, 1008	+	
IV(C <sub>18:1</sub> )		1053	426, 629, 832, 1035	+	+
IV(C <sub>18:1</sub> , NMe)		1067	440, 643, 846, 1049	+	+
IV(C <sub>18:1</sub> , S)		1133	426, 629, 832 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> = 1053	+	

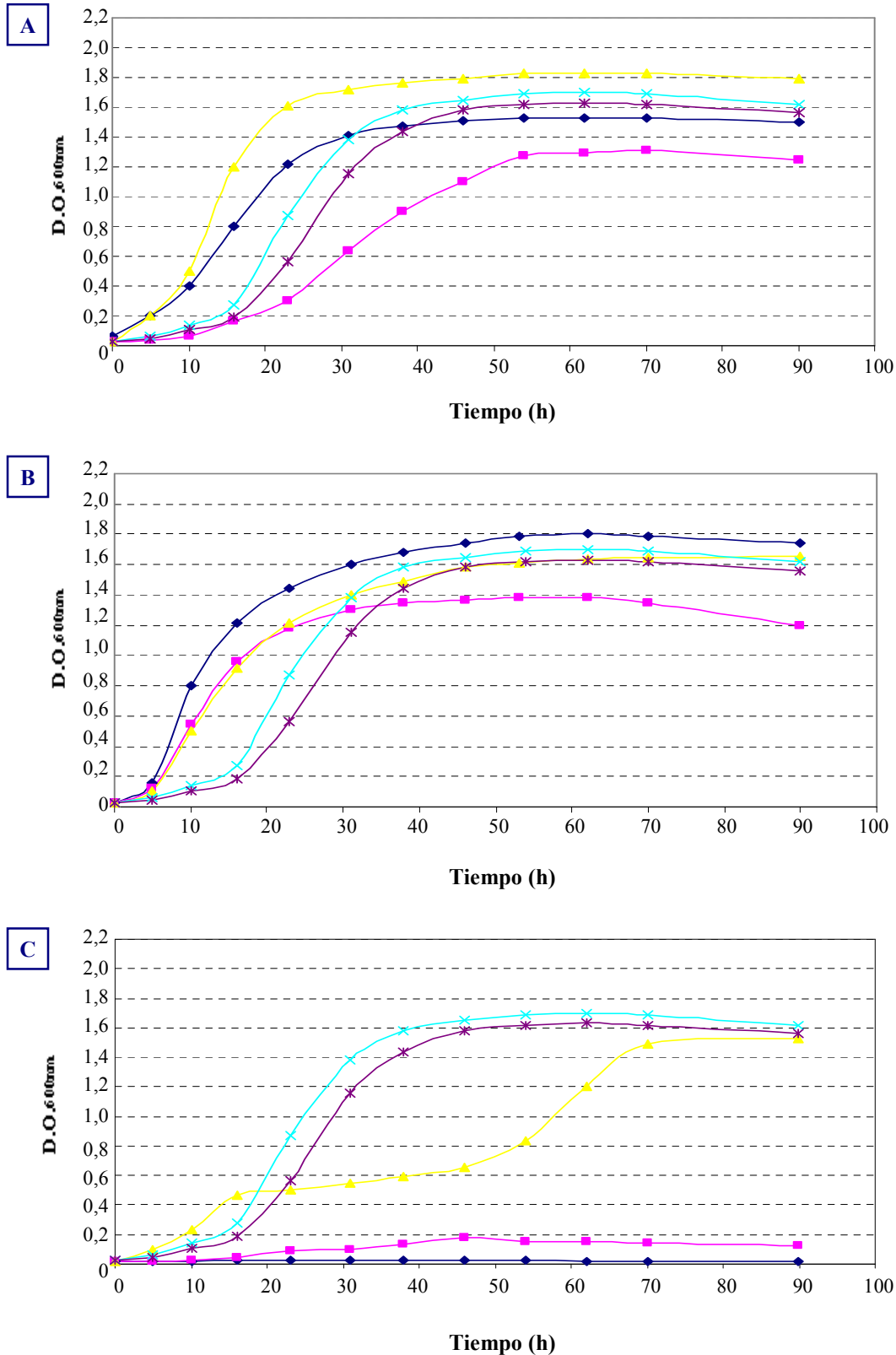
Tabla IV.10. Continuación.

Estructura	[M+2H] <sup>2+</sup>	[M+H] <sup>+</sup>	Iones B	300 mM de NaCl	pH 4,5
IV(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)		1147	440, 643, 846 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1067	+	+
IV-Hex(C <sub>18:1</sub> )		1215	426, 629, 832, 1035, 1197		+
IV-Hex(C <sub>18:1</sub> , NMe)		1229	440, 643, 846, 1049, 1211	+	
V(C <sub>18:1</sub> )		1256	426, 629, 832, 1035, 1238	+	+
V(C <sub>18:1</sub> , S)		1336	426,629, 832, 1035, 1318	+	+
V(C <sub>18:1</sub> , NMe)		1270	440, 643, 846, 1049, 1252	+	+
V(C <sub>18:1</sub> , NMe, S)		1350	440, 643, 846, 1049, 1332 <sup>a</sup> [B5-80] <sup>+</sup> = 1252	+	+
IV(C <sub>18:2</sub> , NMe)		1066	438, 641, 844, 1048	+	
V(C <sub>18:2</sub> )	627.96		424, -, 830, 1033		+
V(C <sub>18:2</sub> , NMe)		1268	438, 641, 844, 1047, 1250	+	
IV(C <sub>20:0</sub> )	542.22		456, -, 862	+	
IV(C <sub>20:0</sub> , NMe)		1097	470, 673, 876, 1079	+	
IV(C <sub>20:0</sub> , NMe, S)		1177	470, 673, 876, 1159 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1097	+	
V(C <sub>20:0</sub> )		1286	456, 659, 862, 1065, 1268	+	
V(C <sub>20:0</sub> , NMe)	650.85		470, 673, 876	+	
V(C <sub>20:0</sub> , S)	684.29		456, -, 862, 1065	+	
V(C <sub>20:0</sub> , NMe, S)		1380	470, 673, 876, 1079, 1362	+	
V(C <sub>20:0-OH</sub> , NMe, S)		1396	486, 689, 892, 1095, 1378		+
IV(C <sub>20:1</sub> , NMe, S)	588.6		468, 671, 874	+	
V(C <sub>20:1</sub> )		1284	454, 657, 860, 1063, 1266	+	+
V(C <sub>20:1</sub> , NMe)		1298	468, 671, 874, 1077, 1280	+	+
V(C <sub>20:1</sub> , S)		1364	454, 657, 860, 1063 [M-80] <sup>+</sup> =1284		+
V(C <sub>20:1</sub> , NMe, S)		1378	468, 671, 874, 1077, 1360 <sup>a</sup> [M-80] <sup>+</sup> =1298	+	+
V(C <sub>22:0-OH</sub> , NMe)		1344.	514, 717, 920, 1123, 1326	+	
V(C <sub>22:2</sub> , NMe)		1324	494, 697, 900, 1103, 1306		+
V(C <sub>22:2</sub> , NMe, S)		1404	494, 697, 900, 1103		+
III(C <sub>22:3</sub> , NMe)		916	492, 695, 898	+	
IV(C <sub>22:3</sub> , NMe)		1119	492, 695, 898, 1101	+	
IV-Hex(C <sub>22:3</sub> , NMe)		1281	492, 695, 898, 1101, 1263	+	
V(C <sub>22:3</sub> , NMe)		1322	492, 695, 898, 1101, 1304	+	+
V(C <sub>22:3</sub> , NMe, S)		1402	492, 695, 898, 1101		+

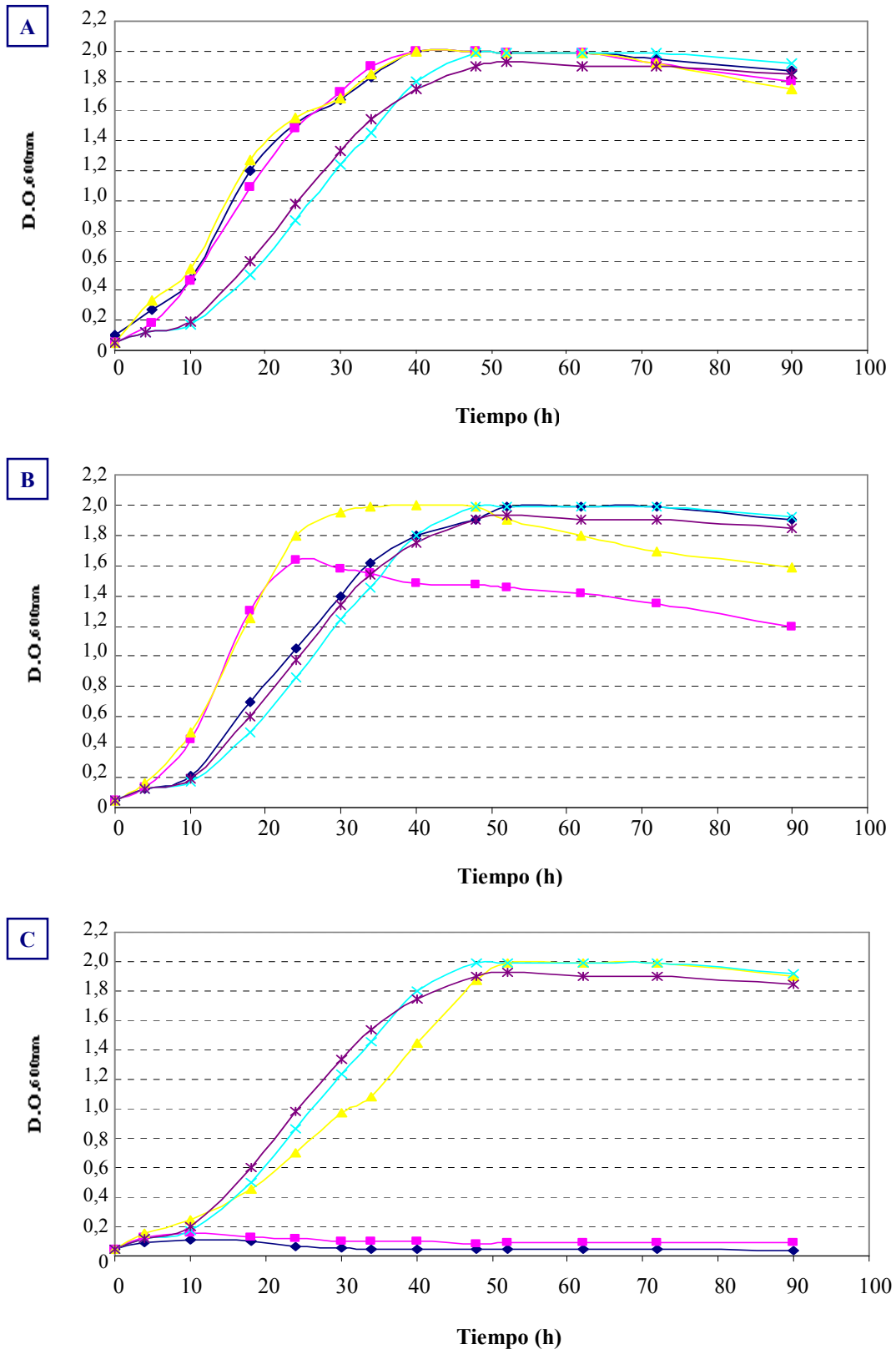
<sup>a</sup> [M-80]<sup>+</sup> o [B5-80]<sup>+</sup> = Pérdida de grupo sulfato

## **8.2. Figuras.**



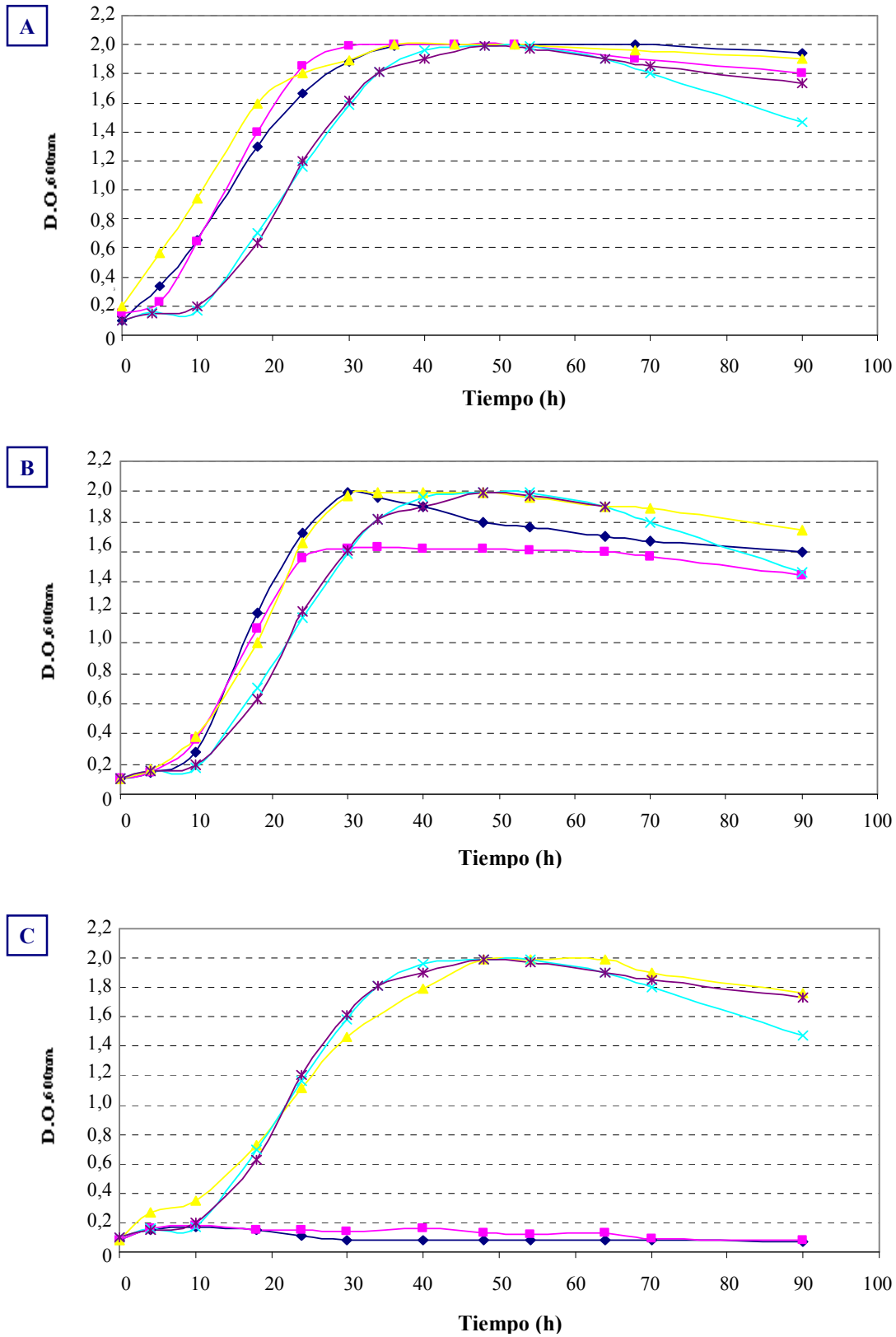


**Figura 4.31.** Curvas de crecimiento de *R. tropici* CIAT899 en el LM de *P. fluorescens* WCS417r (A), *C. balustinum* Aur9 (B) o *A. brasilense* Sp7 (C), combinados según las siguientes proporciones (1:1): LM (◆), LM + agua (■), LM+ MMO (▲), MMO (×) y MMO + agua (✱).

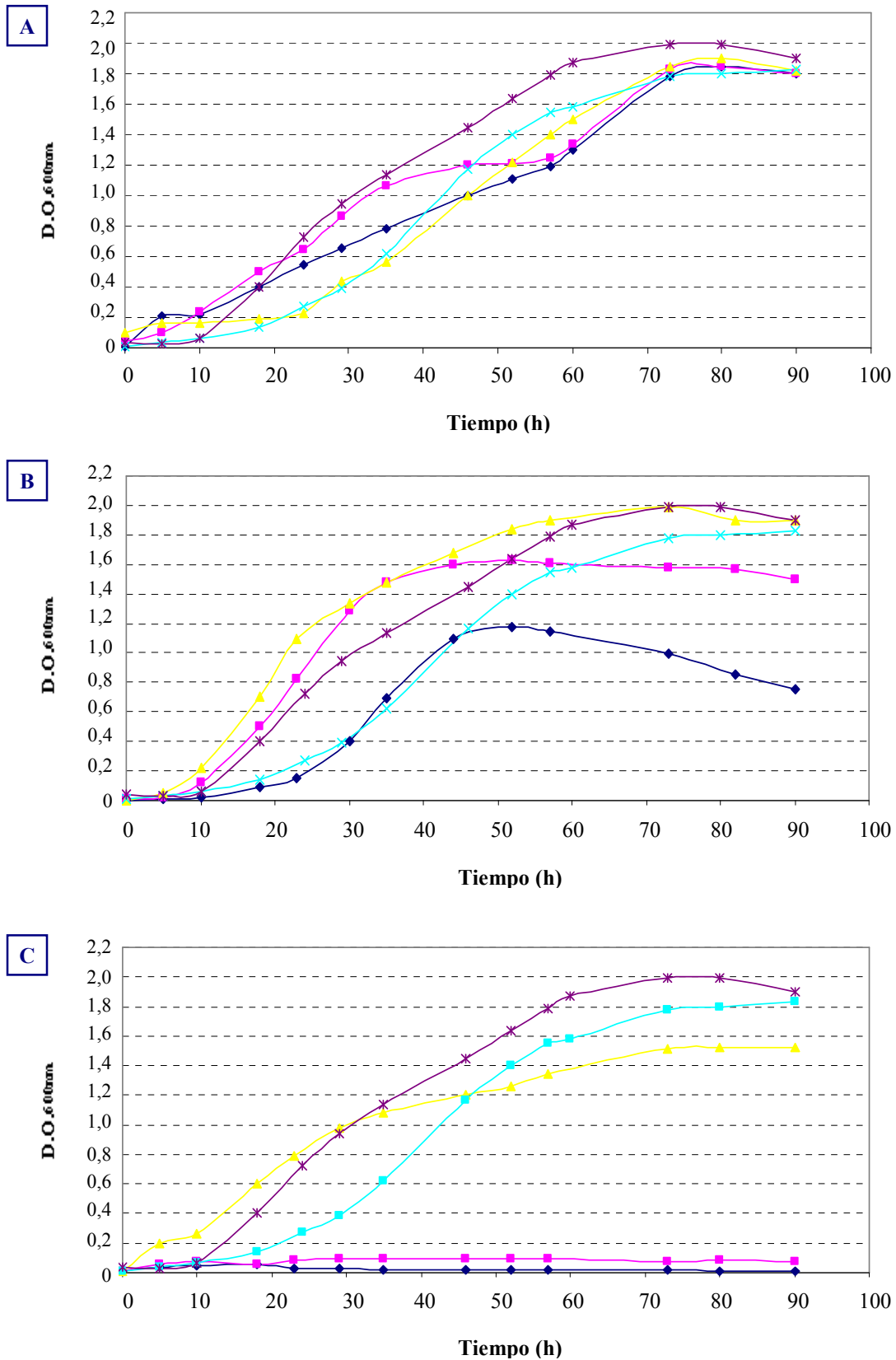


**Figura 4.32.** Curvas de crecimiento de *R. etli* ISP42 en el LM de *P. fluorescens* WCS417r (A), *C. balustinum* Aur9 (B) o *A. brasilense* Sp7 (C), combinados según las siguientes proporciones (1:1): LM (◆), LM + agua (■), LM+ MMO (▲), MMO (×) y MMO + agua (✱).

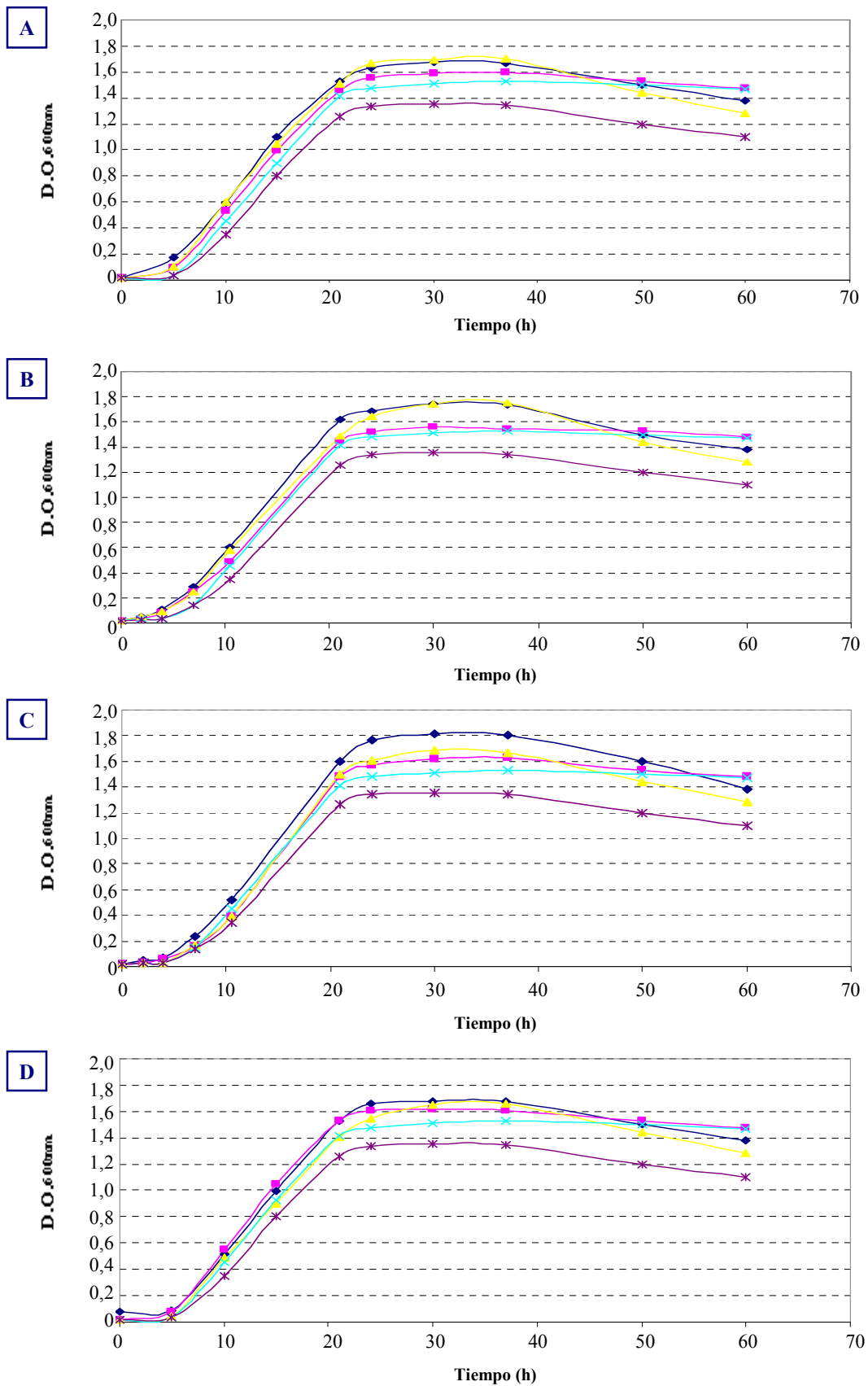




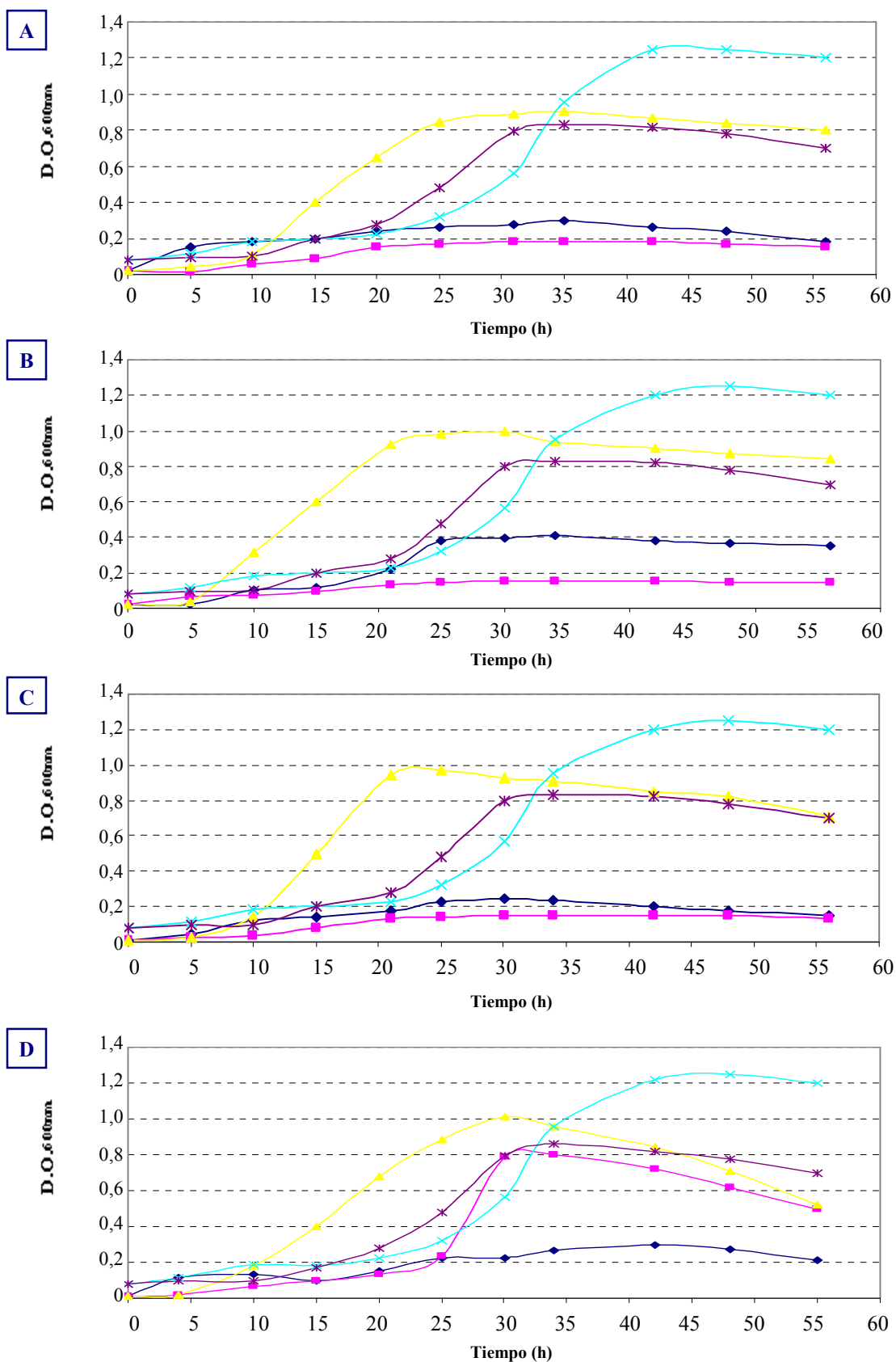
**Figura 4.33.** Curvas de crecimiento de *E. fredii* SMH12 en el LM de *P. fluorescens* WCS417r (A), *C. balustinum* Aur9 (B) o *A. brasilense* Sp7 (C), combinados según las siguientes proporciones (1:1): LM (◆), LM + agua (■), LM + MMO (▲), MMO (×) y MMO + agua (✱).



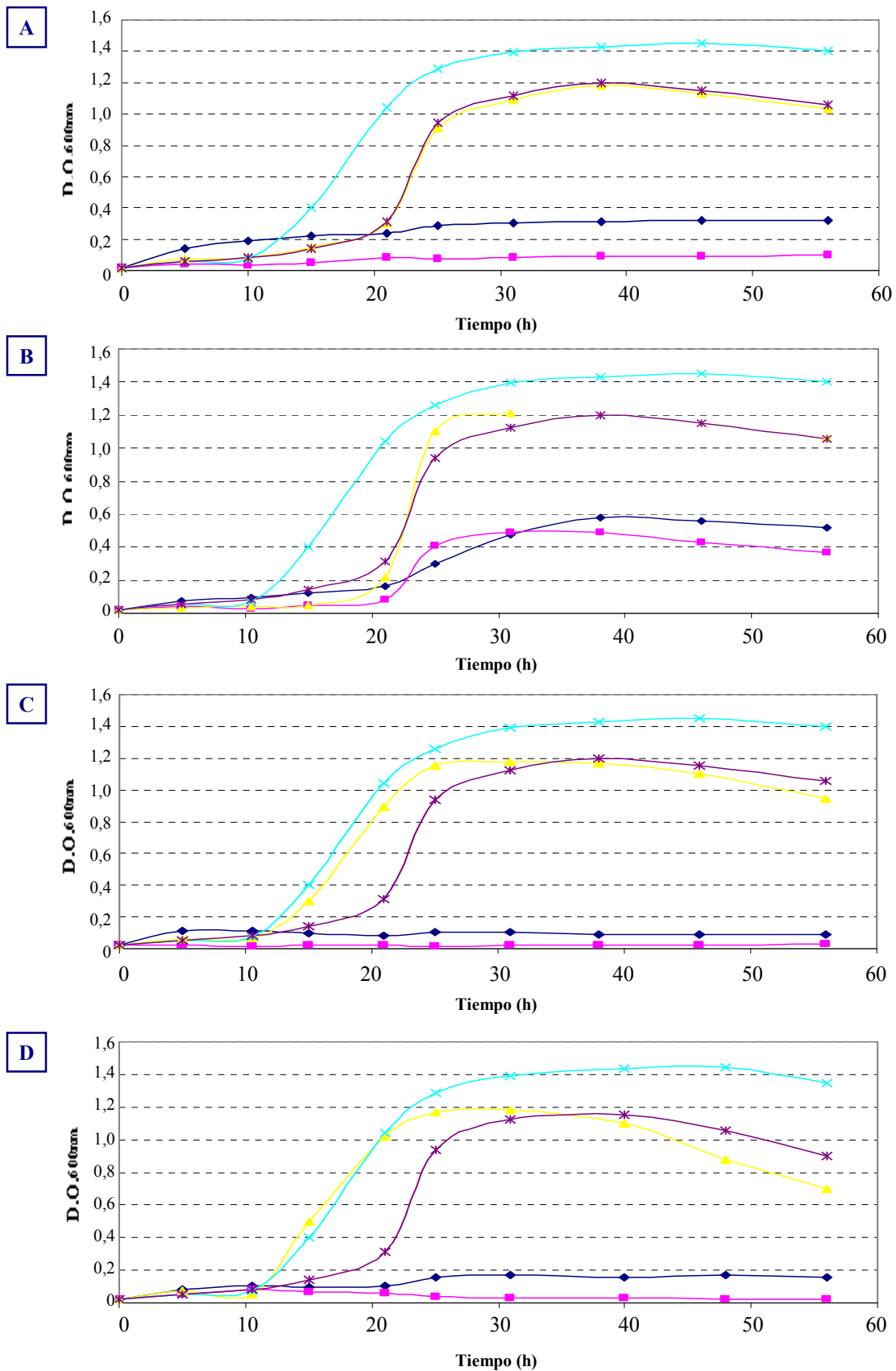
**Figura 4.34.** Curvas de crecimiento de *E. fredii* HH103 en el LM de *P. fluorescens* WCS417r (A), *C. balustinum* Aur9 (B) o *A. brasilense* Sp7 (C), combinados según las siguientes proporciones (1:1): LM (◆), LM + agua (■), LM + MMO (▲), MMO (×) y MMO + agua (✱).



**Figura 4.35.** Curvas de crecimiento de *P. fluorescens* WCS417r en el LM de *R. tropici* CIAT899 (A), *R. etli* ISP42 (B), *E. fredii* SMH12 (C) y *E. fredii* HH103 (D), combinados según las siguientes proporciones (1:1): LM ( —◆— ), LM + agua ( —■— ), LM+ MMO ( —▲— ), MMO ( —×— ) y MMO + agua ( —\*— ).



**Figura 4.36.** Curvas de crecimiento de *C. balustinum* Aur9 en el LM de *R. tropici* CIAT899 (A), *R. etli* ISP42 (B), *E. fredii* SMH12 (C) y *E. fredii* HH103 (D), combinados según las siguientes proporciones (1:1): LM ( —◆— ), LM + agua ( —■— ), LM+ MMO ( —▲— ), MMO ( —×— ) y MMO + agua ( —\*— ).



**Figura 4.37.** Curvas de crecimiento de *A. brasilense* Sp7 en el LM de *R. tropici* CIAT899 (A), *R. etli* ISP42 (B), *E. fredii* SMH12 (C) y *E. fredii* HH103 (D), combinados según las siguientes proporciones (1:1): LM (—◆—), LM + agua (—■—), LM+ MMO (—▲—), MMO (—×—) y MMO + agua (—\*—).





La interacción rizobio-leguminosa está actualmente considerada como la asociación fijadora de  $N_2$  más importante desde un punto de vista agrícola. Junto a esta simbiosis, existen muchas otras interacciones en la rizosfera que pueden bien optimizar la primera, o bien afectarla negativamente, dando lugar a importantes pérdidas ecológicas, económicas y alimenticias. Sin embargo, estos factores bióticos no son los únicos que pueden alterar la eficacia del proceso simbiótico. Existen igualmente factores abióticos que causan pérdidas incluso mayores que las anteriores por la extensa amplitud de su radio de acción. Sirva como ejemplo la salinidad, que afecta de forma aproximada a un 40% de la superficie mundial (Zahran, 1999).

Esta disminución en la eficacia de la simbiosis rizobio-leguminosa esta siendo hoy en día contrarrestada eficazmente gracias al empleo de técnicas respetuosas con el medio ambiente, basadas en el uso de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), a fin de lograr una agricultura sostenible. Estas bacterias constituyen un sistema tripartito junto con el rizobio y la leguminosa, e incrementan la productividad del cultivo mediante mecanismos directos o indirectos. En este sentido, se están llevando a cabo numerosos trabajos de investigación dedicados no sólo a la optimización del proceso simbiótico rizobio-leguminosa mediante coinoculación con EGPRs en condiciones control, sino que al mismo tiempo, se están desarrollando estudios ambiciosos que proponen las técnicas de coinoculación con EGPRs como medida paliativa de los efectos negativos que el estrés medioambiental ejerce sobre la simbiosis rizobio-leguminosa.

Nowadays, the rhizobium-legume symbiosis is considered the most important nitrogen fixing interaction from an agricultural point of view. This symbiotic process can be either promoted or attenuated by many others rhizosphere interactions, resulting in important ecological, economic and nutritional losses. Nevertheless, factors of other kind can affect the effectiveness of the symbiotic process as well. Abiotic factors can have negative effects on the rhizobium-legume symbiosis, causing even greater losses than the biotic factors, because of its broad action range. Serve as example the high salinity of arid and semiarid regions, which are nearly the 40% of the world's land surface (Zahran, 1999).

The employment of agricultural techniques respectful with the environment, based on the use of plant growth promoting bacteria (PGPRs), can offset the losses of the symbiotic process efficiency. The use of these beneficial microorganisms could reduce the chemical manure allowing sustainable agriculture. These bacteria constitute a tripartite system together with the rhizobia and the legume, increasing the crop yield by means of direct or indirect mechanisms.

The application of beneficial PGPRs in agriculture pursues two fundamental aims; to increase production under control conditions and to minimize losses caused by environmental stresses. Therefore, promotion of rhizobium-legume symbiosis by inoculation with PGPRs, under control conditions, is largely being studied. Moreover, the negative effects of environmental stresses on the rhizobium-legume symbiosis may be offset by development of coinoculation techniques with PGPRs.