

Índice de la tesis doctoral

Lista de tablas

Lista de figuras

Abreviaturas

1. Introducción general

1.1 Legumbres

1.2 *Pisum sativum* (guisante común)

1.3 *Lupinus* (lupino)

1.4 Interacciones planta-bacteria y su influencia en el desarrollo de la planta

1.5 *Micromonospora*, un endófito inesperado de nódulos fijadores de nitrógeno

1.6 Uso de herramientas "Omicas" para comprender la interacción planta-endófito

2. Objetivos

3. Materiales y métodos

3.1 Aislamiento y caracterización de cepas de *Micromonospora* procedentes de plantas de *Pisum* y *Lupinus*

3.1.1 Zona de estudio y recolección de muestras

3.1.2 Aislamiento de microorganismos

3.1.3. Mantenimiento y preservación de cultivos puros de bacterias

3.1.4 Identificación de aislamientos

3.1.4.1 Extracción de ADN

3.1.4.2 Amplificación por PCR y secuenciación del gen ribosómico 16S rRNA

3.1.5 Detección para la producción de enzimas hidrolíticas extracelulares

3.1.5.1 Determinación de la actividad celulolítica y hemicelulolítica

3.1.5.2 Determinación de la actividad xilanolítica

3.1.5.3 Determinación de la actividad pectinolítica

3.1.5.4 Determinación de la actividad amilolítica

3.1.5.5 Determinación de la actividad quitinolítica

3.2 Monitoreo del proceso de colonización e infección de nódulos de leguminosas por *Micromonospora*

3.2.1 Cepas bacterianas utilizadas y condiciones de crecimiento

3.2.2 Ensayo de antagonismo *in vitro* entre *Micromonospora* y diferentes rizobios

3.2.3 Ensayos de germinación semillas e infección de plantas

3.2.4 Monitoreo de la colonización bacteriana por microscopía de fluorescencia y confocal

3.2.5 Microscopía electrónica de transmisión (TEM) junto con inmunomarcaje

3.3 Efecto de los exudados de raíz en el proteoma intracelular de *Micromonospora*

3.3.1 Colección de exudados de raíz

3.3.2 Crecimiento de cepas de *Micromonospora* en presencia y ausencia de exudados de raíz

3.3.3 Determinación de la actividad celulolítica en presencia y ausencia de planta

3.3.4 Extracción intracelular de proteínas

3.3.5 Electroforesis en gel unidimensional (SDS-PAGE)

3.3.6 Electroforesis en gel bidimensional y visualización de proteínas

3.3.7 Análisis de proteínas por LC-MS/MS y análisis de datos

3.4 Perfil transcriptómico de *Micromonospora* bajo el efecto de exudados de raíz

3.4.1 Extracción y secuenciación de ARN (RNA-seq)

3.4.2 Análisis de datos del transcriptoma

3.4.3 PCR en tiempo real (RT-PCR)

3.4.4 Evaluación de los niveles de expresión génica por PCR en tiempo real de las cepas de *Micromonospora* después de la exposición directa a exudados de raíz de *Lupinus*

4. Capítulo 1. Diversidad de cepas de *Micromonospora* aisladas de diferentes tejidos de plantas de *Pisum* y *Lupinus*

4.1 Introducción

4.2 Resultados

4.2.1 Bacterias endofíticas aisladas de plantas de *Pisum* y *Lupinus*

4.2.2 Identificación de cepas de *Micromonospora* mediante el gen ribosómico 16S rRNA

4.2.3 Capacidad de los aislados de *Micromonospora* para producir enzimas hidrolíticas

4.3 Discusión

4.3.1 Distribución del género *Micromonospora* en tejidos de plantas leguminosas

4.3.2. Enzimas hidrolíticas producidas por cepas aisladas de *Micromonospora*

5. Capítulo 2. Monitoreo de la colonización e infección de nódulos de leguminosas por *Micromonospora* en experimentos de co-inoculación con rizobia

5.1 Introducción

5.2 Resultados

5.2.1 Ensayo de antagonismo

5.2.2 Localización de *Micromonospora* en nódulos de lupino

5.2.3 Efecto de *Micromonospora* sobre los pelos radicales de *Medicago* y *Trifolium*

5.2.4 Infección de nódulos de raíz de *Medicago* y *Trifolium* por *Micromonospora*

5.3 Discusión

5.3.1 Deformación del vello radicular de *Medicago* y *Trifolium* por efecto de *Micromonospora*

5.3.2 Presencia inespecífica de *Micromonospora* dentro de las células nodulares de la leguminosa

6. Capítulo 3. Efecto de los exudados de raíz en el proteoma intracelular de *Micromonospora*

6.1 Introducción

6.2 Resultados

6.2.1 Geles bidimensionales de proteínas

6.2.2 Cambios globales en la expresión del proteoma intracelular en respuesta a los exudados de la raíz

6.2.3 Caracterización funcional de proteínas expresadas en presencia y ausencia de exudados

6.2.4 Enzimas degradadoras de polímeros vegetales expresadas en el proteoma de *Micromonospora*

6.2.5 Proteínas expresadas diferencialmente involucradas en la estimulación del crecimiento vegetal

6.2.6 Proteínas expresadas diferencialmente involucradas en la comunicación bacteria-planta

6.2.7 Caracterización funcional de proteínas expresadas exclusivamente en presencia o ausencia de exudados

6.2.8 Proteínas únicas implicadas en la producción de enzimas degradantes de polímeros vegetales

6.2.9 Proteínas únicas involucradas en la promoción del crecimiento vegetal

6.2.10 Proteínas únicas relacionadas con la interacción planta-*Micromonospora*

6.2.11 Actividad celulolítica en presencia de raíces de leguminosas

6.3 Discusión

6.3.1. Cambios globales en el proteoma de *Micromonospora* por exudados de raíz

6.3.2 Enzimas hidrolíticas y su papel en la colonización de tejidos vegetales

6.3.3 El efecto de los exudados de raíz en la relación bacteria-planta

7. Capítulo 4. Perfiles transcriptómicos de las respuestas de *Micromonospora* a los exudados de la raíz

7.1. Introducción

7.2. Resultados

7.2.1 Cambios globales en el transcriptoma de las cepas Lupac08, Lupac09^T y CR30^T en respuesta a los exudados de la raíz

7.2.2 Validación de datos de RNA-Seq mediante PCR en tiempo real

7.3.3. Genes involucrados en la promoción del crecimiento de plantas influenciados por exudados radicales

7.3.4. Influencia de los exudados de raíz en la comunicación planta-microorganismo

7.3.5. Reducción de la traducción ribosómica por la acción de los exudados de la raíz

8. Discusión final

9. Conclusiones

10. Referencias

11. Apéndices

Introducción

Las legumbres son una familia perteneciente al orden Fabales que están representadas por árboles, arbustos o hierbas, que pueden ser bienales o perennes. Es una familia de distribución cosmopolita con aproximadamente 730 géneros y aproximadamente 19.400 especies, siendo la tercera familia más grande de angiospermas. Se distribuyen por todo el mundo, aunque son más frecuentes en las regiones tropicales y subtropicales y menos abundantes o ausentes en las regiones árticas y alpinas y en el sotobosque de los bosques templados fríos. Las legumbres son la segunda familia más importante de especies de cultivos agrícolas después de los pastos, y su producción está destinada principalmente a la alimentación del ganado y al consumo humano, siendo uno de los alimentos más consumidos en el mundo después de los cereales. Esto se debe a que las legumbres son una gran fuente de nutrientes dado su alto contenido de proteínas y minerales (hierro y zinc), así como sus cantidades de fibra,

vitaminas y otras moléculas bioactivas. Sin embargo, las legumbres no solo son importantes a nivel nutricional, sino también a nivel ecológico porque reducen la erosión del suelo, tienen una baja dependencia de los fertilizantes industriales, reducen las emisiones de gases de efecto invernadero y son un gran depósito de carbono. Además, esta familia de plantas juega un papel importante en el ciclo del nitrógeno terrestre, estableciendo relaciones simbióticas con las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Las comunidades microbianas que viven en el suelo pueden establecer diferentes interacciones con las plantas circundantes. Estas interacciones pueden tener un efecto neutral, beneficioso o perjudicial en la planta, dependiendo del tipo de microorganismo y el estado fisiológico del huésped. Los microorganismos que interactúan con las plantas pueden estar presentes en la parte del suelo inmediata a las raíces (rizosfera), en la superficie de la raíz (rizoplaneo) o dentro de los tejidos internos de la planta (endosfera). La mayoría de los endófitos que colonizan los tejidos internos no causan síntomas o enfermedades a su huésped, pero pueden ayudar a su correcto desarrollo. En realidad, todas las especies de plantas pueden requerir la presencia de bacterias asociadas para su crecimiento y establecimiento en diferentes ecosistemas.

La colonización bacteriana de la raíz generalmente comienza con el reconocimiento de compuestos específicos presentes en los exudados de la raíz. La composición del exudado de la raíz se puede determinar por genotipo de planta, cultivar, etapa de crecimiento, estado fisiológico, abundancia y diversidad microbiana, estrés biótico y abiótico y condiciones ambientales. Las diferencias en la composición del exudado de la raíz pueden influir en las comunidades bacterianas y su proceso de colonización. Algunos compuestos pueden tener efectos negativos, atractivos y/o repulsivos para ciertos microorganismos, que no solo pueden influir en la diversidad microbiana sino

también en su expresión génica. Los microorganismos de la rizosfera que son atraídos por los exudados de la raíz pueden colonizar tanto el rizoplano, como los tejidos de la raíz interna. Sin embargo, no todos los microorganismos presentes en la rizosfera y/o el rizoplano pueden colonizar la endosfera de la planta, ya que deben poseer la maquinaria genética necesaria para colonizar y persistir en ella.

Los endófitos bacterianos se pueden clasificar como obligatorios o facultativos de acuerdo con sus estrategias de vida. Los endófitos obligados dependen estrictamente de la planta huésped para su crecimiento y supervivencia y se transmiten a otras plantas a través del contacto planta-planta o la transmisión planta-insecto-planta. En el caso de los endófitos facultativos, pueden vivir temporalmente dentro de las plantas y después, en otros hábitats. Sin embargo, independientemente de su ciclo de vida, muchos endófitos han mostrado efectos que promueven el crecimiento de las plantas (PGP). La presencia de estas bacterias puede aumentar la producción agrícola al acelerar la germinación de la semilla, promover el establecimiento de la planta en condiciones adversas, mejorar el crecimiento de la planta o prevenir infecciones por patógenos. Estas bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB) puede estimular y mejorar el desarrollo de la planta a través de mecanismos directos e indirectos como la producción de fitohormonas (ácido indolacético (IAA), ácido giberélico, zeatina, citoquininas y etileno), fijación de nitrógeno, modulación de etileno (ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) desaminasa), la producción de sustancias inhibitoras moleculares (amoníaco, cianógenos, sulfuros, aldehídos, alcoholes y cetonas) o metabolitos biocidas secundarios (antibióticos).

Entre la gran diversidad microbiana presente en el suelo con propiedades PGP, las bacterias Gram-negativas han sido las mejor estudiadas, siendo Bacteroidetes y

Proteobacterias los filos más destacados. Sin embargo, muchas bacterias Gram-positivas incluidas en los filos Firmicutes y Actinobacteria también son excelentes promotores del crecimiento de las plantas, además de estar involucradas en procesos de biocontrol y bioremediación. Las especies más comúnmente estudiadas son: *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Gluconacetobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Paenibacillus*, *Streptomyces* y *Frankia*. Entre las Actinobacterias promotoras del crecimiento vegetal, destacan los géneros *Frankia*, *Streptomyces*, *Micromonospora* y *Microbacterium*. Desafortunadamente, nuestro conocimiento sobre la relación entre las plantas y las Actinobacterias es aún pobre. Actualmente hay datos muy limitados disponibles sobre las interacciones moleculares y los cambios genéticos que ocurren tanto en la planta como en la bacteria.

Micromonospora es un género bacteriano que pertenece al filo Actinobacteria. Fue descrito por primera vez en 1923 por Ørskov y actualmente está compuesto por 101 especies con nombres válidos (octubre, 2019). La especie tipo del género es *Micromonospora chalcea*, que fue reclasificada de su nombre original, "*Streptothrix chalcea*". Las especies del género *Micromonospora* son Gram-positivas, aeróbicas, cuyos genomas suelen ser grandes (6.1-7.3 Mb) y tienen un alto contenido de guanina-citosina (72-74%).

El género *Micromonospora* está ampliamente distribuido en diferentes ambientes de todo el mundo como suelos, hábitats acuáticos (agua dulce y sedimentos marinos), manglares, lodos e incluso han sido aisladas de muestras de roca arenisca antártica y piedra caliza de cantera. En la última década, *Micromonospora* ha sido aislada de tejidos vegetales, principalmente de nódulos fijadores de nitrógeno, tanto de plantas actinorizales como leguminosas, y muy puntualmente de otros tejidos. En el caso de

las plantas leguminosas, *Micromonospora* se ha recuperado de diferentes especies silvestres como *Arachis hypogaea*, *Cicer arietinum*, *Glycine max*, *Lens culinaris*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus gredensis*, *Medicago sativa*, *Melilotus* sp., *Mucuna* sp., *Ononis* sp., *Ornithopus* sp., *Pisum sativum*, *Phaseolus* sp., *Trifolium* sp. y *Vicia* sp. La primera cepa de *Micromonospora* aislada del interior de los nódulos fijadores de nitrógeno se consideró un contaminante porque se supuso que las esporas presentes en los tejidos nodulares externos habían resistido el proceso de esterilización. Sin embargo, aislamientos posteriores mostraron la ausencia de microorganismos esporulantes de rápido crecimiento provenientes de nódulos esterilizados externamente y la presencia de *Micromonospora* dentro del nódulo. Esto indicaba fuertemente que las cepas de *Micromonospora* se habían originado a partir de los tejidos vegetales internos. A pesar de la estrecha relación entre *Micromonospora* y las legumbres, todavía hay pocos informes sobre cómo *Micromonospora* puede colonizar los tejidos internos del nódulo.

En los últimos años, el número de genomas de *Micromonospora* secuenciados ha aumentado, enriqueciendo la información genética de este género. Estos genomas han mostrado varios rasgos genómicos potencialmente involucrados en la interacción planta-bacteria. Las diferentes cepas secuenciadas de *Micromonospora* han mostrado genes involucrados en la producción de ácido indol-acético (IAA), 1-aminociclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa, sideróforos, quitinasas, acetoina, 2,3-butanodiol y otros metabolitos secundarios. Algunos de estos compuestos que estimulan el crecimiento de las plantas se han demostrado en ensayos de laboratorio. Además, diferentes estudios de co-inoculación de leguminosas con *Micromonospora* y rizobia han demostrado que *Micromonospora* actúa como PGPB,

produciendo un efecto positivo en las plantas y aumentando el número de nódulos en comparación con los tratamientos de un solo tipo de bacteria. Aunque *Micromonospora* puede promover el crecimiento de las plantas y recuperarse de los nódulos, no se ha demostrado que pueda fijar nitrógeno ni se han encontrado genes involucrados en la fijación del nitrógeno en su genoma.

El género *Micromonospora* es conocido por su capacidad para producir un alto número de enzimas hidrolíticas, que pueden contribuir al recambio de materia orgánica en diferentes hábitats. Los genomas secuenciados han demostrado en mayor o menor medida genes que codifican para la producción de enzimas hidrolíticas tales como celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas y quitinasas. La producción de estas enzimas hidrolíticas se ha confirmado en ensayos de laboratorio. Esto parece ser una paradoja ya que *Micromonospora* muestra una actividad *in vitro* muy alta para celulasas y xilanasas, sin embargo, los experimentos de inoculación indican que *Micromonospora* no se comporta como un patógeno, sino todo lo contrario, este grupo bacteriano parece actuar como un promotor del crecimiento vegetal. No obstante, aún se desconoce el papel de estas enzimas en la interacción leguminosa-*Micromonospora*.

La información disponible sobre los mecanismos moleculares que se producen en el establecimiento de las relaciones entre plantas y sus endófitos aún es muy limitada. Dos razones principales dificultan este tipo de estudios. El primero es la compleja relación entre el huésped y sus endófitos, mientras que el segundo es la dificultad de imitar este tipo de condiciones de asociación en el laboratorio, así como el estudio de los mecanismos en la planta. La comprensión completa de este fenómeno ecológico solo puede obtenerse integrando diferentes tecnologías llamadas "ómicas", como la

genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. La genómica analiza el conjunto de genes que contiene un organismo en su cromosoma o cromosomas. Un genoma solo puede proporcionar información sobre qué características genéticas de un organismo pueden influir directa o indirectamente en su estilo de vida, adaptación a la vida endofítica o relacionadas con funciones como la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas, la adquisición de minerales, la tolerancia al estrés, la adhesión de raíces y otros genes de interés. Sin embargo, el genoma no permite determinar qué genes están activos en diferentes condiciones. Por el contrario, la transcriptómica se refiere al conjunto completo de genes que se expresan bajo ciertas condiciones. Un análisis de genes bacterianos expresados diferencialmente en presencia de especies vegetales específicas puede proporcionar datos sobre la naturaleza básica y las relaciones establecidas entre la bacteria y la planta. Por otro lado, la proteómica es el estudio de aquellos genes que se han traducido en proteínas, pero también estudia las proteínas a gran escala y su estructura y función particulares. El análisis de proteoma permite una imagen dinámica de las proteínas expresadas bajo ciertas condiciones. Esto nos da una visión de los procesos que ocurren en un organismo, incluidos los cambios en los niveles de expresión, modificaciones postranscripcionales o la interacción entre proteínas. Por lo tanto, las tecnologías ómicas son excelentes herramientas para estudiar la interacción *Micromonospora-leguminosa* con el fin de comprender mejor los mecanismos durante el establecimiento de la relación entre los dos organismos, así como los mecanismos de comunicación y la influencia de la planta en el comportamiento bacteriano.

Objetivos

El objetivo principal de la tesis doctoral fue obtener información sobre la interacción molecular entre *Micromonospora* y su planta huésped, así como la capacidad de *Micromonospora* de colonizar leguminosas que no sean su huésped original. Para lograr este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar la presencia de *Micromonospora* en diferentes tejidos vegetales (raíz, tallo y hojas), además de en nódulos fijadores de nitrógeno, procedentes de dos leguminosas silvestres (*Lupinus angustifolius* y *Pisum sativum*) mediante técnicas dependientes del cultivo.
2. Estudiar la capacidad de la cepa *M. lupini* Lupac 08 para reinfectar su huésped original y otras leguminosas.
3. Localizar células de *Micromonospora* dentro de nódulos fijadores de nitrógeno mediante el uso de diferentes técnicas de microscopía.
4. Evaluar el efecto de los exudados de raíz de lupino sobre el proteoma intracelular de diferentes cepas de *Micromonospora*.
5. Determinar los genes inducidos o inhibidos en el transcriptoma de diferentes cepas de *Micromonospora* debido a la exposición a los exudados radicales de lupino.

Resultados y discusión

Los resultados obtenidos a lo largo de la tesis doctoral han proporcionado información sobre la interacción molecular entre *Micromonospora* y la planta huésped y su capacidad para colonizar diferentes leguminosas y tejidos vegetales. Por lo tanto, podemos responder a las preguntas planteadas al comienzo de esta investigación: ¿Se puede aislar a *Micromonospora* de diferentes tejidos vegetales que no sean nódulos fijadores de nitrógeno? ¿Tiene *Micromonospora* la capacidad de ingresar y colonizar leguminosas que no sean su huésped original? ¿Pueden los exudados de raíz de las plantas de *Lupinus* alterar los patrones específicos de expresión génica en *Micromonospora* e influir en su interacción con el huésped?

Este trabajo demuestra que *Micromonospora* puede aislarse no solo de nódulos fijadores de nitrógeno sino también de diferentes tejidos de leguminosas como hojas, tallos y raíces. En trabajos anteriores, *Micromonospora* se ha aislado ocasionalmente de tallos, raíces y hojas de varias plantas no leguminosas, pero no de legumbres. Un total de 248 y 273 colonias aparecieron en las placas de aislamiento de tejidos de *Lupinus* y *Pisum* respectivamente, de las cuales se seleccionaron 44 y 107 cepas debido a su similitud morfológica con el género *Micromonospora*. En las plantas de *Lupinus*, se recuperaron colonias similares a *Micromonospora* de todos los tejidos analizados, pero su abundancia varió según el tejido evaluado. Las hojas fueron el tejido con mayor número de aislamientos (21), en contraste con los tallos, los cuales fueron los tejidos con el menor número de aislados. En el caso de las plantas de *Pisum*, las cepas con morfología similar a *Micromonospora* solo se aislaron de hojas y nódulos, con un número similar de aislamientos en estos dos tejidos (~ 53 aislamientos). La secuenciación del gen ARN ribosómico 16S (ARNr) se realizó para

los 151 aislados de tipo *Micromonospora*. El árbol filogenético mostró que las cepas aisladas se agruparon con diferentes especies de *Micromonospora* descritas, salvo cuatro cepas aisladas de hojas de *Pisum*. Estas cuatro cepas mostraron un porcentaje de similitud >99% con respecto a *Pseudonocardia soli*, *Micrococcus aloeverae*, *Streptomyces alboniger* y *Nocardiopsis umidischolae*. Aproximadamente el 85% de las cepas identificadas como *Micromonospora* se agruparon en un mismo grupo junto con las cepas tipo de *M. saelicesensis* Lupac 09^T y *M. noduli* GUI43^T. Dentro de las cepas agrupadas con *M. noduli* GUI43^T, el 50% se aisló de hojas de *Pisum* y *Lupinus*, mientras que el otro 50% de las cepas se aisló de los nódulos de *Pisum* y raíces de *Lupinus*. En el caso de los aislamientos que formaron el grupo más grande con *M. saelicesensis* Lupac 09^T, la mayoría de ellos (~ 57%) se aislaron de nódulos obtenidos de plantas de *Pisum*, excepto 14 cepas que se aislaron de hojas de *Pisum* y *Lupinus*, y dos cepas procedentes de raíces de *Lupinus*. Todas las cepas agrupadas con *M. noduli* GUI43^T o con *M. saelicesensis* Lupac 09^T mostraron un porcentaje de similitud entre 99.9% y 100% con respecto a estas dos cepas tipo. Las cepas restantes se distribuyeron a lo largo del árbol y se agruparon con diferentes especies de *Micromonospora* con nombres válidos publicados como *M. zamorensis* CR38^T, *M. yasonensis* DS3186^T, *M. inositola* DSM4389^T o *M. pisi* GUI15^T, entre otras cepas. Entre las 148 cepas identificadas como especies pertenecientes al género *Micromonospora*, diferentes miembros de la misma especie se aislaron de diferentes tejidos, lo que indica que una especie no limita su presencia a un solo tipo de tejido vegetal. En términos de distribución de especies bacterianas, *M. saelicesensis* fue nuevamente la especie más abundante en los diferentes tejidos muestreados y la única especie bacteriana presente en todos los tejidos vegetales analizados. En trabajos anteriores, *M. saelicesensis* fue

también la especie más abundante en diferentes leguminosas e incluso en plantas actinorizales. La presencia de *Micromonospora* en diferentes tejidos, como tallos y hojas, puede deberse a su paso desde la raíz a los tejidos superiores a través de los vasos vasculares de las plantas (xilema y floema), lo cual ha sido observado anteriormente en diferentes bacterias endofíticas. Además, el alto número de aislados de *Micromonospora* de hojas y nódulos puede sugerir que *Micromonospora* probablemente esté bien adaptada para vivir en estos tejidos. Se ha informado que los endófitos capaces de colonizar las partes aéreas de plantas, necesitan poseer diferentes requisitos fisiológicos para adaptarse y establecerse en diferentes nichos de plantas. Las cepas de *Micromonospora* aisladas de los diferentes tejidos vegetales mostraron resultados positivos en la producción de diferentes enzimas degradantes de polímeros vegetales tales como celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas y quitinasas, independientemente del tejido vegetal o leguminosa donde se aislaron.

Hasta ahora, la presencia de *Micromonospora* en nódulos fijadores de nitrógeno solo se ha informado a través de su aislamiento o visualización mediante diferentes técnicas como la hibridación fluorescente in situ (FISH) y la microscopía electrónica de transmisión (TEM), utilizando la misma o diferentes especies de plantas de donde se originaron las cepas. En este trabajo, la localización de *Micromonospora* en partes específicas del nódulo se logró utilizando una cepa marcada con una proteína fluorescente, *M. lupini* ML01-*gfp*. Esto demostró que esta cepa no solo es capaz de volver a infectar los tejidos internos de la raíz de su anfitrión original (*Lupinus*), sino también el de otras leguminosas como *Medicago* y *Trifolium*, lo que sugiere un amplio rango de huéspedes. La capacidad de *Micromonospora* para infectar diferentes especies de leguminosas contrasta con las interacciones simbióticas entre rizobios y

leguminosas, y *Frankia* y plantas actinorrícicas, que son más restrictivas. Además, este trabajo describe el proceso de colonización de *Micromonospora* en la superficie de la raíz y los pelos radicales hasta su ubicación en los primordios nodulares y los nódulos maduros, junto con la rizobia. La presencia de *Micromonospora* se detectó tempranamente en toda la raíz, especialmente en los pelos radicales. Se observaron deformaciones del vello radicular a los 2-3 días después de la inoculación. En ambas plantas (*Medicago* y *Trifolium*), se observó a *Micromonospora* adherida a las superficies de la raíz donde se ubicaron las deformaciones, principalmente en el ápice de los pelos. Los pelos radicales de las plantas control (no inoculadas), tanto de *Trifolium* como de *Medicago*, no mostraron deformaciones. Aún se desconoce qué desencadena la deformación de los pelos radicales cuando *Micromonospora* está en contacto con la raíz. Una posible causa de la colonización interna de la raíz por *Micromonospora* es la utilización de los pelos radicales para entrar al interior de la planta como sucede con *Rhizobium*. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para confirmar esta posibilidad. En el caso de los nódulos de la raíz, estos aparecieron y se desarrollaron 1-2 días antes en las plantas co-inoculadas con *Micromonospora* y rizobia, en comparación con las inoculadas solamente con rizobia. Esto puede indicar que *Micromonospora* actúa como un "ayudante" en el proceso de nodulación al producir un efecto positivo en las primeras etapas del desarrollo de los nódulos y al aumentar el número de nódulos. En nódulos maduros, se observó una coexistencia de *Micromonospora* y rizobia en la zona de infección, en algunas ocasiones ocupando ambas bacterias la misma célula vegetal. Los resultados también indicaron que los diferentes rizobios no fueron inhibidos por la co-inoculación con la actinobacteria y que el desarrollo de los bacteroides continuó de manera normal. Esto concuerda con

los ensayos de antagonismo realizados, donde se observó que *Micromonospora* no inhibe el crecimiento de los diferentes rizobios. Además, las plantas de estudio no mostraron ningún efecto negativo relacionado con la presencia de *Micromonospora* y el proceso de fijación de nitrógeno tampoco pareció estar alterado. Estos resultados sugieren fuertemente una interacción tripartita y la coexistencia de bacterias no rizobianas, como la *Micromonospora*, dentro de los tejidos de los nódulos reforzando su papel como bacteria auxiliar, aunque su función específica aún se espera ser aclarado.

La capacidad de la *Micromonospora* para colonizar diferentes leguminosas puede deberse a un intercambio de señales entre la planta y la bacteria. Este proceso se lleva a cabo mediante la liberación de moléculas señal por parte de las plantas que pueden modificar el comportamiento bacteriano. El estudio de la interacción planta-*Micromonospora* se ha centrado principalmente en el efecto que tiene *Micromonospora* en la planta y si la bacteria actúa como un promotor del crecimiento de la planta. Sin embargo, la influencia que la planta tiene sobre *Micromonospora* no se había estudiado hasta ahora. Este trabajo exploró cómo los exudados de raíz de una leguminosa como *Lupinus albus* podrían alterar la expresión de genes y proteínas en tres cepas de *Micromonospora* (*M. lupini* Lupac 08, *M. saelicensensis* Lupac 09^T y *M. cremea* CR30^T). Inicialmente en geles de una dimensión ya fue posible observar diferencias en los patrones de expresión entre las muestras. Sin embargo, fueron más evidentes cuando se examinaron los geles bidimensionales, observándose diferencias en los patrones de manchas entre la cepa crecida en presencia de exudados en comparación con la cepa crecida en ausencia de exudados. Los perfiles transcriptómicos y proteómicos obtenidos en este trabajo proporcionaron una

información valiosa sobre cómo *Micromonospora* reacciona a los compuestos liberados por la planta y qué eventos pueden estar ocurriendo durante esta interacción cuando *Micromonospora* entra en contacto con los exudados de las raíces de las plantas.

Estos perfiles de expresión mostraron cambios estadísticamente significativos en la expresión de genes y proteínas en respuesta de los exudados de la raíz. Lupac 08 fue la cepa que mostró un mayor número de proteínas y genes inducidos en comparación con las proteínas y genes inhibidos. Por el contrario, la cepa CR30^T mostró un mayor número de proteínas y genes inhibidos con respecto a los sobre-expresados. Sin embargo, la regulación de los patrones de expresión entre proteínas y genes involucrados en la misma función fue ocasionalmente diferente. Los perfiles proteómicos mostraron proteínas expresadas significativamente relacionadas con la producción de enzimas degradantes de polímeros vegetales tales como celulasas, xilanasas, amilasas y quitinasas. Los patrones de transcripción no solo mostraron genes que codifican para celulasas, amilasas y quitinasas, sino que también mostraron genes relacionados con la producción de pectinasas. Sin embargo, ningún gen expresado significativamente se relacionó con la producción de xilanasas. El número de genes inducidos implicados en la producción de enzimas degradantes de polímeros vegetales fue mayor que el número de proteínas inducidas por la acción del exudado de la raíz, especialmente en el caso de las celulasas y quitinasas. En el caso de las características de PGP, tanto el proteoma como el transcriptoma mostraron proteínas y genes relacionados con la biosíntesis de acetoina/butanodiol, la biosíntesis y la degradación de la trehalosa, y la absorción de hierro y fósforo. En el proteoma, también se regularon varias proteínas que participan en la producción de la IAA y

ACC desaminasa, funciones que no se expresaron significativamente de manera diferencial en los perfiles transcriptómicos. Con respecto a los patrones de expresión relacionados con la detección de moléculas señal y el transporte de carbohidratos, se obtuvieron los mismos grupos de transportadores tanto en el transcriptoma como en el proteoma. Entre las proteínas y genes regulados diferencialmente en presencia de exudados de raíces, un gran número puede estar involucrado en la colonización de tejidos vegetales (celulasas, xilanasas, pectinasas), producción de fitohormonas (acetoína, IAA), movilización de nutrientes para la planta (Fe y P), captación de moléculas señalizadoras (carbohidratos, péptidos, oligopéptidos y aminoácidos de cadena ramificada) y la protección de la planta contra fitopatógenos (quitinasas, sideróforos) y otras condiciones adversas (trehalosa). Se han observado resultados similares en otras bacterias endofíticas expuestas a los exudados de la raíz de su huésped. En general, el proteoma y el transcriptoma han originado nueva información sobre las respuestas genéticas y funcionales de *Micromonospora* bajo el efecto de los exudados de la raíz del huésped, y han proporcionado una base molecular para futuras investigaciones sobre los mecanismos subyacentes a la simbiosis inespecífica entre *Micromonospora* y las legumbres.

Después del análisis de los datos del transcriptoma, estos fueron validados por PCR en tiempo real (RT-PCR). Sin embargo, esta técnica también se utilizó para medir la expresión génica de genes diana después de exponer a las tres cepas de *Micromonospora* directamente a los exudados de la raíz de *Lupinus*. Los resultados obtenidos mostraron una mayor sobreexpresión de estos genes en comparación con los datos del transcriptoma, incluso en genes que estaban regulados negativamente en el transcriptoma. El aumento de la expresión varió de 1,5 a 68,8 veces, siendo los

genes que codifican para quitinasas y celulasas los que mostraron mayor sobreexpresión. Esto respalda la conclusión de que la expresión de genes y proteínas bacterianas en respuesta de los exudados de las raíces de las plantas puede estar limitada por los métodos utilizados.

Una característica de *Micromonospora* estudiada a lo largo de los diferentes capítulos es su capacidad para producir diferentes enzimas hidrolíticas de polímeros vegetales, como las celulasas. Entre las 148 cepas aisladas de diferentes tejidos de *Lupinus* y *Pisum*, el 98% de las ellas mostró actividad celulolítica cuando esta actividad se probó en ensayos *in vitro*. En el caso de los estudios proteómicos y transcriptómicos, las cepas Lupac 08 y Lupac 09^T mostraron proteínas y genes sobreexpresados relacionados con enzimas que pertenecen a la familia de las celulasas (β -glucanasas y endoglucanasas) en respuesta a los exudados de la raíz. En el caso particular de la cepa CR30^T, no mostró ninguna proteína significativamente regulada relacionada con la producción de celulasas, a diferencia del transcriptoma que mostró un gen inducido por los exudados relacionado con la producción de β -glucanasas. Además, la cepa CR30^T también mostró producción de celulasas en presencia de raíces vivas de lupino, mientras que no produjo celulasas en pruebas *in vitro* realizadas en placas de agar que contenían carboximetilcelulosa. Esto contrasta con las otras dos cepas probadas que mostraron actividad celulolítica tanto en presencia como en ausencia de la planta. Los genes que codifican para celulasas pueden considerarse candidatos apropiados para futuras mutagénesis con el objetivo de estudiar el efecto de genes candidatos individuales en el crecimiento y desarrollo de varias plantas. Esto se debe a que aún se desconoce la función de las celulasas en el establecimiento de la relación leguminosa-*Micromonospora*. Diferentes autores han descrito que las celulasas, junto

con otras enzimas producidas por endófitos, pueden estar involucradas en la adhesión y colonización de los tejidos internos del huésped, pero también en la remodelación de la pared celular, lignificación y defensa química en plantas, la activación de fitohormonas, protección contra posibles patógenos y el establecimiento de la relación bacteria-planta. Todavía quedan muchas preguntas por responder sobre la interacción de *Micromonospora* y legumbres, pero este trabajo confirma que esta bacteria juega un papel importante. Comprender la ecología de esta bacteria endofítica y sus interacciones moleculares tendrá un impacto en el crecimiento de las plantas y el rendimiento de los cultivos y, por lo tanto, en la economía y el medio ambiente.

Conclusiones

Los resultados obtenidos a lo largo de esta investigación nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. *Micromonospora* puede aislarse de tejidos vegetales esterilizados en la superficie diferentes a los nódulos fijadores de nitrógeno como raíces, tallos y hojas de plantas de *Lupinus angustifolius* y *Pisum sativum*. Por lo tanto, la presencia de esta actinobacteria en diferentes tejidos vegetales no se limita a los tejidos internos nodulares.
2. La diversidad bacteriana del género *Micromonospora* en los tejidos vegetales de *Pisum sativum* y *Lupinus angustifolius* es muy alta, siendo *M. noduli* y *M. saelicensis* las especies más abundantes.
3. Las cepas de *Micromonospora* aisladas de tejidos vegetales muestran resultados positivos en la producción de diferentes enzimas degradantes de polímeros vegetales tales como celulasas, xilanasas, pectinasas, amilasas y quitinasas, independientemente del tejido vegetal o leguminosa donde se aislaron.
4. La cepa *M. lupini* Lupac 08 no solo re infecta su huésped original (*Lupinus* sp.) Sino que también interactúa con otras legumbres como *Medicago* y *Trifolium*. Además, *M. lupini* Lupac 08 se localiza dentro de los nódulos de las tres legumbres y sugiere fuertemente que se produce una relación no específica entre *Micromonospora* y la planta.

5. Los diferentes rizobios no son inhibidos por la co-inoculación con *Micromonospora* y el desarrollo de bacteroides se desarrolla normalmente dentro del nódulo.
6. Los perfiles transcriptómicos y proteómicos muestran que los exudados de raíz de *Lupinus* pueden alterar la expresión de genes y proteínas en las tres cepas seleccionadas: *M. lupini* Lupac 08, *M. saelicesensis* Lupac 09^T y *M. cremea* CR30^T.
7. Las respuestas transcriptómicas y proteómicas de *Micromonospora* a la presencia de exudados de raíz de *Lupinus* dependen de la cepa, mostrando una proporción diferente de genes y proteínas expresadas e inhibidas entre cepas.
8. Los genes y proteínas regulados significativamente por el efecto de los exudados de la raíz en los perfiles transcriptómicos y proteómicos pueden estar relacionados con la interacción planta-bacteria, especialmente aquellos involucrados en la producción de enzimas degradantes de polímeros de plantas, actividades de promoción del crecimiento de plantas y la comunicación planta-bacteria.
9. Los exudados de la raíz de *Lupinus* promueven la sobreexpresión de genes y proteínas en *Micromonospora* involucrados en la degradación de los polímeros vegetales, como las celulasas. La cepa CR30^T, que no mostró actividad celulolítica en condiciones *in vitro*, mostró un gen sobreexpresado relacionado con la producción de β -glucanasa en presencia de exudados de raíz.
10. Las cepas de *Micromonospora* expuestas directamente a los exudados de raíz de *Lupinus* mostraron una sobrerregulación de los genes involucrados en la producción de enzimas degradantes de polímeros vegetales, en comparación con las muestras bacterianas crecidas en medio ISP 2 suplementado con 0.25 mg/ml de exudados de raíz de lupino.

11. *Micromonospora* es capaz de producir celulasas en presencia de raíces vivas de diferentes leguminosas (*Trifolium*, *Medicago* y *Lupinus*) sin dañar la planta. Incluso la cepa CR30^T, que no mostró actividad celulolítica en ausencia de raíces vivas, mostró producción de celulasas en presencia de raíces de las tres leguminosas.